



Габидинова Г.Ф.¹, Тимербулатова Г.А.^{1,2}, Даминова А.Г.³, Галялtdинов Ш.Ф.³,
Димиев А.М.³, Крючкова М.А.³, Фахруллин Р.Ф.³, Фатхутдинова Л.М.¹

Оценка воздействия промышленных одностенных и многостенных углеродных нанотрубок на культуры эпителиальных клеток дыхательных путей человека

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 420012, Казань, Россия;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)», 420061, Казань, Россия;

³ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, Казань, Россия

Введение. В настоящем исследовании проведена сравнительная оценка токсических эффектов промышленных одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) и многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) в низких дозах, соответствующих производственным экспозициям, на культурах клеток бронхиального эпителия BEAS-2B и альвеолярного эпителия A549.

Материалы и методы. Распределение по размерам агрегатов ОУНТ и МУНТ в дисперсиях оценивалось методами динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии. Оценка цитотоксичности проводилась с помощью MTS-теста и определения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клеточном супернатанте. Визуализация взаимодействия углеродных нанотрубок (УНТ) с клетками осуществлялась с использованием темнопольной и просвечивающей электронной микроскопии.

Результаты. Данные MTS-теста и ЛДГ-теста свидетельствуют о цитотоксичности неочищенных ОУНТ и МУНТ в диапазоне концентраций 50–200 мкг/мл и очищенных ОУНТ в диапазоне 25–200 мкг/мл в отношении клеток BEAS-2B. Показано, что наиболее подходящей моделью для изучения УНТ является клеточная культура бронхиального эпителия человека BEAS-2B. Выявлено, что ОУНТ и МУНТ проникают в цитоплазму клеток BEAS-2B и A549, при этом МУНТ чаще обнаруживаются в цитоплазме в виде вакуолизированных скоплений, тогда как единичные и агрегаты ОУНТ визуализируются в цитоплазме без тенденции к вакуолизации.

Ограничения исследования. Внесение УНТ в клетки осуществлялось в виде дисперсий, где обнаруживались как единичные нанотрубки, так и их агрегаты. Также в настоящем исследовании расчёт концентраций УНТ для внесения в клетки был основан на компьютерном моделировании.

Заключение. Различия в проникновении УНТ в клетки могут быть объяснены структурными особенностями: агрегаты МУНТ в несколько раз меньше по сравнению с ОУНТ, что облегчает их захват клетками. Дальнейшее изучение механизмов цитотоксического и генотоксического действия разных типов УНТ может способствовать выявлению особенностей воздействия МУНТ и ОУНТ на клетки дыхательной системы для разработки методологических подходов к безопасному использованию УНТ.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки; BEAS-2B; A549; цитотоксичность; темнопольная микроскопия; электронная микроскопия

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Габидинова Г.Ф., Тимербулатова Г.А., Даминова А.Г., Галялtdинов Ш.Ф., Димиев А.М., Крючкова М.А., Фахруллин Р.Ф., Фатхутдинова Л.М. Оценка воздействия промышленных одностенных и многостенных углеродных нанотрубок на культуры эпителиальных клеток дыхательных путей человека. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(12): 1509–1520. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-12-1509-1520> <https://elibrary.ru/ivtviw>

Для корреспонденции: Фатхутдинова Лилия Минвагизовна, доктор мед. наук, зав. каф. гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, Казань. E-mail: liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru

Участие авторов: Габидинова Г.Ф. — обзор литературы по теме исследования, культивирование клеток, проведение тестов (ЛДГ) на клетках, статистическая обработка данных, построение рисунков, обобщение полученных результатов; Тимербулатова Г.А. — обзор литературы по теме исследования, культивирование клеток, проведение тестов (MTS) на клетках, построение рисунков, обобщение полученных результатов; Даминова А.Г. — проведение просвечивающей электронной микроскопии, морфометрии суспензий; Галялtdинов Ш.Ф. — подготовка суспензий материалов для внесения в клетки; Димиев А.М. — разработка методов подготовки суспензий материалов для внесения в клетки; Крючкова М.А. — разработка методов визуализации наноматериалов в клетках (темнопольная микроскопия); Фахруллин Р.Ф. — разработка методов визуализации наноматериалов в клетках (темнопольная микроскопия); Фатхутдинова Л.М. — дизайн исследования, анализ материала, редактирование, подготовка статьи к публикации. *Все соавторы* — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт средств гранта Российского научного фонда № 22-25-00512, <https://rscf.ru/project/22-25-00512/>

Поступила: 27.10.2022 / Принята к печати: 08.12.2022 / Опубликована: 12.01.2023

Gulnaz F. Gabidinova, Gyuzel A. Timerbulatova, Amina G. Daminova, Shamil F. Galyaltdinov, Ayrat M. Dimiev, Marina A. Kryuchkova, Rawil F. Fakhrullin, Liliya M. Fatkhutdinova

Evaluation of the impact of industrial single-walled and multi-walled carbon nanotubes on human respiratory tract epithelial cells

¹Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation;

²Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, 420061, Russian Federation;

³Kazan Federal University, Kazan, 420008, Russian Federation

Introduction. In the present study, a comparative assessment of the toxic effects of industrial single-walled and multi-walled carbon nanotubes (SWCNT and MWCNT) at doses corresponding to industrial exposures on BEAS-2B and A549 cells was carried out.

Materials and methods. The size distribution of SWCNT and MWCNT agglomerates in dispersions was estimated by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Cytotoxicity was assessed using a MTS test and LDH assay. The interaction of CNTs with cells was visualized using dark-field and transmission electron microscopy.

Results. Cytotoxic effects of pristine SWCNT and MWCNT in concentrations of 50–200 µg/ml and purified SWCNT in the range of 25–200 µg/ml were found in BEAS-2B cells. SWCNT and MWCNT were found to penetrate into the cytoplasm of both BEAS-2B and A549 cells, while MWCNT are more often revealed in the intracellular content as vacuolized clusters, and single SWCNT and agglomerates are visualized in the cytoplasm without a tendency to vacuolization.

Limitations. CNT were introduced into cells in the form of dispersions, where both single nanotubes and their agglomerates were found. The calculation of CNT concentrations for introduction into cells was based on computer simulation.

Conclusion. Further study of the mechanisms of cytotoxic and genotoxic effects of different types of carbon nanotubes (CNT) may contribute to the identification of MWCNT and SWCNT specific effects on the cells of the respiratory system to develop methodological approaches to the safe use of CNT.

Keywords: carbon nanotubes; BEAS-2B; A549; cytotoxicity; dark-field microscopy; electron microscopy

Compliance with ethical standards. The study does not require submission of the opinion of the biomedical ethics committee or other documents.

For citation: Gabidinova G.F., Timerbulatova G.A., Daminova A.G., Galyaltdinov Sh.F., Dimiev A.M., Kryuchkova M.A., Fakhrullin R.F., Fatkhutdinova L.M. Evaluation of the impact of industrial single-walled and multi-walled carbon nanotubes on human respiratory tract epithelial cells. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(12): 1509–1520. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-12-1509-1520> <https://elibrary.ru/ivtviw> (In Russian)

For correspondence: Liliya M. Fatkhutdinova, MD, PhD, head of the Department of Hygiene and Occupational Medicine, Kazan, 420012, Russian Federation. E-mail: liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru

Information about the authors:

Gabidinova G.F., <https://orcid.org/0000-0003-2616-5017>

Daminova A.G., <https://orcid.org/0000-0002-7672-4430>

Dimiev A.M., <https://orcid.org/0000-0001-7497-1211>

Fakhrullin R.F., <https://orcid.org/0000-0003-2015-7649>

Timerbulatova G.A., <https://orcid.org/0000-0002-2479-2474>

Galyaltdinov Sh.F., <https://orcid.org/0000-0002-9494-5288>

Kryuchkova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6946-0553>

Fatkhutdinova L.M., <https://orcid.org/0000-0001-9506-563X>

Contribution: *Gabidinova G.F.* – literature review on the topic of research, cell cultivation, tests (LDH) on cells, statistical data processing, preparation of pictures, generalization of the results; *Timerbulatova G.A.* – literature review on the topic of research, cell cultivation, tests (MTS) on cells, preparation of pictures, generalization of the results; *Daminova A.G.* – transmission electron microscopy, suspension morphometry, generalization of the obtained results; *Galyaltdinov Sh.F.* – preparation of suspensions of materials for introduction into cells; *Dimiev A.M.* – development of methods for preparing suspensions of materials for introduction into cells; *Kryuchkova M.A.* visualization of nanomaterials in cells (dark field microscopy); *Fakhrullin R.F.* – visualization of nanomaterials in cells (dark field microscopy); *Fatkhutdinova L.M.* – material analysis; editing; preparing an article for publication. *All authors* are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-25-00512, <https://rscf.ru/project/22-25-00512/>

Received: October 27, 2022 / Accepted: December 8, 2022 / Published: January 12, 2023

Введение

Уникальные физические и химические свойства углеродных нанотрубок (УНТ) обуславливают их широкое применение в различных областях, включая производство электронной техники, сенсоров, высокопрочных волокон, композитных материалов [1, 2]. Кроме того, УНТ рассматриваются как перспективные материалы для использования в биомедицинских областях [3]. УНТ представляют собой свёрнутые в трубку листы графена. Одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ) состоят из одного цилиндрического листа графена, а многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) – из нескольких структурообразующих слоёв. Растущие объёмы производства УНТ и увеличение числа предприятий, производящих и использующих данный вид наноматериалов, приводят к увеличению числа лиц, подвергающихся воздействию аэрозолей УНТ на рабочих местах [4].

Ингаляционный путь поступления определяет дыхательную систему как наиболее вероятную мишень токсического действия нанотрубок. При изучении токсичности УНТ в экспериментах *in vitro* взаимодействие УНТ с дыхательными путями чаще всего моделируют на культурах клеток бронхи-

ального эпителия человека BEAS-2B и альвеолярного эпителия лёгких человека A549 [2]. Обзор статей по изучению токсического действия УНТ на клетки дыхательной системы описывает такие эффекты воздействия нанотрубок, как снижение жизнеспособности клеток, индукция апоптоза, повреждение генетического материала, нарушение барьерных функций и развитие фиброза [5]. Многие исследователи отмечают способность клеток дыхательных путей к поглощению как ОУНТ, так и МУНТ с последующей их локализацией в цитоплазме или в ядре [6–8].

Данные о сравнительной токсичности ОУНТ и МУНТ в экспериментах *in vitro* являются немногочисленными и противоречивыми. Авторы сообщают о большей цитотоксичности ОУНТ по отношению к клеткам человека и животных, в то время как МУНТ проявляют меньшую активность [9–11]. В других исследованиях не показаны различия в цитотоксических эффектах при воздействии разных видов углеродных нанотрубок [12–14]. Однако следует учитывать, что по результатам экспериментов *in vivo* МУНТ-7 (производитель Mitsui Ltd., Япония) классифицированы как возможный канцерогенный фактор для человека и отнесены Международным агентством по изучению рака (МАИР) к категории 2B [15].

Таблица 1 / Table 1

Физико-химическая характеристика очищенных и неочищенных ОУНТ и МУНТ**Physico-chemical characteristics of pristine and purified SWCNTs and MWCNTs**

Физико-химическая характеристика Physical-chemical characteristics	Неочищенные ОУНТ TUBALL™ Pristine single-walled carbon nanotubes (SWCNT) TUBALL™	Очищенные ОУНТ TUBALL™ Purified SWCNT TUBALL™	МУНТ Таунит-М Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) Taunit-M
Металлические примеси Metal impurities	14 ± 1% от массы / of mass	менее 1% от массы less 1% of mass	до 5% от массы up to 5% of mass
Длина, мкм / Length, μm	> 5	> 5	> 2
Средний диаметр УНТ, нм Average carbon nanotubes (CNT) diameter, nm	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.4	8–15
Полная удельная поверхность, м²/г Total surface area, m²/g	410	490	300–320

Противоречивые результаты могут быть объяснены различными механизмами токсического действия ОУНТ и МУНТ, которые реализуются в зависимости от структурных характеристик материалов и особенностей взаимодействия с клетками в условиях *in vitro*. Например, при изучении влияния ОУНТ и МУНТ в концентрациях 2,5 и 25 мкг/мл на клетки бронхиального эпителия человека 16HBE было обнаружено, что разные виды углеродных нанотрубок индуцируют разные пути гибели клетки: воздействие ОУНТ приводило к активации запрограммированной гибели клеток и ороговению, а при действии МУНТ запускались процессы аутофагии [16]. Физико-химические особенности нанотрубок, в частности длина и размер, могут влиять на их проникновение в клетки [17–19]. Сравнение проникновения ОУНТ и МУНТ в клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 продемонстрировало, что УНТ с меньшими длиной и наружным диаметром обнаруживаются во внутриклеточном содержимом, тогда как УНТ больших размеров в клетки не поступают [18]. Изучение действия МУНТ разной длины на клетки гиппокампа мыши и клетки феохромоцитомы с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показало, что короткие нанотрубки легче проникают через мембрану, действуя как «наноиглы», в то время как длинные нанотрубки располагаются в виде «пучков», что снижает эффективность проникновения [19]. Более свободное поступление коротких УНТ в клетки может обуславливать большую токсичность, что подтверждается результатами исследований: короткие УНТ оказывают значительно выраженное токсическое действие в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [20, 21].

Анализ концентраций УНТ в экспериментах *in vitro* показывает, что лишь в некоторых случаях используемые концентрации совпадают с производственными экспозициями, в то время как в большинстве исследований изучаемые концентрации превышают производственные в несколько десятков раз [2, 22–24]. Большой объём накопленных данных о производственных экспозициях на рабочих местах предприятий – производителей углеродных нанотрубок [25] позволяет оценивать их эффекты в меньшем диапазоне концентраций. Существует необходимость исследования токсичности УНТ в более низких концентрациях, соответствующих реальным экспозициям на рабочих местах.

В настоящем исследовании проведена сравнительная оценка токсических эффектов промышленных одностенных и многостенных УНТ в низких дозах, соответствующих производственным экспозициям, на культурах клеток бронхиального эпителия BEAS-2B и альвеолярного эпителия A549.

Материалы и методы

С учётом преимущественно ингаляционного пути поступления УНТ [25, 26] для исследования были выбраны иммортализованные клетки нормального человеческого бронхиального эпителия BEAS-2B (Cell Applications, Inc., США), представляющие собой клетки нижних дыхательных путей, и клетки альвеолярного эпителия лёгких человека линии A549 (Cell Applications, Inc., США).

В качестве материала для исследования использовались очищенные и неочищенные от металлических примесей ОУНТ TUBALL™ (производитель – группа компаний OCSiAl) и МУНТ Таунит-М (производитель – ООО «НаноТехЦентр»). Физико-химическая характеристика используемых материалов представлена в табл. 1.

Диапазон концентраций исследуемых материалов, соответствующих производственным экспозициям, был рассчитан с учётом предварительных данных о концентрации и дисперсности УНТ в воздухе рабочей зоны предприятий – производителей ОУНТ и МУНТ. С учётом данных, полученных в ходе компьютерного моделирования депонирования аэрозоля УНТ в различных отделах лёгких человека с использованием свободно распространяемой программы MPPD (Multiple Path Particle Dosimetry V3.04) [27], и данных открытых источников литературы диапазон концентраций для исследования составил 0,0006–200 мкг/мл, включая широкий набор нетоксичных и потенциально токсичных доз УНТ.

Дисперсии исследуемых материалов были подготовлены на основе культуральной среды Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) (Sigma-Aldrich, 511K-500, Германия) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и культуральной среды Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ПанЭко, С410П, Россия) с добавлением 10%-й ЭТС.

Приготовление дисперсий проводили в асептических условиях (в биобоксе) методом ультразвуковой обработки с использованием аппарата Sonic Vibra Cell Sonicator (Sonics&Materials, США) при следующих параметрах работы: 750 Вт, 20 кГц, 40%-я амплитуда, пульс 5/6, время 30 мин [28]. Изначально были подготовлены дисперсии УНТ в исходной концентрации 0,2 мг/мл, из которой получали необходимые разведения для экспериментов.

Характеристика дисперсий. Контроль качества полученных дисперсий ОУНТ и МУНТ проводили методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (КФУ). Образцы дисперсий наносили по 5 мкл на медные сеточки с подложкой Formvar/Carbon (Electron

Microscopy Sciences, США). Анализ образцов проводили с помощью аппаратного комплекса ПЭМ атомарного разрешения для исследования нанобъектов Hitachi HT7700 Exalens (Япония). Для количественной оценки агломератов ОУНТ и МУНТ в дисперсиях использовали программное обеспечение ImageJ (National Institutes of Health, США).

Распределение по размерам агломератов ОУНТ и МУНТ в полученной дисперсии дополнительно оценивалось методом динамического светорассеяния при помощи анализатора Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания) Центра коллективного пользования ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (ЦКП Казанский ГМУ). Измерение проводили при температуре плюс 25 °С. Каждый образец помещали в одноразовую кювету из полистирола (Brand, Германия) и анализировали не менее трёх раз, одно измерение состояло из 15 повторов длительностью по 10 с каждый.

В процессе размола, упаковки или обработки материалы (ОУНТ, МУНТ) могут быть загрязнены бактериальными эндотоксинами (липополисахаридами – основными структурными компонентами наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий), вызывающими различные побочные реакции при воздействии на биологические объекты [29], поэтому приготовленные дисперсии дополнительно были протестированы на наличие бактериального эндотоксина с помощью ЛАЛ-реактива (Endosafe КТА, серия К2422L, Charles River Endosafe, США) с использованием турбидиметрического кинетического метода¹ на базе НПО «ЛАЛ-центр» (г. Москва).

Клеточные линии культивировали в СО₂-инкубаторе (LAMSYSTEMS ИЛМ-170, Миасс, Россия) при стандартных условиях: температура плюс 37 °С, 5%-й СО₂. Клетки BEAS-2В засеивали в культуральную среду ВЕГМ с добавлением 10%-й ЭТС, а клетки А549 – в культуральную среду DMEM с добавлением 10%-й ЭТС. Проведение клеточных экспериментов осуществлялось на базе ЦКП Казанский ГМУ.

Через 72 ч после внесения дисперсий исследуемых материалов проводили оценку цитотоксичности и визуализация УНТ в клетках BEAS-2В и А549.

Оценка цитотоксичности. Оценка цитотоксичности проводили с помощью коллометрического МТС-теста (Promega, США), основанного на оценке метаболической активности клеток, отражающей их жизнеспособность. В эксперименте исследовали 18 концентраций в диапазоне от 0,0006 до 200 мкг/мл; оценку результатов теста МТС-теста проводили путём сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Для достижения статистической достоверности каждая концентрация материала была исследована в трёх повторностях². Измерение оптической плотности осуществляли с помощью планшетного фотокolorиметра Multiskan (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм.

Оценку целостности плазматической мембраны проводили путём исследования высвобождения фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с помощью набора LDH Assay Kit (Abscam, UK) в культуральной среде клеток, подвергшихся воздействию УНТ в течение 72 ч. В эксперименте изучали 4 концентрации исследуемых УНТ (100; 50; 0,03 и 0,0006 мкг/мл). Клетки без воздействия УНТ использовали в качестве контроля, а клетки, подвергшиеся воздействию 1%-го раствора Triton X-100, использовали в качестве положительного контроля цитотоксичности. Для достижения статистической достоверности каждая концентрация ма-

териала исследовалась в трёх повторностях². Поглощение измеряли при 450 нм с использованием планшетного фотокolorиметра Multiskan (Thermo Fisher Scientific, США). Данные для контрольных и экспонированных клеток рассчитывали и выражали в виде процента цитотоксичности, представляющего среднее значение трёх лунок для каждой концентрации. Для каждого эксперимента процент цитотоксичности рассчитывали по формуле:

$$\text{Цитотоксичность (\%)} = \frac{\text{среднее (клетки под воздействием УНТ)} - \text{среднее (контроль)}}{\text{среднее (положительный контроль)} - \text{среднее (контроль)}}$$

Визуализация УНТ с использованием метода темнопольной микроскопии. Микроскопию клеточных культур проводили на микроскопе Olympus BX51 (Япония), оснащённом темнопольным конденсором CytoViva® для визуализации в режиме тёмного поля с масляной иммерсией [30, 31]. Исследования выполнены на базе научно-исследовательской лаборатории «Бионанотехнологии» КФУ. Темнопольные изображения были получены с использованием полупрозрачного объектива Olympus (×100, переменная числовая апертура 0,6–1,3), CCD-видеокамеры Dage xL и программного обеспечения Exponent 7 (Dage-MTI, США). Применение темнопольной микроскопии позволяет визуализировать наноразмерные частицы в клетках [30, 31]. Результаты темнопольной микроскопии оценивали через 72 ч в концентрации 100 мкг/мл в клеточных культурах BEAS-2В, А549.

Визуализация УНТ с использованием метода ПЭМ. Для исследования на ПЭМ были выбраны образцы клеток BEAS-2В и А549 под действием концентрации 100 мкг/мл с периодом экспозиции 72 ч. УНТ фиксировали для электронной микроскопии по стандартному протоколу. Образцы были зафиксированы последовательно в глутаровом альдегиде и тетраоксиде осмия, обезвожены и полимеризованы в эпоксидную смолу Epon (Electron Microscopy Sciences, США). Ультратонкие срезы клеток толщиной 50–80 нм получали на ультратриктороме Leica EM UC7 (Leica Microsystems GmbH, Германия), помещали на медные сеточки с подложкой Formvar/Carbon и окрашивали в течение 20 мин насыщенным водным раствором уранилацетата и 5 мин цитратом свинца. Срезы просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Hitachi HT 7700 Exalens при ускоряющем напряжении 100 кэВ.

Статистическая обработка. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2007. Для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли *t*-критерий Стьюдента. При *p* < 0,05 различия считали статистически значимыми. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения плюс-минус стандартное отклонение.

Результаты

Характеристика дисперсий ОУНТ и МУНТ. Физико-химическая характеристика трёх типов УНТ представлена в табл. 1.

По данным динамического светорассеяния в дисперсиях ОУНТ и МУНТ, подготовленных на основе культуральной среды ВЕГМ и на основе культуральной среды DMEM, преобладали агломераты размером до 1000 нм (табл. 2).

При оценке морфометрических характеристик УНТ в суспензии с использованием ПЭМ было показано, что наружный диаметр всех исследованных материалов находится в одном диапазоне (табл. 3). Средняя длина агломератов УНТ в дисперсии меньше, чем заявлено производителем. Такое изменение длины УНТ может быть связано как с проведением ультразвуковой обработки во время подготовки дисперсий, так и с тем, что УНТ в дисперсии, как правило, представлены преимущественно в виде скоплений из-за склонности их к агломерации. На рис. 1 приведены ПЭМ-изображения дисперсии неочищенных, очищенных ОУНТ и

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) (утв. приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 31 октября 2018 г.). Доступно: <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/11/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xiv-izdaniya>

² Методические указания МУ 1.2.2635–10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов» (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 24 мая 2010 г.). Справочно-правовая система «ГАРАНТ». Доступно: <https://www.garant.ru/>

Таблица 2 / Table 2

Результаты ДСР по распределению размеров агломератов УНТ (средний размер агломератов, нм) ($X \pm \sigma$)
 DLS results on the size distribution of CNT agglomerates (average size of agglomerates, nm) ($X \pm \sigma$)

Агломерат УНТ CNT agglomerates	Культуральная среда с добавлением 10%-й бычьей сыворотки (средний размер агломератов УНТ, нм) Culture medium supplemented with 10% bovine serum (average size of CNT agglomerates, nm)	
	BEGM	DMEM
Неочищенные ОУНТ / Pristine SWCNT	578.33 ± 71.67	604.4 ± 23.07
Очищенные ОУНТ / Purified SWCNT	806.37 ± 34.48	847.43 ± 27.30
МУНТ / MWCNT	207.4 ± 1.54	242.37 ± 3.11

Таблица 3 / Table 3

Результаты ПЭМ по распределению размеров УНТ (средний размер агломератов, нм) ($X \pm \sigma$)
 TEM results on CNT size distribution (average size of agglomerates, nm) ($X \pm \sigma$)

Агломерат УНТ CNT agglomerates	Культуральная среда с добавлением 10%-й бычьей сыворотки (средний размер агломератов УНТ, нм) Culture medium supplemented with 10% bovine serum (average size of CNT agglomerates, nm)			
	BEGM		DMEM	
	наружный диаметр, нм outer diameter, nm	длина, мкм length, μm	наружный диаметр, нм outer diameter, nm	длина, мкм length, μm
Неочищенные ОУНТ / Pristine SWCNT	6.299 ± 4.436	1.646 ± 0.980	9.287 ± 1.225	1.156 ± 0.112
Очищенные ОУНТ / Purified SWCNT	8.807 ± 5.312	0.653 ± 0.554	12.585 ± 1.060	1.258 ± 0.075
МУНТ / MWCNT	7.667 ± 3.814	0.242 ± 0.132	12.896 ± 2.604	0.485 ± 0.063

МУНТ в клеточных средах BEGM и DMEM. УНТ в дисперсиях представлены как единичными нанотрубками, так и их скоплениями. В случае с неочищенными ОУНТ на рисунках также можно наблюдать наличие примесей.

Оценка цитотоксичности. По результатам MTS-теста выявлено снижение жизнеспособности клеток BEAS-2B на 34, 27 и 23% при экспозиции в течение 72 ч к МУНТ в концентрациях 200, 100 и 50 мкг/мл соответственно (рис. 2, а). При таких же концентрациях были отмечены значимые отличия в жизнеспособности клеток по сравнению с кон-

тролем при воздействии неочищенных ОУНТ: через 72 ч после экспозиции выжили 62, 72 и 90% клеток бронхиального эпителия при концентрациях 200, 100, 50 мкг/мл соответственно (рис. 2, б). Цитотоксические эффекты наблюдались на более низких концентрациях для очищенных ОУНТ: дозозависимое снижение жизнеспособности клеток по сравнению с контролем зафиксировано на концентрациях 200, 100, 50 и 25 мкг/мл (рис. 2, в). Процент выживших клеток составил 65, 68, 70 и 86% на соответствующих концентрациях.

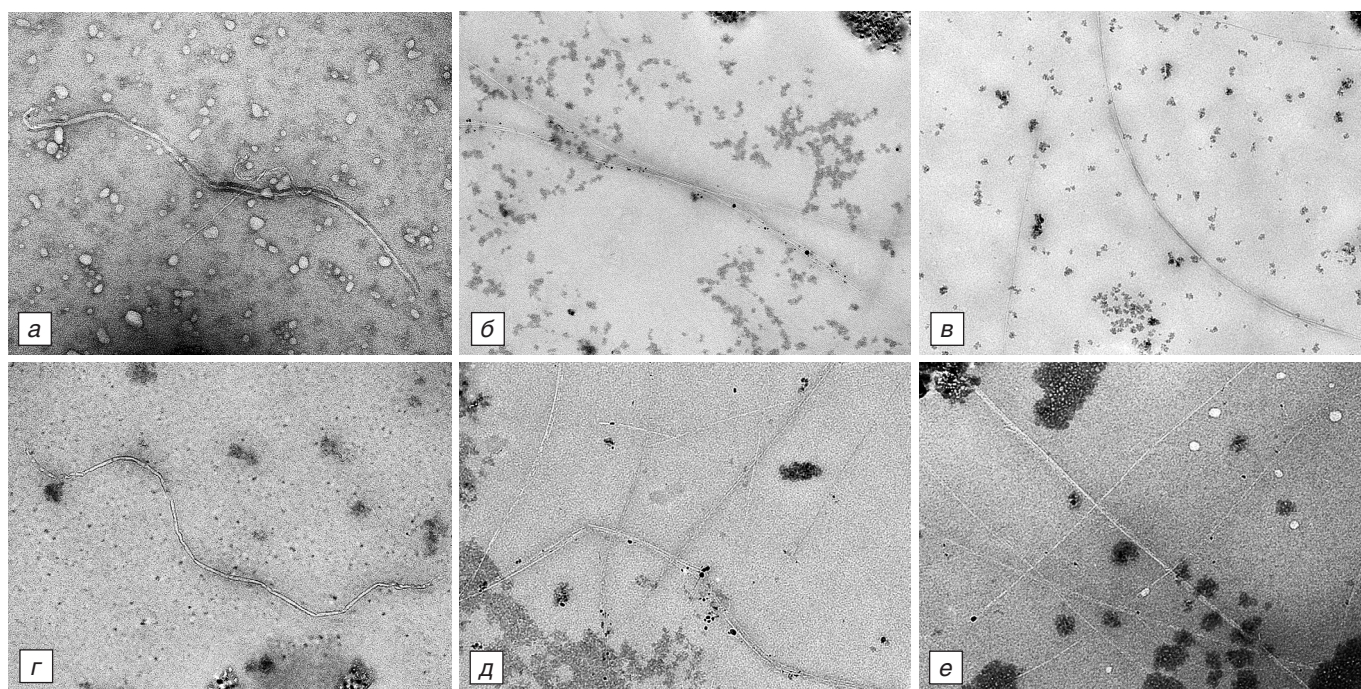


Рис. 1. Просвечивающая электронная микроскопия дисперсий УНТ в средах BEGM с 10% бычьей сывороткой (200 нм): а – МУНТ; б – ОУНТ (неочищ.); в – ОУНТ (очищ.); DMEM с 10% бычьей сывороткой: г – МУНТ; д – ОУНТ (неочищ.); е – ОУНТ (очищ.).

Fig. 1. Transmission electron microscopy of CNT dispersions in BEGM media with 10% bovine serum (200nm): а – MWCNT; б – SWCNT (pristine); в – SWCNT (purified); DMEM with 10% bovine serum: г – MWCNT; д – SWCNT (pristine); е – SWCNT (purified).

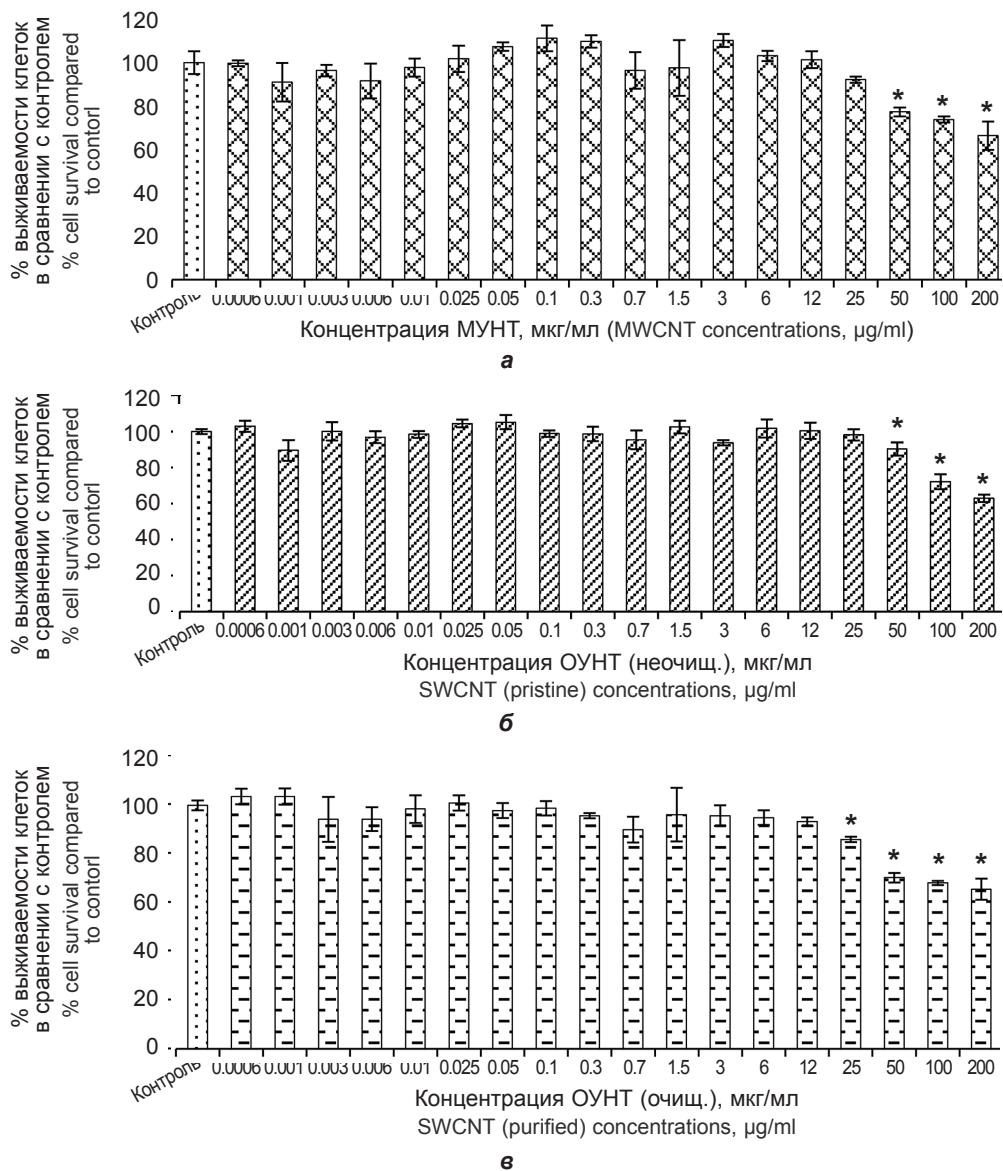


Рис. 2. Цитотоксическая активность исследуемых материалов в отношении клеток линии BEAS-2B; среднее значение ± стандартное отклонение выживаемости клеток в MTS-тесте после 72-часовой экспозиции исследуемых материалов: а – МУНТ; б – ОУНТ (неочищ.); в – ОУНТ (очищ.). * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Fig. 2. Cytotoxic activity of the studied materials to the BEAS-2B cells; mean value ± standard deviation of cell survival in the MTS test after 72-hour exposure to the studied materials: а – MWCNT; б – SWCNT (pristine); в – SWCNT (purified). * – $p < 0.05$ compared to control.

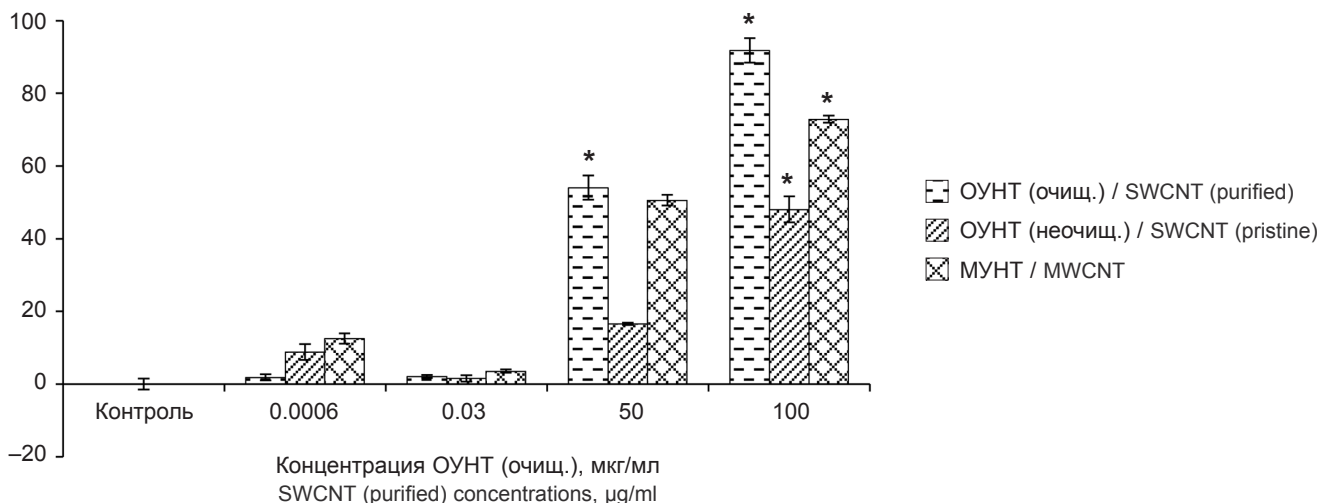
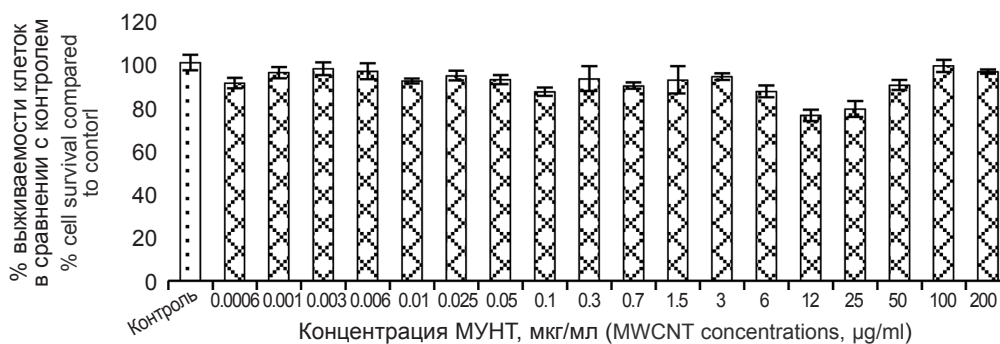


Рис. 3. Цитотоксическая активность исследуемых материалов в отношении клеток линии BEAS-2B; среднее значение ± стандартное отклонение по данным ЛДГ-теста после 72-часовой экспозиции исследуемых материалов; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Fig. 3. Cytotoxic activity of the studied materials to the BEAS-2B cells; mean value ± standard deviation according to the LDH assay after 72-hour exposure to the studied materials; * – $p < 0.05$ compared to control.

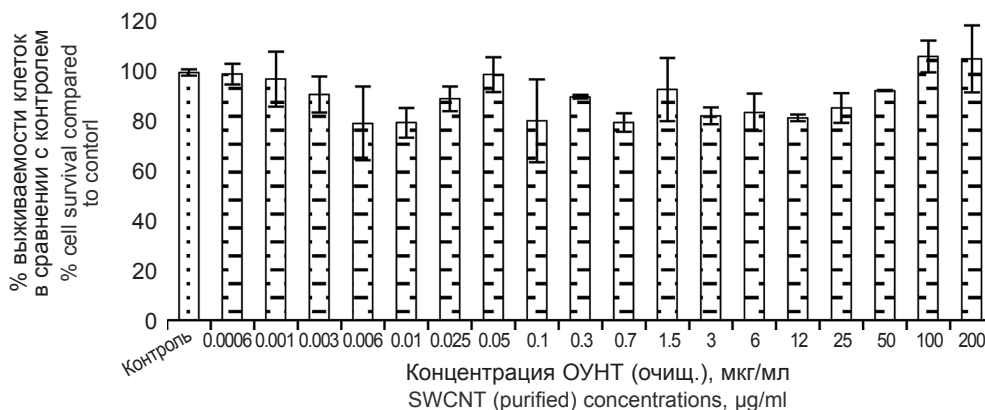
Original article



а



б



в

Рис. 4. Цитотоксическая активность исследуемых материалов в отношении клеток линии A549; среднее значение \pm стандартное отклонение выживаемости клеток в MTS-тесте после 72-часовой экспозиции исследуемых материалов: а – МУНТ; б – ОУНТ (неочищ.); в – ОУНТ (очищ.).

Fig. 4. Cytotoxic activity of the studied materials to the A549 cells; mean value \pm standard deviation of cell survival in the MTS test after 72-hour exposure of the studied materials: а – MWCNT; б – SWCNT (pristine); в – SWCNT (purified).

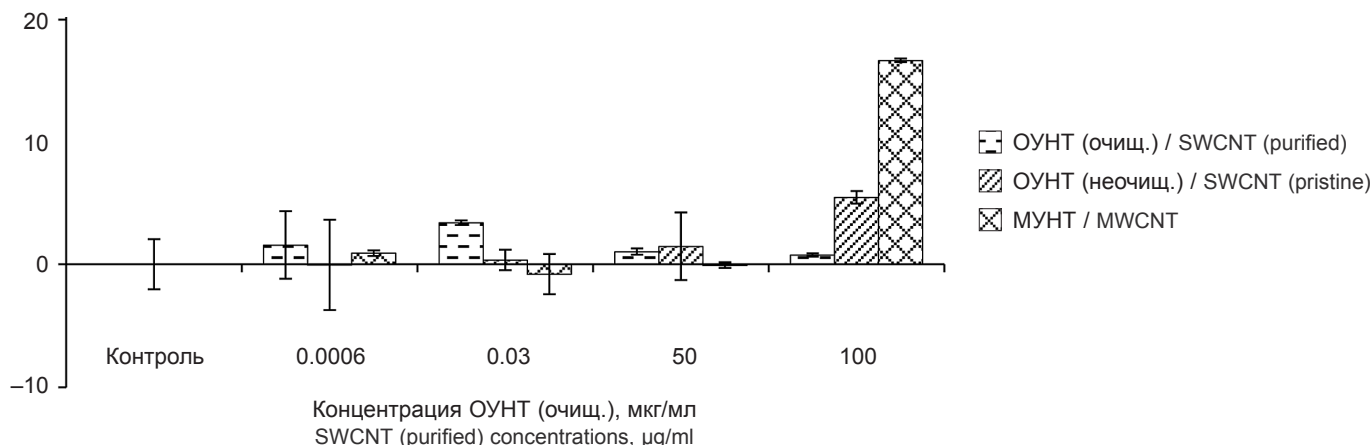


Рис. 5. Цитотоксическая активность исследуемых материалов в отношении клеток линии A549; среднее значение \pm стандартное отклонение по данным ЛДГ-теста после 72-часовой экспозиции исследуемых материалов.

Fig. 5. Cytotoxic activity of the studied materials to the A549 cells; mean value \pm standard deviation according to the LDH assay after 72-hour exposure to the studied materials.

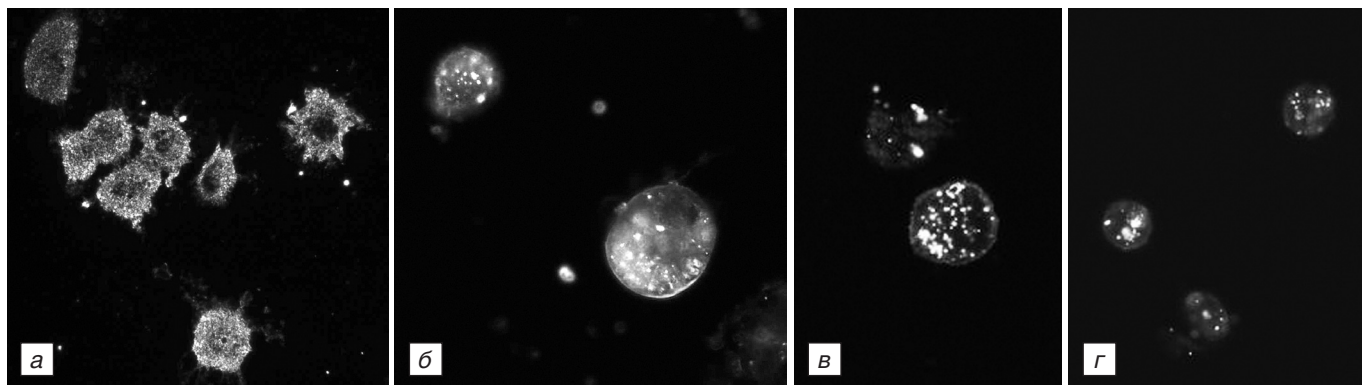


Рис. 6. Визуализация проникновения УНТ в цитоплазму клеток посредством темнопольной микроскопии. Клетки BEAS-2B под действием исследуемых материалов в концентрации 100 мкг/мл: *а* – контроль (клеточная среда BEGM); *б* – МУНТ; *в* – неочищенные ОУНТ; *г* – очищенные ОУНТ.

Fig. 6. Visualization of CNT penetration into the cell cytoplasm by dark-field microscopy. BEAS-2B cells exposed to test materials at a concentration of 100 µg/ml: *a* – control (BEGM cell medium); *б* – MWCNT; *в* – pristine SWCNT; *г* – purified SWCNT.

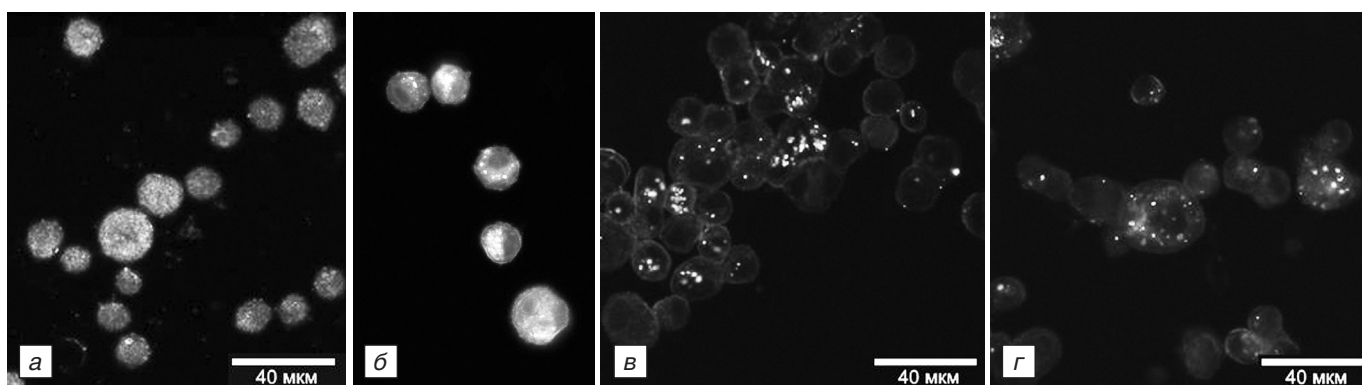


Рис. 7. Визуализация проникновения УНТ в цитоплазму клеток посредством темнопольной микроскопии. Клетки A549 под действием исследуемых материалов в концентрации 100 мкг/мл: *а* – контроль (клеточная среда BEGM); *б* – МУНТ; *в* – неочищенные ОУНТ; *г* – очищенные ОУНТ.

Fig. 7. Visualization of CNT penetration into the cell cytoplasm by dark-field microscopy. A549 cells exposed to test materials at a concentration of 100 µg/ml: *a* – control (BEGM cell medium); *б* – MWCNT; *в* – pristine SWCNT; *г* – purified SWCNT.

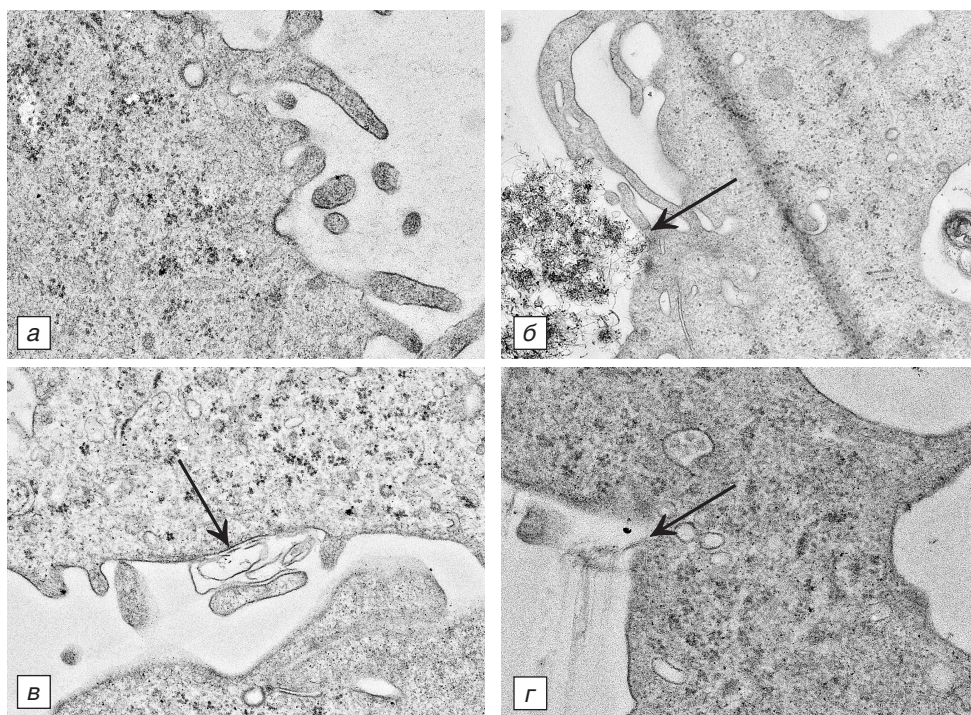


Рис. 8. Просвечивающая электронная микроскопия клеток BEAS-2B после 72-часовой экспозиции исследуемых материалов (500 нм): *а* – клетки без воздействия; *б* – МУНТ; *в* – ОУНТ неочищ.; *г* – ОУНТ очищ. (стадия взаимодействия УНТ с клеткой).

Fig. 8. Transmission electron microscopy of BEAS-2B cells after 72-hour exposure of the studied materials (500 nm): *a* – untreated cells; *б* – MWCNT; *в* – pristine SWCNT; *г* – purified SWCNT (stage of CNT interaction with the cell).

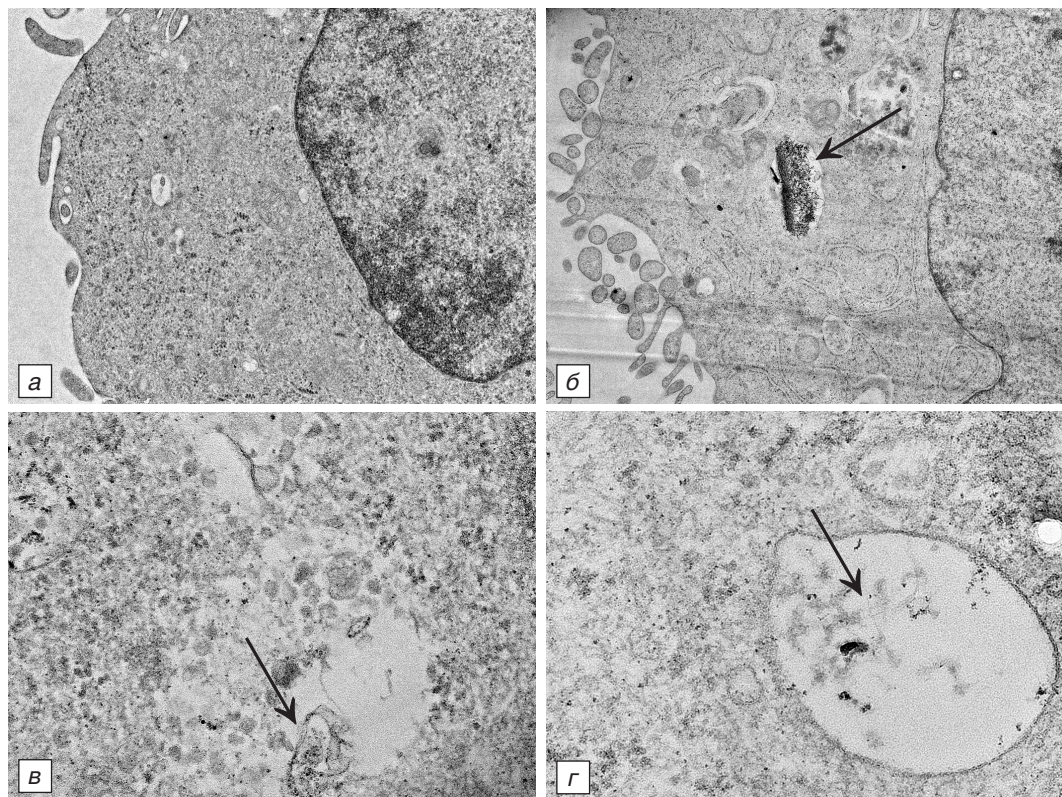


Рис. 9. Просвечивающая электронная микроскопия клеток BEAS-2B после 72-часовой экспозиции исследуемых материалов (1 мкм): а – клетки без воздействия; б – МУНТ; в – ОУНТ неочищ.; г – ОУНТ очищ. (частицы УНТ в цитоплазме клеток).

Fig. 9. Transmission electron microscopy of BEAS-2B cells after 72-hour exposure of the studied materials: а – untreated cells; б – MWCNT; в – pristine SWCNT; г – purified SWCNT (particles of CNT in the cytoplasm of cells).

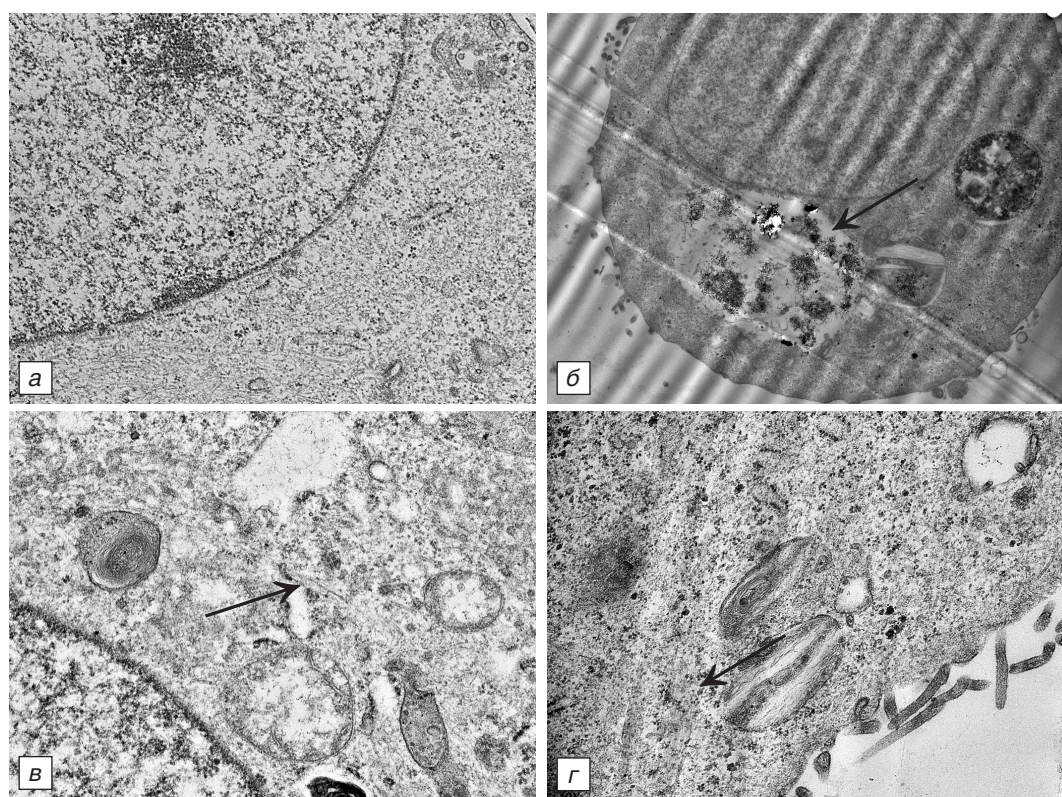


Рис. 10. Просвечивающая электронная микроскопия клеток A549 после 72-часовой экспозиции исследуемых материалов (1 мкм): а – клетки без воздействия; б – МУНТ; в – ОУНТ неочищ.; г – ОУНТ очищ. (частицы УНТ в цитоплазме клеток).

Fig. 10. Transmission electron microscopy of A549 cells after 72-hour exposure of the studied materials: а – untreated cells; б – MWCNT; в – pristine SWCNT; г – purified SWCNT (particles of CNT in the cytoplasm of cells).

Оценка повреждения плазматической мембраны, определяемого с помощью анализа ЛДГ, показала тенденцию, сходную со снижением жизнеспособности в исследованных клетках (рис. 3). При воздействии МУНТ в концентрации 100 мкг/мл наблюдалось значительное повышение уровня ЛДГ в супернатанте клеток BEAS-2B. Повреждение целостности мембраны клеток BEAS-2B было более выраженным при воздействии очищенных ОУНТ, чем неочищенных ОУНТ. Воздействие УНТ на бронхиальные клетки вызывало повышение уровня ЛДГ в супернатанте при 100 мкг/мл для всех типов УНТ и при 50 мкг/мл для очищенных ОУНТ.

В клетках A549 токсичность УНТ была ниже, чем в клетках BEAS-2B. По данным MTS-теста, выживаемость клеток A549 под действием очищенных, неочищенных ОУНТ и МУНТ была не ниже 75% по сравнению с контролем и статистически значимо не отличалась от контроля (рис. 4).

Активность ЛДГ в супернатанте клеток A549, подвергшихся воздействию УНТ, на всех концентрациях также не отличалась от контроля (рис. 5).

Таким образом, получены согласованные результаты по обоим тестам на цитотоксичность. Данные MTS-теста и ЛДГ-теста свидетельствуют о токсичности ОУНТ и МУНТ в отношении клеток бронхиального эпителия BEAS-2B в концентрациях 200, 100, 50 мкг/мл для неочищенных ОУНТ и МУНТ; 200, 100, 50, 25 мкг/мл для очищенных ОУНТ с активацией пути нарушения метаболической активности клеток и повреждения мембран клеток. Клетки альвеолярного эпителия A549 оказались более устойчивыми к действию УНТ, что проявлялось в отсутствии снижения жизнеспособности этих клеток и в отсутствии признаков нарушения целостности клеточных мембран при действии всех изучаемых концентраций УНТ.

Визуализация ОУНТ и МУНТ в клетках. Визуализация УНТ в клетках бронхиального эпителия BEAS-2B и клетках альвеолярного эпителия A549 методом темнопольной микроскопии показала наличие УНТ на поверхности и внутри клеток при концентрации 100 мкг/мл (рис. 6, 7).

Визуализация экспонированных культур BEAS-2B под действием концентрации 100 мкг/мл разных видов УНТ с помощью ПЭМ выявила способность клеток бронхиального эпителия к поглощению ОУНТ и МУНТ. При взаимодействии углеродных нанотрубок с клетками была обнаружена тенденция к инвагинации клеточной мембраны; углеродные нанотрубки проникали в клетки преимущественно путём эндоцитоза (рис. 8). УНТ внутри клеток находятся в лизосомоподобных структурах или свободно в цитоплазме клеток, что показано на изображениях ПЭМ (рис. 9). МУНТ обнаруживаются преимущественно в виде скоплений как в процессе взаимодействия с клеточной мембраной (см. рис. 8, б), так и после проникновения, при этом внутри клеток они локализованы в эндосомах (см. рис. 9, в). Агломераты и единичные ОУНТ визуализируются внутри клеток как в эндосомах (см. рис. 9, г), так и в цитоплазме (см. рис. 9, в).

При рассмотрении ПЭМ-изображений клеток A549, экспонированных ОУНТ, инвагинации клеточной мембраны не наблюдается; нет отчётливой картины момента взаимодействия ОУНТ с клетками. ОУНТ обнаруживаются в цитоплазме без тенденции к вакуолизации (рис. 10, в, г). МУНТ также обнаруживаются в цитоплазме в виде скоплений, в том числе вблизи ядерной мембраны (рис. 10, б).

Таким образом, изображения, полученные методом темнопольной микроскопии и ПЭМ, клеток BEAS-2B и A549, экспонированных УНТ, позволяют убедиться в проникновении ОУНТ и МУНТ в цитоплазму клеток.

Обсуждение

Цитотоксические эффекты при воздействии МУНТ и ОУНТ на культуру клеток бронхиального эпителия BEAS-2B оказались сопоставимыми. Подобные результаты получены и другими авторами [12, 13]. Цитотоксические эффекты ОУНТ и МУНТ не различались, однако отмечена разница

в проникновении УНТ в клетки: при визуализации взаимодействия УНТ с клетками с использованием ПЭМ обнаруживаются вакуолизованные скопления МУНТ в цитоплазме клеток, тогда как ОУНТ чаще представлены в виде единичных трубок или пучков во внутриклеточном содержимом. Такая же картина наблюдается и во внеклеточном пространстве: МУНТ оказываются более склонными к формированию визуально различимых скоплений. Различия в проникновении нанотрубок в клетки могут быть объяснены структурными особенностями: МУНТ имеют меньшую длину, а агломераты МУНТ, по данным ДСР, в 3–4 раза меньше по сравнению с ОУНТ, что облегчает их захват клетками [18–21]. Кроме того, могут иметь значение и свойства поверхности УНТ, определяющие взаимодействие нанотрубок друг с другом и с остальными веществами [32].

По данным других исследователей, размеры агломератов УНТ могут играть роль в проникновении нанотрубок в клетки и реализации цитотоксических эффектов [18–21]. Сравнительная оценка воздействия ОУНТ на клетки BEAS-2B продемонстрировала, что очищенные ОУНТ проявляют токсические свойства на более низких концентрациях по сравнению с неочищенными ОУНТ. Согласно морфометрическим характеристикам нанотрубок в культуральной среде BEGM, наружный диаметр неочищенных и очищенных ОУНТ сопоставим, однако агломераты очищенных ОУНТ в два раза меньше, чем неочищенных. Можно предположить, что металлические примеси обуславливают некоторую ригидность структуры, из-за чего очищенные ОУНТ оказываются более гибкими и способными образовывать компактные агломераты.

В случае клеток альвеолярного эпителия A549 МУНТ и оба типа ОУНТ не проявляли статистически значимого цитотоксического эффекта через 72 ч. Однако наблюдается тенденция к повышению уровня ЛДГ в клеточном супернатанте при воздействии МУНТ в концентрации 100 мкг/мл. Также обнаруживаются вакуолизованные скопления МУНТ в цитоплазме клеток, вблизи ядерной мембраны и во внутриклеточных органеллах, причём вакуоли могут занимать большую часть клетки. При воздействии неочищенных и очищенных ОУНТ той же концентрации на культуру клеток альвеолярного эпителия такого явления не наблюдается. Данные результаты могут быть связаны с механизмом токсичности МУНТ, реализуемым через повреждающее воздействие на мембраны чувствительных клеток.

Несмотря на отсутствие различий в цитотоксическом эффекте, очевидным становится разное поведение изучаемых МУНТ и ОУНТ при взаимодействии с клеткой. Отмеченное в настоящем исследовании накопление большого количества МУНТ в клетках может приводить к реализации хронических последствий и вызывать повреждения генетического материала [15, 33], что требует дальнейшего изучения.

В ходе исследования также показано, что наиболее подходящей моделью для изучения УНТ являются клеточная культура бронхиального эпителия человека BEAS-2B. Воздействие УНТ в тех же концентрациях в отношении клеток альвеолярного эпителия A549 не вызвало значимого снижения жизнеспособности клеток. Это согласуется с результатами проведённых ранее исследований по оценке токсичности МУНТ и ОУНТ на клеточных культурах BEAS-2B и A549, где авторы отмечали устойчивость клеток A549 к воздействию УНТ [34, 35]. Предположительно это может быть связано со способностью клеток альвеолярного эпителия секретировать сурфактант, богатый фосфолипидами, выработка которого является защитной реакцией клеток в ответ на воздействие инородного агента [36].

Необходимо отметить, что внесение УНТ в клетки осуществлялось в виде дисперсий, где обнаруживались как единичные нанотрубки, так и их агломераты, в то время как в воздухе рабочей зоны УНТ обнаруживаются преимущественно в виде агломератов [25]. Также в настоящем исследовании расчёт концентраций УНТ для внесения в клетки был основан на компьютерном моделировании. Проведение

экспериментов с оценкой нагрузки на лёгкие могло бы точнее оценить депонированные дозы УНТ в лёгких³. Дальнейшее изучение механизмов цитотоксического и генотоксического действия разных типов УНТ может способствовать выявлению особенностей воздействия МУНТ и ОУНТ на клетки дыхательной системы для разработки методологических подходов к безопасному использованию УНТ.

Заключение

Результаты исследования показали сходные цитотоксические эффекты при воздействии МУНТ и ОУНТ на клетки бронхиального и альвеолярного эпителия BEAS-2B и A549. Показано, что наиболее подходящей моделью для изучения УНТ являются клеточная культура бронхиального эпителия человека BEAS-2B. Клетки альвеолярного эпителия A549 оказались более устойчивы к действию УНТ, что проявлялось в отсутствии снижения жизнеспособности этих клеток и отсутствии признаков нарушения целостности клеточных мембран при действии всех изучаемых концентраций УНТ. Вероятно, это может быть связано со способностью клеток альвеолярного эпителия секретировать сурфактант. Данные MTS-теста и ЛДГ-теста свидетельствуют о токсичности неочищенных ОУНТ и МУНТ в диапазоне концентраций 50–200 мкг/мл и очищенных ОУНТ в диапазоне

25–200 мкг/мл в отношении клеток BEAS-2B. Данные, полученные методами темнопольной микроскопии и ПЭМ, позволяют убедиться в проникновении ОУНТ и МУНТ в цитоплазму клеток BEAS-2B и A549. При этом МУНТ чаще обнаруживаются во внутриклеточном содержимом в виде вакуолизованных скоплений, тогда как единичные и агломераты ОУНТ визуализируются в цитоплазме без тенденции к вакуолизации. Различия в проникновении УНТ в клетки могут быть объяснены структурными особенностями: агломераты МУНТ в несколько раз меньше по сравнению с ОУНТ, по данным ДСР, что облегчает их захват клетками. Накопление МУНТ в большом количестве в клетках может приводить к реализации хронических последствий и вызывать повреждения генетического материала, что требует дальнейшего изучения. Металлические примеси в составе неочищенных ОУНТ обуславливают ригидность структуры. Очищенные ОУНТ оказываются более гибкими и склонными к агломерации, что может обуславливать реализацию цитотоксических эффектов на более низких концентрациях. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии таких характеристик УНТ, как размер агломератов и наличие примесей, на процессы взаимодействия нанотрубок с клетками дыхательных путей и последующую реализацию токсических эффектов. Дальнейшее изучение механизмов цитотоксического и генотоксического действия разных типов УНТ поможет выявить особенности воздействия МУНТ и ОУНТ на клетки дыхательной системы и будет способствовать разработке методологических подходов к безопасному использованию УНТ.

³ OECD Guidance document on acute inhalation toxicity testing; 2009. Доступно: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd39.pdf>

Литература

(п.п. 1–9, 11–13, 15–27, 29, 31–36 см. References)

- Халиуллин Т.О., Кисин Е.Р., Мюррэй Р.Э., Залялов Р.Р., Шведова А.А., Фатхутдинова Л.М. Токсические эффекты углеродных нанотрубок в культурах клеток макрофагов и бронхиального эпителия. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2014; (1): 199–210.
- Тимербулатова Г.А., Фатхутдинова Л.М. Токсичность одностенных углеродных нанотрубок, исследованная на различных типах культур клеток (обзор современного состояния проблемы). *Российские нанотехнологии*. 2018; 13(5–6): 26–31.
- Тимербулатова Г.А., Димиев А.М., Хамидуллин Т.Л., Бойчук С.В., Дунаев П.Д., Фахруллин Р.Ф. и др. Диспергирование одностенных углеродных нанотрубок в биосовместимых средах. *Российские нанотехнологии*. 2020; 15(4): 461–9. <https://doi.org/10.1134/S1992722320040160>
- Чередниченко Ю.В., Евтюгин В.Г., Нигаматзянова Л.Р., Ахатова Ф.С., Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф. Синтез наночастиц серебра при помощи ультразвука и галлазита для создания нанокompозита с антибактериальными свойствами. *Российские нанотехнологии*. 2019; 14(9–10): 64–70. <https://doi.org/10.21517/1992-7223-2019-9-10-64-70>

References

- Venkataraman A., Amadi E.V., Chen Y., Papadopoulos C. Carbon nanotube assembly and integration for applications. *Nanoscale Res. Lett.* 2019; 14(1): 220. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3046-3>
- Chetyrkina M.R., Fedorov F.S., Nasibulin A.G. In vitro toxicity of carbon nanotubes: a systematic review. *RSC Adv.* 2022; 12(25): 16235–56. <https://doi.org/10.1039/d2ra02519a>
- Alshehri R., Ilyas A.M., Hasan A., Arnaout A., Ahmed F., Memic A. Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity. *J. Med. Chem.* 2016; 59(18): 8149–67. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b011770>
- Pietrojusti A., Stockmann-Juvala H., Lucaroni F., Savolainen K. Nanomaterial exposure, toxicity, and impact on human health. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2018; 10(5): e1513. <https://doi.org/10.1002/wnan.1513>
- Luanpitpong S., Wang L., Rojanasakul Y. The effects of carbon nanotubes on lung and dermal cellular behaviors. *Nanomedicine (Lond)*. 2014; 9(6): 895–912. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.42>
- Siegrist K.J., Reynolds S.H., Porter D.W., Mercer R.R., Bauer A.K., Lowry D., et al. Mitsui-7, heat-treated, and nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes elicit genotoxicity in human lung epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 2019; 16(1): 36. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0318-0>
- Lindberg H.K., Falck G.C., Singh R., Suhonen S., Järventaus H., Vanhala E., et al. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells *in vitro*. *Toxicol.* 2013; 313(1): 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.008>
- Haniu H., Saito N., Matsuda Y., Tsukahara T., Usui Y., Maruyama K., et al. Biological responses according to the shape and size of carbon nanotubes in BEAS-2B and MESO-1 cells. *Int. J. Nanomed.* 2014; 9: 1979–90. <https://doi.org/10.2147/IJN.S58661>
- Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39(5): 1378–83. <https://doi.org/10.1021/es0487291>
- Khaliullin T.O., Kisin E.R., Myurrey R.E., Zalyalov R.R., Shvedova A.A., Fatkhutdinova L.M. Toxic effects of carbon nanotubes in macrophage and bronchial epithelium cell cultures. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. 2014; (1): 199–210. (in Russian)
- Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M., Liu X., Williams Q.L. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines. *Sci. Total Environ.* 2010; 408(8): 1812–7. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.035>
- Murr L.E., Garza K.M., Soto K.F., Carrasco A., Powell T.G., Ramirez D.A., et al. Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2005; 2(1): 31–42. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005010031>
- Palomäki J., Karisola P., Pyllkänen L., Savolainen K., Alenius H. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicol.* 2010; 267(1–3): 125–31. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.10.034>
- Timerbulatova G.A., Fatkhutdinova L.M. Assessment of the toxicity of single-wall carbon nanotubes using different types of cell cultures: review of the current state of knowledge. *Rossiyskie nanotekhnologii*. 2018; 13(5–6): 240–5.
- Grosse Y., Loomis D., Kio Guyton K.Z., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., et al. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014; 15(13): 1427–8. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71109-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71109-X)
- Ghosh M., Murugadoss S., Janssen L., Cokic S., Mathysen C., Van Landuyt K., et al. Distinct autophagy-apoptosis related pathways activated by Multi-walled (NM 400) and Single-walled carbon nanotubes (NIST-SRM2483) in human bronchial epithelial (16HBE14o-) cells. *J. Hazard. Mater.* 2020; 387: 121691. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121691>

17. Caoduro C., Hervouet E., Girard-Thernier C., Gharbi T., Boulahdour H., Delage-Mourroux R., et al. Carbon nanotubes as gene carriers: Focus on internalization pathways related to functionalization and properties. *Acta Biomater.* 2017; 49: 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.013>
18. Kang B., Chang S., Dai Y., Yu D., Chen D. Cell response to carbon nanotubes: size-dependent intracellular uptake mechanism and subcellular fate. *Small.* 2010; 6(21): 2362–6. <https://doi.org/10.1002/sml.201001260>
19. Raffa V., Ciofani G., Nitodas S., Karachalios T., D'Alessandro D., Masini M., et al. Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells? *Carbon.* 2008; 46: 1600–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.06.053>
20. Han Y.G., Xu J., Li Z.G., Ren G.G., Yang Z. *In vitro* toxicity of multi-walled carbon nanotubes in C6 rat glioma cells. *Neurotoxicol.* 2012; 33(5): 1128–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.06.004>
21. Ema M., Takehara H., Naya M., Kataura H., Fujita K., Honda K. Length effects of single-walled carbon nanotubes on pulmonary toxicity after intratracheal instillation in rats. *J. Toxicol. Sci.* 2017; 42(3): 367–78. <https://doi.org/10.2131/jts.42.367>
22. Migliore L., Saracino D., Bonelli A., Colognato R., D'Errico M.R., Magrini A., et al. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 2010; 51(4): 294–303. <https://doi.org/10.1002/em.20545>
23. Ursini C.L., Cavallo D., Fresegna A.M., Ciervo A., Maiello R., Buresti G., et al. Differences in cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response of bronchial and alveolar human lung epithelial cells to pristine and COOH-functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 359506. <https://doi.org/10.1155/2014/359506>
24. Eldawud R., Wagner A., Dong C., Stueckle T.A., Rojanasakul Y., Dinu C.Z. Carbon nanotubes physicochemical properties influence the overall cellular behavior and fate. *NanoImpact.* 2018; 9: 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.10.006>
25. Guseva Canu I., Bateson T.F., Bouvard V., Debia M., Dion C., Savolainen K., et al. Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials: A review. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2016; 219(2): 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.12.005>
26. Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G., et al. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol. Sci.* 2006; 92(1): 5–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj130>
27. Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD v 3.04). Available at: <https://www.ara.com/products/multiple-path-particle-dosimetry-model-mppd-v-304>
28. Timerbulatova G.A., Dimiev A.M., Khamidullin T.L., Boychuk S.V., Dunaev P.D., Fakhruilin R.F., et al. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in biocompatible media. *Rossiyskie nanotekhnologii.* 2020; 15(4): 461–9. <https://doi.org/10.1134/S1992722320040160> (in Russian)
29. Davoren M., Herzog E., Casey A., Cottineau B., Li Y., Boraschi D. Endotoxin contamination: a key element in the interpretation of nanosafety studies. *Nanomed. Lond.* 2016; 11(3): 269. <https://doi.org/10.221/nm.15.19619>
30. Cherednichenko Yu.V., Evtuyugin V.G., Nigamatzyanova L.R., Akhatova F.S., Rozhina E.V., Fakhruilin R.F. Silver nanoparticle synthesis using ultrasound and halloysite to create a nanocomposite with antibacterial properties. *Rossiyskie nanotekhnologii.* 2019; 14 (9–10): 64–70. <https://doi.org/10.21517/1992-7223-2019-9-10-64-70> (in Russian)
31. Fakhruilin R., Nigamatzyanova L., Fakhruilina G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci. Total Environment.* 2021; 772: 145478. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145478>
32. Mohd Nurazzi N., Asyraf M.R.M., Khalina A., Abdullah N., Sabaruddin F.A., Kamarudin S.H., et al. Fabrication, functionalization, and application of carbon nanotube-reinforced polymer composite: an overview. *Polymers (Basel).* 2021; 13(7): 1047. <https://doi.org/10.3390/polym13071047>
33. Dong J., Ma Q. Suppression of basal and carbon nanotube-induced oxidative stress, inflammation and fibrosis in mouse lungs by Nrf2. *Nanotoxicol.* 2016; 10(6): 699–709. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1110758>
34. Gupta S.S., Singh K.P., Gupta S., Dusinska M., Rahman Q. Do carbon nanotubes and asbestos fibers exhibit common toxicity mechanisms? *Nanomaterials (Basel).* 2022; 12(10): 1708. <https://doi.org/10.3390/nano12101708>
35. Ursini C.L., Maiello R., Ciervo A., Fresegna A.M., Buresti G., Superti F., et al. Evaluation of uptake, cytotoxicity and inflammatory effects in respiratory cells exposed to pristine and -OH and -COOH functionalized multi-wall carbon nanotubes. *J. Appl. Toxicol.* 2016; 36(3): 394–403. <https://doi.org/10.1002/jat.3228>
36. Davoren M., Herzog E., Casey A., Cottineau B., Chambers G., Byrne H.J., et al. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol. In Vitro.* 2007; 21(3): 438–48. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.007>