

- ed. *The Northern Dimension of Global Problems: The First Results of the International Polar Year [Severnoe izmerenie global'nykh problem: pervyye itogi Mezhdunarodnogo polyarnogo goda]*. Moscow: Nauka; 2009: 164–73. (in Russian)
- Dorokhov R.N. Basic principles and perspectives for age-related somatic typification. *Teoriya i praktika fizicheskoy kul'tury*. 2000; (9): 10–2. (in Russian)
  - Grechkina L.I., Karandasheva V.O. Characteristics for the physical development indices demonstrated by adolescents born in Magadan. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2013; 118(3): 91–4. (in Russian)
  - Grechkina L.I., Karandasheva V.O. Tendencies in physical development observed in adolescent boys for the recent 35 years. *Novyye issledovaniya*. 2014; (1): 23–30. (in Russian)
  - Sukhanova I.V., Maksimov A.L. Modern tendencies of physical development and state of cardiovascular system of young male subjects in Magadan. *Gigiena i sanitariya*. 2015; 94(3): 83–6. (in Russian)

Поступила 30.11.15  
Принята к печати 13.05.16

## Профилактическая токсикология и гигиеническое нормирование

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 613.632:006

Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б.

### УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ: МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ *IN VIVO* (Обзор литературы)

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», 119121, Москва

*Статья содержит анализ и обобщение данных о механизмах токсического действия углеродных нанотрубок (УНТ) на организм и результатах токсикологической оценки УНТ при ингаляционном и пероральном путях поступления. Выявление клеточных и молекулярных механизмов токсичности УНТ позволяет обосновать список наиболее чувствительных биохимических маркеров токсичности, которые могли быть использованы для мониторинга вредного действия УНТ на производстве и послужить перспективными мишенями для соответствующих фармакологических и иммунофармакологических интервенций в целях специфической профилактики и терапии заболеваний, вызываемых УНТ. Значительный объем экспериментальных данных, полученных на моделях *in vivo* при ингаляционном пути поступления УНТ, позволяет осуществить в настоящее время их гигиеническое нормирование в воздухе рабочей зоны. Что же касается безопасных уровней при пероральном поступлении УНТ, то для их надежной оценки требуются дополнительные исследования. Поиск и отбор источников для обзора осуществлены с использованием открытых баз данных, включая (в порядке релевантности) PubMed, Scopus, Google Scholar и РИНЦ, за период с 2004 по 2016 г.*

**Ключевые слова:** углеродные нанотрубки; токсичность; биомаркеры; гигиеническое нормирование.

**Для цитирования:** Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б. Углеродные нанотрубки: механизмы действия, биологические маркеры и оценка токсичности *in vivo* (обзор литературы). *Гигиена и санитария*. 2017; 96(2): 176–186. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-2-176-186>

Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A., Riger N.A., Nikityuk D.B.

### CARBON NANOTUBES: MECHANISMS OF THE ACTION, BIOLOGICAL MARKERS AND EVALUATION OF THE (REVIEW OF LITERATURE)

Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, 109240, Russia

*The article contains the review and analysis of data on the mechanisms of the toxic action of carbon nanotubes (CNTs) on the body and available results of CNT toxicological evaluation after inhalation and oral routes of the action. Identification of cellular and molecular mechanisms of CNTs toxicity allows to justify the list of the most sensitive biochemical toxicity markers that could be used for monitoring the occupational effects of CNTs and serve as a promising target for the corresponding pharmacological and immunopharmacological interventions aimed on specific prophylaxis and therapy of diseases caused by CNT. A considerable amount of experimental data obtained *in vivo* on inhalation animal models allows to establish the hygienic standard for CNT in the air of the working area. As to safe levels of the oral route of CNT it needs further study for their reliable assessment. The search and selection of sources for the review was executed with the use of public databases, including (in order of relevance) PubMed, Scopus, Google Scholar, and RISC, for the period from 2004 to 2017.*

**Key words:** carbon nanotubes; toxicity; biological markers; hygienic standards

**For citation:** Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A., Riger N.A., Nikityuk D.B. Carbon nanotubes: mechanisms of the action, biological markers and evaluation of the (review of literature). *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2017; 96(2): 176–186. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-2-176-186>

**For correspondence:** Ivan V. Gmshinski, D. Sc., leading researcher of the laboratory of food toxicology and evaluation safety of nanotechnologies Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology. E-mail: [gmosh@ion.ru](mailto:gmosh@ion.ru)

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

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: 07.10.2016

Accepted: 07.11.2016

## Введение

Углеродные нанотрубки (УНТ) являются продуктом современных нанотехнологий, вызывающим исключительно большой интерес как в плане своих уникальных физико-химических свойств, так и перспектив практического применения в промышленности и медицине. О популярности УНТ как объектов научного исследования свидетельствует тот факт, что первая работа, в которой сообщается о синтезе УНТ [1], была процитирована по данным Google 39 890 раз по состоянию на 2015 г [2]. В настоящее время библиография по УНТ насчитывает многие десятки тысяч наименований. Только по вопросам их биологического действия, токсичности и перспектив биомедицинского применения, как показывают данные наукометрического тестирования с использованием наиболее популярной международной базы данных PubMed, число ежегодно публикуемых научных статей превысило 1000 в 2011 года и достигло 2500 в 2015 г.

УНТ являются крупнотоннажным продуктом нанотехнологического синтеза; по оценкам [3], их годовое производство в мире в 2015 г. составило от 3700 до 5700 т и может достичь 10 500–12 000 т в 2020 г. Ряд инновационных предприятий, специализирующихся по промышленному производству УНТ, функционируют в России. Потенциальные области применения УНТ в производстве потребительской продукции и медицине весьма обширны [4], что указывает на быстрое увеличение контакта человека с ними в ближайшее время.

Номенклатура УНТ, выпускаемых промышленностью, базируется на числе их стенок, т. е. коаксиальных цилиндрических слоев графена, образующих трубку. Выделяют одностенные (ОУНТ), олигостенные (2–3 слоя) и многостенные (МУНТ) нанотрубки [5]. Металлическими примесями в составе УНТ (в первую очередь ОУНТ) являются переходные металлы, в частности медь, железо, никель и иттрий, наличие которых следует учитывать при сопоставлении результатов исследований их биологического действия.

Помимо числа слоев, теоретически важной характеристикой УНТ является способ замыкания графенового слоя в цилиндр, который может быть прямым («кресельным»), зигзагообразным или спиральным [5], а также наличие в УНТ открытых или закрытых (замкнутых) концов. Однако данные характеристики редко приводятся в спецификациях на УНТ, применяемых в биологических исследованиях, и их влияние на биологические свойства УНТ недостаточно изучены.

УНТ (особенно МУНТ) представляют собой один из самых популярных (сравнимых только с наночастицами серебра и диоксида титана) объектов нанотоксикологических исследований. Обобщению большого числа ранних работ (до 2010 г.) по токсичности УНТ (в частности, для водных и почвенных организмов) посвящен ряд обзорных статей [6–9]. Применительно к действию на теплокровные организмы наиболее подробно исследована токсичность УНТ при ингаляции (см. обзоры [8, 9]). Возможные неблагоприятные эффекты, связанные с другими сценариями экспозиции УНТ (через кожу, желудочно-кишечный тракт, обонятельный эпителий), освещаются в литературе в значительно меньших объемах.

В задачи настоящей статьи входят анализ и обобщение данных о механизмах токсического действия УНТ на организм, биологических маркерах токсичности (в частности, изучаемых с применением «омик»-технологий) и результатах токсикологической оценки УНТ при ингаляционном и пероральном путях поступления.

## Клеточные и молекулярные механизмы токсичности УНТ

Основной методической проблемой, возникающей при изучении клеточных и молекулярных механизмов биологического действия УНТ, является их практически полная нерастворимость в воде и, следовательно, необходимость использования особых методик получения дисперсий УНТ, стабильных в течение длительного времени. Диспергирование в биологических

жидкостях может сопровождаться адсорбцией макромолекул, в частности белков, на поверхности УНТ, что может повлиять на скорость захвата клетками [10].

При оценке цитотоксического действия УНТ ключевым фактором является способность клеток связывать их на своей мембране и затем поглощать. Эти процессы во многом зависят от числа слоев УНТ, их длины, спутанности, степени агрегации и поверхностных свойств. На основании учета этих особенностей была предложена математическая модель, описывающая зависимость между длиной ОУНТ и степенью их захвата клетками *in vitro* [11].

Данные о способности МУНТ проникать в клетки были получены на большом числе клеточных линий. В частности, МУНТ не захватывались клетками карциномы легкого человека A549, но образовывали плотные агломераты на их наружной мембране, провоцируя запуск механизмов апоптоза [12]. В отличие от этого в клетках BEAS-2B и MESO-1, выделенных из опухоли человека, цитотоксическое влияние МУНТ проявлялось после поглощения их клетками [13]. Внутриклеточное распределение МУНТ в клетках гепатокарциномы человека Hep2G по данным конфокальной микроскопии с Раман-эффектом варьировало в зависимости от наличия у них функциональной модификации и полимерного покрытия [14]. Механизм захвата МУНТ клетками на первой стадии включает распознавание их концевых структур, ввиду чего МУНТ с открытыми или закрытыми терминальными участками могут различаться по своим биокинетическим характеристикам [15]. С другой стороны, на биодоступность МУНТ влияет наличие на них полимерных покрытий [16]. По данным работы [17], МУНТ проникали в клетки эпидермальных кератиноцитов. Механизмы клеточного поглощения УНТ продолжают активно обсуждаться в литературе [18–20]. Подчеркивается, что физико-химические свойства УНТ, а именно их длина, толщина, степень агрегации, наличие функциональных групп, являются факторами, определяющими проникновение в клетку. Так, фагоцитоз или пиноцитоз является основным путем захвата крупных агрегатов, пучков, кластеров УНТ и даже единичных НТ длиной более 1 мкм, спутанных в клубки [21]. В особенности этот механизм характерен, по-видимому, для немодифицированных УНТ. Опосредуемый мембранной рецепцией эндоцитоз рассматривается как механизм захвата клетками УНТ, образующими надмолекулярные структуры (в основном это УНТ с боковыми функциональными группами). Простая трансмембранная диффузия может быть характерна для коротких обломков (длиной порядка 100 нм или менее) УНТ, которые в силу своей гидрофобности способны проникать через липидный бислой.

Определяемая в эксперименте *in vitro* цитотоксичность МУНТ варьирует в широких пределах в зависимости от их длины, диаметра, а также линии клеток [22]. С использованием линии эпителиальных клеток карциномы легких A549 и моноцитной линии острого монобластного лейкоза THP-1 показано, что количественная оценка токсичности зависит от множества факторов, включающих плотность культуры клеток, способ получения и дисперсность УНТ, используемую культуральную среду и носитель наноматериала [23]. Данные этой работы позволяют понять, почему результаты разных авторов, полученные на сходных клеточных моделях, могут настолько сильно различаться.

Механическое повреждение жесткими УНТ мембран клеток различных типов способно приводить к явлениям «мембранного стресса» [24, 25]. Вследствие этого возникает состояние «незавершенного фагоцитоза», когда макрофагальная клетка не способна полностью поглотить нанотрубку, что приводит к усиленной продукции провоспалительных цитокинов поврежденными клетками, развитию воспаления и индукции апоптоза с последующим формированием гранулем. В том случае, когда фагоцитированные нанотрубки представлены компактными спутанными клубками, последствия их захвата фагоцитирующими клетками могут быть менее неблагоприятными [26].

В качестве одного из главных механизмов цитотоксического действия УНТ в ранних работах рассматривали индукцию оксидантного стресса [27–29]. В частности, было установлено, что ОУНТ способны вызывать окислительный стресс и провоспалительный ответ в кератиноцитах человека *in vitro* [30]. Показано, что ОУНТ способны активировать нейтрофилы крови челове-

Для корреспонденции: Гмошинский Иван Всеволодович, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». E-mail: [gmosh@ion.ru](mailto:gmosh@ion.ru)

ка с увеличением выработки супероксид-аниона и TNF- $\alpha$  [31]. На величину цитотоксичности ОУНТ в отношении эпителиальных клеток человека влияли как уровни содержащихся в препарате металлических катализаторов, так и в наибольшей мере степень поверхностной окислительной модификации [32].

Считается, что основным следствием развития окислительного стресса под действием УНТ является нарушение деятельности генетического аппарата клетки с последующей ее гибелью. Окислительное повреждение ДНК в клетках мышечных макрофагоподобных клеток RAW264.7 при воздействии ОУНТ и МУНТ в концентрации от 0,01 до 100 мг/мл было выявлено с использованием метода ДНК-комет [33]. Мониторинг в клетках этой же линии реакционно-способных кислородсодержащих молекул показал, что скорость их образования сопоставима при действии МУНТ и волокон асбеста, однако максимум их образования в случае МУНТ достигается на 0,5–4 ч раньше, чем при воздействии асбеста [34].

Аналогично МУНТ вызывали усиление повреждения ДНК и апоптоза в фибробластах человека [35], а также нарушение структуры ДНК и снижение жизнеспособности в остеоцитах человека D384 и клетках карциномы легких человека A549 по данным окрашивания кальцеин/пропидиум йодидом и тетразолиевого (МТТ) теста [36].

Обобщение на основании метаанализа результатов 21 исследования УНТ *in vitro*, проведенного до 2007 г., позволило сделать вывод о том, что доказательность роли накопления реакционноспособных форм кислорода и индукции апоптоза в их токсических эффектах соответствует уровню «до некоторой степени вероятный» [37].

На роль каталитического ингибирования биохимических процессов в эффектах токсичности УНТ указывается в работе [17]. Цитофизиологическими методами было показано, что ОУНТ способны блокировать калиевые каналы клеток; их активность в этой системе была значительно выше, чем у фуллеренов [38]. ОУНТ способны вызывать повреждение митохондриального аппарата эпителиальных клеток человека линии KB через взаимодействие с цитохромом С и с нарушением переноса электронов в дыхательной цепи [39].

Дальнейшее развитие представлений о клеточных и молекулярных механизмах токсичности УНТ стало возможным на основе изучения их влияния на специфические внутриклеточные сигнальные механизмы. ОУНТ, несущие карбоксильные группы, взаимодействуют с белками киназного каскада Akt-TSC1/2-mTOR, вызывающими процессы аутофагии в альвеолярных эпителиальных клетках A549 [40]. Важную роль в воздействии УНТ на клетки млекопитающих играет модуляция таких систем, как сигнальные каскады MAPK, p53, комплекса NLRP3 инфламмосом, NF- $\kappa$ B и TGF- $\beta$ 1 [41]. Воздействие МУНТ на культуры линии клеток бронхолегочного эпителия НВЕ способствовало индукции в них пироптоза за счет активации комплекса NLRP3 инфламмосом [42]. Основными звеньями этого процесса были генерация свободнорадикальных соединений, активация каспазы-1 и катепсина В, секреция провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-18, IL-8. В легочных фибробластах, обработанных культуральной средой, кондиционированной такими клетками, отмечалась экспрессия мРНК маркеров фиброза TIMP-1, остеопонтина, проколлагена-1 и тенасцина-С. В совокупности полученные данные указывают на участие сигнального пути комплекса NLRP3-инфламмосом в развитии легочного фиброза под действием ингалируемых МУНТ.

Следствием активации каскада NLRP3-инфламмосом является запуск процессов острого воспаления, проявляющегося в изменении цитокинового профиля. Так, было обнаружено, что при воздействии МУНТ на культуры макрофагов, предварительно активированных липополисахаридом, индуцировалась секреция IL-1 $\beta$  [43]. Этот механизм подавлялся при добавлении IL-4 и IL-13; под действием ингибиторов STAT6 секреция IL-1 $\beta$  восстанавливалась. Авторы сделали вывод, что активация инфламмосом, вызванная МУНТ, осуществляется посредством зависимой от STAT6 отрицательной регуляции прокаспазы 1, а продуцируемые Th2 противовоспалительные цитокины являются супрессорами указанного процесса. Эти результаты важны для интерпретации известного из литературы проаллергенного действия МУНТ. Способность МУНТ активировать в культуре

фибробластов секрецию провоспалительных и профибротических цитокинов, в частности IL-1 $\beta$  и TGF- $\beta$ , была подтверждена в работе по изучению механизмов формирования фиброзных изменений в тканях легких [44], причем, как и для фагоцитирующих клеток, эти процессы были тесно связаны с образованием свободнорадикальных соединений и последующей активацией каскадов NF- $\kappa$ B или NLRP3-инфламмосом.

На критическую роль IL-1 в развитии воспалительной реакции и фиброза, вызываемых УНТ, указывают результаты исследования, в котором были использованы мыши нокаутной линии IL-1R-/- (с полной блокадой гена рецептора IL-1) [45], у которых не было выявлено никаких признаков фиброза легких при ингалинии даже очень высоких доз МУНТ.

В развитии под влиянием МУНТ воспалительных и фибротических процессов в легочной ткани важная регуляторная роль отводится также IL-33 – одному из представителей суперсемейства IL-1-родственных белков [46, 47]. В частности, был показан значительно более высокий уровень воспалительной реакции у мышей дикого типа в сравнении с нокаутными по гену IL-33 животными после однократного интратрахеального введения МУНТ. Обобщение полученных данных позволило дополнить представление об иммунопатологическом механизме токсичности УНТ, опосредуемом взаимодействием IL-33 с его рецептором ST2, экспрессируемым на мембранах тучных клеток.

Под воздействием МУНТ значимо повышается активность группы генов *LC3B*, участвующих в аутофагии, что приводит к образованию аутофагосом в клетках и апоптозу [48]. Активация под воздействием ОУНТ p38 MAPK (митогенактивируемой протеинкиназы) увеличивает экспрессию мРНК хемокинов TGF- $\beta$ 1 и VEGF, участвующих в регуляции пролиферации фибробластов, продукции коллагена и развитии фиброза тканей [49].

При инкубации клеток бронхиального эпителия человека с МУНТ длиной менее 5 мкм выявлены стимуляция секреции TGF- $\beta$ , активация Akt (протеинкиназы В) и ингибирование GSK-3 $\beta$  (киназы гликогенсинтазы), что приводило к накоплению SNAI1-1 (транскрипционный рецептор типа «цинковые пальцы») в ядре. В результате этого запускалась программа эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), рассматриваемого как начальный этап развития фиброза легочной ткани [50].

Роль рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами семейства PPAR- $\gamma$ , в защите от формирования фиброза, провоцируемого МУНТ, была изучена на мышах с нокаутом гена PPAR- $\gamma$  [51]. В отличие от животных дикого типа эти мыши были значительно более склонны к развитию воспаления с образованием гранулем даже после однократного интратрахеального введения 100 мкг МУНТ. Это сочеталось у них с повышенной экспрессией мРНК для остеопонтина, CCL2 и интерферона- $\gamma$ , что может свидетельствовать о большей остроте воспалительного ответа. Другим фактором, участвующим в защите ткани легких от повреждающего действия УНТ, является экспрессируемый в легочном эпителии секретируемый белок SPLUNC-1 с молекулярной массой 25 кД [52].

### Биомаркеры токсического действия

Поиск специфических и информативных биомаркеров токсического действия УНТ представляет большой интерес, во-первых, с позиций установления звеньев патологического процесса, являющихся потенциальными объектами фармакологической или диетологической коррекции, и, во-вторых, осуществления мониторинга возможного неблагоприятного действия УНТ на человека [53].

#### Специфические биомаркеры

В ряде работ в качестве биомаркеров токсического действия УНТ рассматриваются преимущественно продукты ПОЛ и ферменты, освобождающиеся в результате повреждения клеток различных типов. К примеру, вводимые внутривенно мышам линии Swiss-Webster химически модифицированные ОУНТ в дозах 0,25; 0,5 или 0,75 мг/кг вызывали морфологические изменения в печени в сочетании с повышением в крови активности аминотрансфераз, щелочной фосфатазы и продуктов ПОЛ [54]. Оценка влияния МУНТ и ОУНТ на культуры клеток 2 типов – мышечные макрофагоподобные клетки RAW 264.7 и мышечные клетки бронхиального эпителия BEAS-2B – в исследовании [53] показала, что ОУНТ в наибольшей степени

вливают на макрофаги, вызывая гибель клеток, снижение пула восстановленного глутатиона (GSH) и возрастание активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). МУНТ не вызывали гибель макрофагов, однако их действие сопровождалось снижением пула GSH и повышением высвобождения ЛДГ. В отличие от макрофагов клетки бронхиального эпителия были в этом исследовании устойчивы к действию как МУНТ, так и ОУНТ и лишь маргинально реагировали снижением уровня GSH.

Поскольку в основе действия УНТ на организм лежат иммунопатологические механизмы, очевидно, что ранними и высокочувствительными маркерами такого действия могут быть экспрессия и уровни провоспалительных цитокинов и хемокинов. Так, было обнаружено [55], что инкубация эпидермальных кератиноцитов с МУНТ сопровождалась увеличением секреции провоспалительного IL-8. ОУНТ при интратрахеальном введении или ингаляции у крыс вызывали экспрессию мРНК различных провоспалительных цитокинов, причем эффект ОУНТ был более выражен по сравнению с наночастицами сажи, золота, квантовыми точками и фуллеренами [56]. При аспирации МУНТ в дыхательные пути самок мышей C57Bl в бронхоальвеолярном лаваже отмечалось увеличение уровня TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , а также общего белка, сурфактанта-D (SP-D) и активности ЛДГ [57]. Интраназальное введение мышам суспензии двухслойных УНТ вызывало повышение в плазме животных уровней TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IGF, G-CSF, VEGF и лептина [58].

Исследования *in vitro* показали, что захват МУНТ макрофагами линии THP-1 (но не мезотелиальными клетками) сопровождался усилением секреции IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8 [59].

Клиническое значение про- и противовоспалительных цитокинов как чувствительных биомаркеров токсического действия УНТ активно исследуют у лиц, контактирующих с аэрозолями МУНТ на производстве [60, 61]. Было показано, что в мокроте работников, занятых на производстве МУНТ, повышаются уровни IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , а также муциноподобного гликопротеина KL-6. Наиболее чувствительным маркером экспозиции к МУНТ в сыворотке крови был хемокин TGF- $\beta$ . К аналогичным результатам привело исследование биомаркеров ингаляционной токсичности в эксперименте на мышах C57Bl/6. По мнению авторов, полученные данные указывают на актуальность мониторинга экспозиции МУНТ на рабочем месте с использованием указанных биомаркеров. На важную роль TGF- $\beta$  в качестве маркера фиброза, вызываемого ОУНТ, указывают также данные исследования [62]. Выработка этого хемокина фибробластами положительно коррелировала с длиной ОУНТ, при том что более длинные УНТ обладали на данной модели большим фиброгенным потенциалом.

В экспериментах по изучению изменений биомаркеров ткани головного мозга при интраназальном введении ОУНТ крысам выявлена повышенная экспрессия цитокинов с профилем как Th1-, так и Th2-типа. Причем в задней части мозга преимущественно активировался синтез цитокинов, характерный для Th1 ответа, а в передней – для Th2. Одновременно методом ОТ-ПЦР показано, что введение ОУНТ не изменяло экспрессию во всех исследованных структурах мозга транскрипционного фактора *c-fos*, являющегося потенциальным протоонкогеном [63, 64].

Значение в токсичности МУНТ группы биомаркеров, связанных с механизмом развития воспалительной реакции, опосредуемой каскадом NLRP3 инфламмосом, было изучено на мышах C57Bl/6, которым интратрахеально вводили нативные либо карбоксилированные МУНТ [65]. Отмечено повышение уровней IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, а также активности катепсина В, ЛДГ и общего содержания альбумина в бронхоальвеолярном лаваже. Выявлена тесная взаимосвязь между токсичностью различных форм МУНТ и активацией каскада NLRP3 инфламмосом в легочной ткани. На уровне транскрипции процессы, опосредуемые NLRP3, регулируются ядерным белком HMGB1. Его роль в качестве маркера активации иммунной реакции под действием МУНТ была охарактеризована у мышей с нокаутом гена каспазы 1 [66].

### Роль транскриптомных и протеомных технологий

В последнее время наряду с изучением отдельных биомаркеров для оценки токсического действия УНТ начинают продуктивно использовать так называемые омик-технологии, в первую очередь, транскриптомика и протеомика. Эти современные экс-

периментальные подходы сочетают возможности одновременного выявления и количественного определения сотен и тысяч видов молекул РНК и белков и биоинформатического анализа значимости их множественных изменений (так называемые большие данные, *big data* [67]).

Одним из первых примеров применения транскриптомики при оценке токсического действия УНТ является работа [68], в которой фибробласты кожи подвергались в культуре воздействию МУНТ (0,06–0,6 мкг/мл) и углеродных «наноолигонов» (представляющих собой промежуточную форму между укороченными закрытыми УНТ и фуллеренами). С использованием ОТ-ПЦР и анализа на микрочипе выявлено изменение уровня экспрессии 216 генов, включая задействованные в сигнальных каскадах интерферона и p38/ERK-MAPK, и проанализирована возможная значимость этих изменений в нарушении клеточного цикла, индукции апоптоза или некроза. В дальнейшем методом анализа ДНК-чипов, включающих 54 675 генов, выявлены изменения в экспрессии в 14 294 генах в эпителиальных клетках бронхов человека под действием ОУНТ [69]. Гены, транскрипция которых являлась мишенью данного воздействия, были ассоциированы с клеточным циклом, клеточной адгезией и подвижностью, передачей клеточных сигналов, регуляцией выживаемости и апоптоза.

Транскриптомное профилирование было применено при изучении воздействия МУНТ на мышей при однократном интратрахеальном введении в дозах от 18 до 162 мкг и в культуре мышинных эпителиальных клеток легких линии FE1 в концентрации от 12,5 до 100 мкг/мл [70]. При этом удалось выявить значительные различия в профилях экспрессии генов, зависящие не только от применяемой экспериментальной модели, но и от дозы наноматериала. Так, *in vivo* варьировала экспрессия 1635 генов, из которых только 46 реагировали при всех трех (низкой, средней и высокой) дозах наноматериала. По своей функции большинство этих генов были связаны с ответом белков острой фазы, миграцией клеток иммунной системы, реакциями гиперчувствительности и процессами гемопоэза. В системе *in vitro* наблюдалась дифференциальная экспрессия 1931 гена, в том числе 565 при всех изученных концентрациях. Функции большинства генов, экспрессия которых изменялась, были связаны с АНР – сигнальным путем рецепции ароматических углеводов, сопряженным с системой окисления GSH, реакциями белков острой фазы, биосинтезом холестерина, активацией фиброза и опосредованной NRF2 реакцией на окислительный стресс. На основе полученных данных были построены «генетические сети» воздействия МУНТ.

Результаты исследования изменений в профилях дифференциальной экспрессии генов в клетках макрофагоподобного фенотипа THP-1, бронхолегочного (HT29-MTX) и кишечного (Caco2) эпителия в зависимости от длительности инкубации (60 мин и 24 ч) с МУНТ или наночастицами диоксида титана оказались уникальными для каждой из указанных клеточных линий [71]. На основании полученных данных транскриптомного и протеомного анализа не удалось выявить гены, экспрессируемые одинаковым образом во всех трех клеточных линиях. Наиболее характерные изменения в экспрессии, наблюдавшиеся под действием МУНТ, распространялись на гены, отвечающие за пролиферацию клеток, репарацию ДНК и подавление апоптоза. Профили генной экспрессии под действием МУНТ и наночастиц диоксида титана также значительно различались, что свидетельствует, по мнению авторов, о принципиально различных механизмах, лежащих в основе их токсичности.

Изменения в экспрессии генов в клетках легких крысы были охарактеризованы в разные периоды времени (от 90 сут до 1 года и более) после однократного интратрахеального введения ОУНТ в дозе 0,2–0,4 мг [72]. При этом обнаружены стойкие изменения в экспрессии значительного числа генов, предположительно участвующих в хронизации процесса формирования гранулем. Полнотранскриптомное профилирование легочной ткани мышей C57Bl/6 после однократного фарингеального введения МУНТ в дозах от 10 до 80 мкг в интервале времени от 1 до 56 дней после введения позволило построить «молекулярную сигнальную цепь», отражающую роль в токсическом действии как экспрессии мРНК, так и некодирующей РНК, представленной в первую очередь многочисленными

микро-РНК (miRs) [73]. Было идентифицировано несколько miRs, являющихся, по-видимому, информативными биомаркерами индуцируемого МУНТ легочного воспаления и фиброза на ранних стадиях патологического процесса. На важную роль miRs в патологии, вызываемой МУНТ, указывают данные работы [74], в которой мышей линии B6C3F1 подвергали ингаляции наноматериала в дозе 5 мг/м<sup>3</sup> в течение 15 сут на фоне внутрибрюшинного введения сильного мутагена – метилхолантрена. Глобальное профилирование мРНК и miRs в цельной крови указало, в числе прочих эффектов на значимость *fcrl5* и *miR-122-5p* как маркеров гиперплазии, *mtbfd2* и *miR-206-3p* – фиброза, *fam178a* и *miR-130a-3p* – бронхоальвеолярной аденомы, *il7i* и *miR-210-3p* – бронхоальвеолярной аденокарциномы при данном сочетанном воздействии.

Обобщение серии работ по полнотранскриптомному профилированию биосубстратов от мышей, экспонированных МУНТ через дыхательные пути, было выполнено в метаанализе [75] с оценкой роли транскриптомных маркеров в установлении пороговых доз токсического воздействия наноматериала. В результате показано, что при этом могут быть получены оценки для пороговых доз (14–30,4 мкг/мышь при однократном введении различных МУНТ), близкие к полученным исследователями US NIOSH с использованием традиционных токсикологических методов (морфология внутренних органов, биохимические маркеры крови, канцерогенез). В другом метаанализе [76] обобщены данные 7 исследований транскриптомных маркеров токсичности УНТ, а также наночастиц углеродной сажи и диоксида титана. В результате выявлено 2 альтернативных кластера чувствительных генов, один из которых был характерен для воздействия УНТ, а другой – наночастиц TiO<sub>2</sub>.

Одним из первых примеров использования транскриптомных маркеров в клинической оценке токсического действия УНТ является работа, в которой глобальное профилирование матричной и некодирующей РНК проведено в биосубстратах лиц, профессионально экспонированных МУНТ в течение не менее 6 мес в условиях реального производства [77]. В результате был определен набор биомаркеров, представляющих собой по преимуществу miRs, мишенями для воздействия которых являлись гены, участвующие в регуляции клеточного цикла, пролиферации и апоптоза. Была построена «сигнальная сеть» транскриптомных биомаркеров, отражающая способность МУНТ вызывать эффекты легочной и сердечно-сосудистой токсичности, а также оказывать потенциальное канцерогенное действие.

Протеомные исследования биологических эффектов УНТ начаты в 2006 г., когда было впервые показано, что МУНТ изменяют профиль белков в культивируемых кератиноцитах человека [78]. С использованием монобластных клеток лейкомии человека U937 было выявлено появление от 20 до 37 новых протеомных пятен в зависимости от структуры воздействующих МУНТ [79]. Изучение влияния МУНТ на протеом макрофаго-подобных клеток линии RAW264 [80] показало наличие по меньшей мере 13 белковых пятен с характерной экспрессией, зависящей от структуры МУНТ. Функции этих белков были связаны с индукцией апоптоза, связыванием кальция, регуляцией клеточного цикла, синтезом ДНК, поддержанием структуры белков и энергетическим обменом. Это согласуется с данными о биохимических механизмах воздействия УНТ, рассмотренных в предыдущем разделе.

Исследование воздействия МУНТ в дозе 30 мкг/мл в течение 24 ч на клетки альвеолярного эпителия A549 выявило изменения в экспрессии 106 белков, из которых 52 были идентифицированы методом масс-спектрометрии [81]. Обнаруженные биомаркеры были функционально вовлечены в регуляцию клеточной пролиферации, ответа на стрессовые воздействия и формирование цитоскелета. Особенно подверженной воздействию МУНТ в данном эксперименте была экспрессия актлина. Считается, что возрастание содержания этого белка может внести вклад в усиление миграции поврежденных наноматериалом клеток.

В бронхоальвеолярном лаваже мышей после ингаляции нативных либо модифицированных Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> МУНТ протеомный анализ с использованием ВЭЖХ-танDEMной масс-спектрометрии позволил идентифицировать в общей сложности 465 белков, среди которых достоверные изменения в экспрессии выявлены для 27 под воздействием нативных и для 13 под воздействием

модифицированных МУНТ [82]. Идентификация этих белков позволила предположить, что некоторые из них играют роль в воспалении и иммунном ответе.

Обзор ряда других ранних исследований по воздействию различных нанообъектов на протеомный профиль представлен в работе [83].

В последнее время возможности протеомных исследований в нанотоксикологии значительно возросли в связи со внедрением методов биоинформатики. Так, при обработке эпителиальных клеток бронхов человека линии Calu-3 ОУНТ или МУНТ в концентрации 10 мкг/мл или 100 нг/мл профили экспрессии белков оценивали методом прямой масс-спектрометрии, не используя метки (LFQ-MS), дополненным биоинформатическим анализом избирательности метаболических путей (IPA) [84]. Парадоксальным образом при высокой дозе МУНТ и ОУНТ были выявлены изменения в экспрессии только 8 и 13 белков, соответственно, тогда как при низкой дозе обоих наноматериалов число таких белков составляло несколько сотен. Всего выявлена 231 форма белков, изменения в экспрессии которых под действием МУНТ и ОУНТ имели одинаковую направленность. Биоинформатический анализ позволил соотнести выявленные протеомные маркеры с процессами некроза и апоптоза, межклеточной передачи сигнала, контактного взаимодействия клеток, пролиферации, противомикробной резистентности, транспорта макромолекул и синтеза белка. Кластеризация протеомных биомаркеров с построением биоинформатических сетей показала, что ряд белков неизменно оказывался в их центре. Это было характерно для кадгерина 1 (CDH1), STAT1, белка адгезионных клеточных контактов плакоглобина и фактора PycARD. Указанные белки рассматриваются авторами как ключевые биомаркеры токсического действия УНТ. В другой работе этой же группы исследователей [85] методом LFQ-MS были изучены 2282 индивидуальных белка в клетках эпителия желудочно-кишечного тракта, обработанных ОУНТ и МУНТ с различной модификацией. Дифференциальная экспрессия выявлена для 428 белков, причем ее профиль зависел как от химического состава УНТ, так и от их агрегативной стабильности. Как и в предыдущей работе, число затронутых воздействием УНТ протеомных маркеров было большим при низкой, чем при высокой дозе.

## Токсичность УНТ

### *Ингаляционная токсичность*

Ингаляционный путь поступления УНТ в организм человека рассматривается в качестве приоритетного [86], что связано с значительной способностью к образованию аэрозолей на разных стадиях их «жизненного цикла» [87]. Ввиду этого работы, в которых осуществляется оценка ингаляционной токсичности УНТ, преобладают в общем объеме токсикологической литературы, относящейся к данным наноматериалам [88, 89].

Основными моделями, применяемыми при изучении ингаляционной токсичности УНТ, являются, во-первых, интратрахеальное (или интрафарингеальное) введение дисперсий УНТ в жидкости и, во-вторых, экспозиция аэрозолем в затравочных камерах или с использованием ингаляционных масок. Второй способ более трудоемок и требует использования аэрозольных генераторов; однако он позволяет гарантировать соответствующие физико-химического состояния УНТ ситуации ингаляционной экспозиции на производстве, а также позволяет с большей надежностью решить вопрос дозиметрии УНТ [87]. Кроме того, имеются данные, что характер и интенсивность токсических реакций на УНТ при их ингаляции и прямом введении в дыхательные пути могут существенно различаться [90].

Уже в первых исследованиях по данной тематике, относящихся к середине 2000-х годов, было показано, что при ингаляции мышами максимально очищенных от примесей металлов ОУНТ развиваются воспаление и интерстициальный фиброз в легких [91, 92].

Через 7 и 90 дней после интратрахеального введения крысам и мышам ОУНТ выявлено наличие эпителиоидной гранулемы и интерстициального воспаления в легких [93]. Токсические дозы ОУНТ составили для мышей от 0,1 до 0,5 мг, что было значительно ниже соответствующих доз графитовой пыли. По данным [94], ОУНТ вызывали в легких мышей необычайно сильное и острое воспаление и быстрое последующее развитие фиброза

и гранулам. В этих же экспериментах близкие по среднему размеру к единичным ОУНТ наночастицы углеродной сажи (14 нм) и диоксида кремния (2,1 мкм) вызывали те же последствия, но с существенно меньшей интенсивностью. В исследовании [95] токсичность ОУНТ при введении мышам была максимальной в сравнении с МУНТ, нановолокнами крокидолитового асбеста и наночастицами углеродной сажи.

В исследовании на крысах [96] была изучена острая ингаляционная токсичность карбоксилированных ОУНТ различной длины в сравнении с эталонным токсикантом – кварцевой пылью с размером частиц около 5 мкм. Показано, что при однократном интратрахеальном введении ОУНТ в максимальной испытанной дозе 25 мг/кг вызывают обратимую воспалительную реакцию в легких на уровне, близком к воздействию кварца в дозе 250 мг/кг. Результаты позволили отнести оба испытанных образца карбоксилированных ОУНТ к веществам 3-го класса опасности по ГОСТ 12.1.007–76 по острой ингаляционной токсичности.

Обзор ранних исследований по токсичности ОУНТ при их интратрахеальном или фарингеальном введении грызунам представлен в работе [97]. Анализируя выявленные токсические эффекты в связи с наличием в ОУНТ металлических примесей, авторы заключают, что нанотрубки могут быть опасны для здоровья человека, однако неясно, определяется ли эта опасность углеродистым материалом ОУНТ самим по себе или указанными примесями.

В ряде работ была изучена токсичность ОУНТ при многократном введении в респираторный тракт. Интратрахеальное введение двух образцов ОУНТ самцам и самкам крыс в течение 90 сут применялось в исследовании [72]. Оценка маркеров воспаления, включая MIP-1a, в бронхоальвеолярном лаваже, наряду с данными транскриптомного анализа, позволила выявить признаки воспаления легочной ткани. Реакция была более выраженной в ответ на образец ОУНТ, образующий самые тонкие тяжки из скрученных нанотрубок.

В исследовании [98] были сопоставлены реакции мышей на ингаляцию или интрафарингеальное введение ОУНТ, углеродных нановолокон и асбеста в течение 4 сут. Отмечено развитие лимфаденита, хронической бронхопневмонии, переходящей в фиброз, причем ОУНТ были наиболее фиброгенными. При воздействии ОУНТ наблюдалось увеличение частот мутации онкогена c-Ras. Экспонированных ОУНТ животных наблюдали далее в течение 1 года в целях выявления канцерогенеза, однако развитие опухолей не было выявлено.

Одной из первых работ, в которых была установлена токсичность МУНТ для легочной ткани при ингаляции и интратрахеальном введении, было исследование [99], выполненное на мышах. Токсичность МУНТ при фарингеальном введении была выявлена в дозах от 1 до 4 мг/кг [100]. Отмечали инфильтрацию лимфоцитов, образование гранул, повреждение ткани и снижение функции внешнего дыхания, оцениваемой у анестезированных животных с использованием системы «Flexivent». Протеомные сдвиги в организме животных включали изменение в уровне ряда хемокинов, цитокинов и белков острой фазы.

Токсичность карбоксилированных МУНТ при однократной интрафарингеальном введении в дозе 2 мг/кг не была выявлена [101]. При этом токсичность немодифицированных МУНТ, регистрируемая по выделению провоспалительных цитокинов из клеток бронхоальвеолярного лаважа *ex vivo*, возрастала с увеличением диаметра и длины нанотрубок.

Впоследствии в значительном числе работ была охарактеризована ингаляционная токсичность МУНТ для грызунов как при однократной, так и при многократной (повторной) схеме введения. На модели аспирации МУНТ мышами однократно в дозе от 10 до 80 мкг выявлены эффекты увеличения толщины соединительной ткани в альвеолярных септах, развития фиброзной реакции [102]. Фагоцитированные МУНТ были обнаружены как в бронхиальных, так и в альвеолярных клетках. Наибольший эффект был выражен на 91-й день [103].

Ингаляция МУНТ мышами в дозе 5 мг/м<sup>3</sup> в течение 3 нед приводила к стойким проявлениям фиброза и воспаления, регистрируемым по специфическим биомаркерам в бронхоальвеолярном лаваже. Указанные изменения были стойкими и не исчезали полностью вплоть до 336 сут по окончании воздействия [104].

Пороговая токсическая концентрация МУНТ при ингаляции самцам крыс в течение 5 сут составила 0,5 мг/м<sup>3</sup> [105]. МУНТ обладали значительно большей токсичностью, чем графен (пороговая концентрация 10 мг/м<sup>3</sup>) и графитовая пыль (более 10 мг/м<sup>3</sup>). Авторы исследования [106] подвергали мышей ингаляции аэрозоля 12 мг/м<sup>3</sup> МУНТ в течение 12 сут. Помимо явлений бронхоальвеолярного воспаления, фиброза, у экспонированных животных отмечено проникновение МУНТ в лимфатические узлы и плевральную полость.

Выраженный фиброз в легких крыс линии Fisher 344 при ингаляции МУНТ в течение 2 нед наблюдался при концентрации 5 мг/м<sup>3</sup>, сдвиги в биологических маркерах бронхоальвеолярного лаважа – между 1 и 5 мг/м<sup>3</sup>. Максимальная недеятельная концентрация МУНТ была оценена величиной 0,2 мг/м<sup>3</sup> [107].

Легочная токсичность для самцов мышей C57BL/6J введением МУНТ в течение 7 недель в дозе 10, 20, 40 и 80 мкг в работе [108] дозозависимо выражалась в воспалении и повреждении легких и достигала максимума на 7-й день после начала экспонирования. На 56-й день уровень маркеров воспаления и повреждения легких был сопоставим с контролем. В эксперименте на самцах крыс Fischer344 при однократном интратрахеальном введении МУНТ в дозе 40 и 160 мкг наблюдались дозо- и времязависимые изменения в массе легких, уровне общего белка, альбумина, ЛДГ и щелочной фосфатазы в жидкости бронхоальвеолярного лаважа, а также воспаление в легочной ткани, микрогранулемы и фиброз [103].

В работе [109] крыс линии Wistar ингаляционно экспонировали МУНТ по 6 ч в день 5 дней в неделю в течение 13 нед в концентрациях 0, 0,1, 0,4, 1,5 и 6 мг/м<sup>3</sup>. Эксперимент не выявил значительной системной токсичности. При воздействии в концентрации 1,5 и 6 мг/м<sup>3</sup> после 13 недельной экспозиции происходила транслокация МУНТ в лимфатические узлы, отмечалось увеличение массы легких и лимфатических узлов. Повышение содержания полиморфно-ядерных нейтрофилов и растворимого коллагена в бронхоальвеолярном лаваже отмечалось в концентрации 0,4 мг/м<sup>3</sup>. Гистопатологические изменения выявлены в концентрации 0,4 мг/мл и выше в верхних дыхательных путях (гипер- или метаплазия клеток, эозинофильные образования) и нижнем дыхательном тракте (воспалительные изменения в бронхоальвеолярной области). Гранулематозные изменения и времязависимое увеличение бронхоальвеолярной гиперплазии выявлялись в концентрации 6 мг/м<sup>3</sup>. При воздействии наименьшей из доз (0,1 мг/м<sup>3</sup>) отрицательных эффектов не наблюдалось.

Ингаляция самцам и самкам крыс МУНТ в течение 90 сут применялась в исследовании [110]. Определение биомаркеров воспаления в бронхоальвеолярном лаваже, морфологических показателей и окислительного повреждения ДНК позволило оценить пороговую дозу величиной 0,25 мг/м<sup>3</sup>. В работе не было выявлено признаков генотоксичности МУНТ.

#### **Пероральная токсичность**

Объем информации по пероральной токсичности УНТ намного меньше по сравнению с ингаляционной. Это связано, как можно предположить, во-первых, с известной недооценкой перорального пути поступления [111] в сравнении с ингаляционным в существующих сценариях экспозиции человека УНТ [87], а во вторых, с серьезными проблемами методического характера при изучении пероральной токсичности, связанными с нерастворимостью УНТ в воде [10, 112]. В работе [113] изучены условия получения стабильных водных дисперсий МУНТ под действием анионных, таких как додецилсульфат натрия (ДСН) и немоногенных (твин 20, 80, тритон X-100) ПАВ. Установлены концентрации ПАВ, отвечающие максимальной стабильности дисперсий (для твин порядка 30–40 мг/л, для ДСН – 20 мг/л). Методом ПЭМ показано присутствие в дисперсиях фрагментов индивидуальных МУНТ.

Отражением методических проблем, связанных с диспергированием УНТ в жидких средах, стали работы (см. обзор в [114]), в которых поглощаемые беспозвоночными и позвоночными животными УНТ полностью проходили транзитом через пищеварительный тракт и экскретировались без какой-либо аккумуляции в органах и тканях. Есть основание полагать, что при этом использовали УНТ с низкой степенью диспергирования.

В модельной системе *in vitro* ОУНТ способны прочно связываться в слое кишечной слизи за счет механизмов адгезии [115].

Диффузия ОУНТ в слизи была медленной по сравнению с металлооксидными наночастицами. Возможность проникновения ОУНТ через барьер стенки кишечника была смоделирована на монослое кишечных эпителиальных клеток Сасо2 [116]. Отмечалось нарушение плотных межклеточных контактов с усилением проникновения по ним маркеров макромолекулярной проницаемости.

Имеются основания полагать, что кишечная абсорбция УНТ возможна именно при их низких дозах, когда с наибольшей вероятностью следует ожидать наличие индивидуальных неагрегированных УНТ, взвешенных в объеме жидкости. Дополнительные факторами, увеличивающими биодоступность УНТ, могут быть их малая длина и модификация [111]. Следует иметь в виду, что процессы агрегации УНТ могут значительно видоизменить для них зависимость доза–эффект, что делает в ряде случаев проблематичной их токсикологическую оценку. Степень дисперсности и, следовательно, токсические свойства УНТ могут изменяться в зависимости от присутствия ПАВ, ионной силы среды [117]. С этим связаны большие расхождения в существующих оценках пороговых и максимальных недействующих доз.

Пероральная токсичность МУНТ диаметром 10–15 нм, длиной 20 мкм была изучена в эксперименте на беременных крысах (с 6–19 дней гестации) [118]. Летальности животных, гибели эмбрионов, изменений массы плодов и плаценты не было выявлено при дозах вплоть до 1000 мг/кг. Оцененная величина максимальной недействующей дозы (NOAEL) по изменениям в массе внутренних органов самок составила 200 мг/кг/сут. В отличие от этого, в исследовании [119] гидроксильированные УНТ уже при однократном пероральном введении беременным мышам в дозе 10 мг/кг вызывали явления резорбции плодов и их скелетные аномалии. Интересно, что при более высокой дозе (100 мг/кг) эти эффекты не проявлялись, что авторы связывают с усилением агрегации УНТ.

В работе [120] дисперсию ОУНТ диаметром 0,9–1,7 и длиной менее 1 мкм однократно перорально вводили крысам в дозах 0,064 или 0,64 мг/кг в физиологическом растворе или кукурузном масле. При этом в печени, но не в легких и толстой кишке, достоверно повышался уровень продукта окислительного повреждения ДНК 8-оксо-2-дезоксигуанозина. Авторы исследования [121], напротив, не обнаружили повышения уровня аддуктов ДНК в моче крыс, получавших МУНТ и ОУНТ перорально в дозах до 50 мг/кг. Однако степень дисперсности применявшихся при этом УНТ была значительно ниже, чем в исследовании [120].

При пероральном введении мышам ОУНТ длиной более 1 мкм в очень высокой дозе (1000 мг/кг) никаких признаков токсичности выявлено не было в отличие от внутрибрюшинного введения, приводившего к развитию гранулем во внутренних органах [122]. Можно предположить, что при таких высоких дозах УНТ начинают преобладать процессы образования крупных неаглобируемых агрегатов. В работе [123] водную дисперсию МУНТ «Таунит», обработанную ультразвуком, вводили перорально мышам С57В6/DBA2 в дозах 0,3; 3 и 30 мг/кг на протяжении 30 сут. Контрольные группы животных получали воду или водные дисперсии углеродной сажи. В дозе до 3 мг/кг МУНТ не вызывали каких-либо изменений в скорости роста животных и морфологии внутренних органов. Однако при дозе 30 мг/кг были выявлены воспалительные инфильтраты в печени. По данным недавних исследований [124, 125], МУНТ «Таунит», вводимые мышам перорально в дозе 30 мг/кг, вызывали очаги локального некроза в слизистой оболочке тонкой кишки с частичным лизисом энтероцитов и разрушением их апикальных мембран. В цитоплазме отдельных энтероцитов были выявлены электронноплотные структуры, напоминающие короткие обломки МУНТ, однако их полная идентификация не представилась возможной.

Авторы исследования [126] вводили МУНТ и взвесь частиц древесного угля крысам с питьевой водой. После обработки суспензий ультразвуком их перед сплавиванием животным длительное отстаивали, получая стабильные «растворы» с концентрацией 0,75–1,5 мг/л в случае МУНТ. В результате были выявлены ряд сдвигов в организме, включая повышение активности щелочной фосфатазы и аланинаминотрансферазы, снижение уровня липопротеинов высокой плотности, признаки оксидантного

стресса в эритроцитах. Аналогичный подход (введение МУНТ с питьевой водой) был применен в эксперименте на мышах [127], с той разницей, что изучаемые дозы наноматериала были намного большими (до 30 мг/кг). При наименьшей из доз наноматериала (1,2 мг/кг) отмечалось снижение скорости роста животных, средней массы сердца, печени и почек в сравнении с контролем. При промежуточной дозе (6 мг/кг) эти изменения были недостоверными. При 30 мг/кг было выявлено достоверное увеличение массы ЖКТ, матки и яичников. Таким образом, различные токсические эффекты МУНТ при пероральном введении не являются дозозависимыми.

## Биораспределение и биотрансформация

Как показали данные ряда исследований *in vivo*, при поступлении как через дыхательные пути, так и перорально возможна транслокация УНТ во внутренние органы с развитием системных токсических эффектов. Ввиду этого, немногочисленные оценки биораспределения и биотрансформации УНТ представляют большой интерес для оценки их рисков.

Уже в ряде ранних работ (обзор см. в [114]) было установлено, что живые организмы могут не только захватывать УНТ, но и активно их модифицировать. Так, ОУНТ захватывались клетками простейших и затем экскретировались в виде гранул микронных размеров [128]. Прохождение ОУНТ через пищеварительную систему дафнии (*Daphnia magna*) приводило к удалению адсорбционного слоя детергента, агрегации и седиментации [129]. Агломерацию МУНТ в дисперсиях, стабилизированных полисахаридами, наблюдали при поглощении личинками лягушки *Xenopus laevis* [130].

Сведения о возможности биодеградации УНТ в организмах высших животных немногочисленны. Так, в работе [124] при обработке МУНТ *in vitro* 0,1 н HCl или желудочным соком мыши отмечалась их частичная деградация, состоящая в общем разрушении структуры и нарушении внутренней полости (канала). Химическая природа этих изменений осталась неясной, так как на электронограммах от «частично деградированных» МУНТ не было выявлено каких-либо изменений их кристаллической структуры.

В исследовании на мышах [131] изучали органотропность внутривенно вводимых ОУНТ методом магнитно-резонансной томографии. Показано наибольшее накопление наноматериала в печени и селезенке без признаков токсического действия в применяемых дозах. В отличие от этого при внутрибрюшинном введении мышам в работе [54] накопление ОУНТ в печени сопровождалось гистопатологическими изменениями. У кроликов, которым внутривенно вводили дисперсию ОУНТ, они присутствовали впоследствии только в печени, но не в других исследованных органах [132].

В результате поступления через дыхательные пути основным местом локализации УНТ являются легкие [133]. Скорость выведения МУНТ из легких является, по-видимому, очень низкой. Так, в исследовании [134] при всего лишь однократном введении 0,55 мг МУНТ крысам значительные их количества оставались в ткани легких через 1 год после введения. Транслокация МУНТ во внутренние органы в данной работе не была выявлена. Согласно теоретической модели [135], клиренс УНТ из легких может быть подразделен на 3 фазы, включая быструю (мукоцилиарную эвакуацию), медленную (захват макрофагами бронхов с последующим трансцитозом) и особо медленную (посредством фагоцитоза альвеолярными макрофагами и эндоцитоза клетками альвеолярного эпителия).

Исследование транслокации и бионакопления МУНТ в органах мышей в результате 12-суточной ингаляции показало, что наибольшая аккумуляция МУНТ в виде агрегатов отмечается в тканях легких, включая макрофаги и альвеолы [104]. Значительное накопление агрегатов МУНТ было характерно также для трахеобронхальных лимфатических узлов. В другие внутренние органы (печень, головной мозг и почки) проникали, напротив, только индивидуальные неагрегированные МУНТ. В частности, в печени в конце периода экспозиции содержание МУНТ достигало 25 тыс. волокон на 1 г ткани. Через 336 сут после окончания затравки содержание МУНТ в печени еще более возрастало, достигая 196 тыс. на 1 г ткани, что свидетельствовало о продолжающейся в течение этого периода резорбции наноматериала.

териала из его «запасов», накопленных в легких. Возможность проникновения МУНТ, флуоресцентно меченных флуоресцеинизотиоцианатом, через гематоэнцефалический барьер была продемонстрирована с использованием модели монослоев клеток эндотелия капилляров головного мозга [136].

В работе [137] был применен оригинальный метод «средовой» (*environmental*) экспозиции МУНТ мышей, состоящий в их диспергировании в подстилке, на которой содержали животных. Предполагалось, что поступление МУНТ в организм при этом возможно сразу несколькими путями: ингаляционно (с пылью), перорально, через обонятельную слизистую оболочку и др. В результате выявлено «диссеминированное» накопление МУНТ в организме, включая головной мозг, печень, легкие и почки.

## Заключение

Таким образом, выявление в последние годы клеточных и молекулярных механизмов токсичности УНТ позволяет, с одной стороны, обосновать список наиболее чувствительных биохимических маркеров токсичности, которые могли быть использованы, например, для мониторинга вредного действия УНТ на производстве и, во-вторых, послужить (в более или менее отдаленной перспективе) мишенью соответствующих фармакологических и иммунофармакологических интервенций, что создало бы возможности для специфической профилактики и терапии вредного действия УНТ на организм человека. Значительный объем экспериментальных данных, полученных на моделях *in vivo* при ингаляционном пути поступления УНТ, позволяет осуществить в настоящее время их гигиеническое нормирование в воздухе рабочей зоны. Что же касается безопасных уровней при пероральном поступлении УНТ, то для их надежной оценки требуются дополнительные исследования.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

(п.п. 1-4, 6, 10-52, 54-59, 61-62, 65-95, 97-122, 125, 128-137 см. References)

1. Раков Э.Г. *Нанотрубки и фуллерены. Учебное пособие*. М: Университетская книга, Логос; 2006.
2. Саяпина Н.В., Сергиевич А.А., Баталова Т.А., Новиков М.А., Асадчева А., Чайка В.В. и др. Экологическая и токсикологическая опасность углеродных нанотрубок: обзор российских публикаций. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014; 16(5): 949-53.
3. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Шведова А.А. Оценка риска здоровью при воздействии углеродных нанотрубок: от токсикологии к эпидемиологическим исследованиям (обзор современного состояния проблемы). *Российские нанотехнологии*. 2015; 10(5-6): 144-50.
4. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90(4): 578-84.
5. 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 бронхального эпителия. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2014; (1): 199-210.
6. Халиуллин Т.О., Кисин Е.Р., Залялов Р.Р., Шведова А.А., Фатхутдинова Л.М. Биологические эффекты многослойных углеродных нанотрубок при легочной экспозиции *in vivo*. *Токсикологический вестник*. 2013; (4): 17-21.
7. Мезенцева М.В., Руссу Л.И., Лосева Е.В., Логинова Н.А., Панов Н.В., Щетвин М.Н. и др. Изменение синтеза цитокинов, но не экспрессии c-fos в мозге крыс при интраназальном введении однослойных углеродных нанотрубок. *Нанотехнологии: разработка, применение – XXI век*. 2015; 7(2): 26-32.
8. Мезенцева М.В., Руссу Л.И., Лосева Е.В., Логинова Н.А., Панов Н.В., Щетвин М.Н. и др. Изменение синтеза цитокинов, но не экспрессии c-fos в мозге крыс при интраназальном введении однослойных углеродных нанотрубок. *Биомедицинская радиоэлектроника*. 2014; (8): 38-43.
9. Рыбалкин С.П., Михина Л.В., Онацкий Н.М., Алдобаев В.Н., Блохин В.А., Третьякова А.В. и др. Изучение токсичности нано-

структурированного углерода в форме одностенных углеродных нанотрубок и укороченных одностенных углеродных нанотрубок при ингаляционном пути поступления крысам. *Прикладная токсикология*. 2013; 4(1): 32-9.

10. Васюкова И.А., Гусев А.А., Халиуллин Т.О., Фатхутдинова Л.М., Убогов А.Ю. Многостенные углеродные нанотрубки и их влияние на показатели мужской репродуктивной системы. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2014; 6(1): 10-5.
11. Масютин А.Г., Ерохина М.В., Сычевская К.А., Гусев А.А., Васюкова И.А., Ткачев А.Г. и др. Многостенные углеродные нанотрубки индуцируют патологические изменения в органах пищеварительной системы мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(1): 143-8.
12. Хрипач Л.В., Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И., Князева Т.Д., Коганова З.И., Железняк Е.В. и др. Влияние углеродных нанотрубок и активированного угля на биохимические показатели состояния организма при хроническом введении препаратов крысам с питьевой водой. *Гигиена и санитария*. 2014; 93(5): 36-42.
13. Горшенева Е.Б. Дозозависимый эффект многостенных углеродных нанотрубок и частиц сажи при пероральном введении лабораторным мышам. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2014; 6(1): 48-55.

## References

1. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. 1991; 354: 56-8.
2. Shvedova A.A., Kisin E.R., Porter D., Schulte P., Kagan V.E., Fadeel B. et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacol. Ther.* 2009; 121(2): 192-204.
3. Future Markets Inc: The global market for carbon nanotubes to 2020. *Dublin, Ireland, Future Markets Inc*. 2013; 70: 1-229.
4. Varshney K. Carbon nanotubes: a review on synthesis, properties and applications. *Int. J. Eng. Res. Gen. Sci.* 2014; 2(4): 660-77.
5. Rakov E.G. *Nanotubes and fullerenes. Tutorial [Nanotrubki i fullereny. Uchebnoe posobie]*. Moscow: Universitetskaya kniga, Logos; 2006. (in Russian)
6. Scown T.M., van Aerle R., Tyler C.R. Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment. *Crit. Rev. Toxicol.* 2010; 40(7): 653-70.
7. Sayapina N.V., Sergievich A.A., Batalova T.A., Novikov M.A., Asadcheva A., Chayka V.V. et al. Environmental and toxicological danger of carbon nanotubes: an overview of Russian publications. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2014; 16(5): 949-53. (in Russian)
8. Fatkhutdinova L.M., Khaliullin T.O., Shvedova A.A. Assessment of health risks when exposed to carbon nanotubes: from toxicology to epidemiology research (overview of the current state of the problem). *Rossiyskie nanotekhnologii*. 2015; 10(5-6): 144-50. (in Russian)
9. Fatkhutdinova L.M., Khaliullin T.O., Zalyalov R.R. Toxicity of artificial nanoparticles. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 90(4): 578-84. (in Russian)
10. Dutta D., Sundaram S.K., Teegarden J.G., Riley B.J., Fifield L.S., Jacobs J.M. et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol. Sci.* 2007; 100(1): 303-15.
11. Jin H., Heller D.A., Sharma R., Strano M.S. Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano*. 2009; 3(1): 149-58.
12. Tabet L., Bussy C., Amara N., Setyan A., Grodet A., Rossi M.J. et al. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2009; 72(2): 60-73.
13. Haniu H., Saito N., Matsuda Y., Kim Y.A., Park K.C., Tsukahara T. et al. Effect of dispersants of multi-walled carbon nanotubes on cellular uptake and biological responses. *Int. J. Nanomedicine*. 2011; 6: 3295-307.
14. Romero G., Rojas E., Estrela-Lopis I., Donath E., Moya S.E. Spontaneous confocal Raman microscopy – a tool to study the uptake of nanoparticles and carbon nanotubes into cells. *Nanoscale Res. Lett.* 2011; 6(1): 429.
15. Shi X., von dem Bussche A., Hurt R.H., Kane A.B., Gao H. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nat. Nanotechnol.* 2011; 6(11): 714-9.

16. Yang S.T., Luo J., Zhou Q., Wang H. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. *Theranostics*. 2012; 2(3): 271–82.
17. Monteiro-Riviere N.A., Nemanich R.J., Inman A.O., Wang Y.Y., Riviere J.E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 2005; 155(3): 377–84.
18. Sabuncu A.C., Kalluri B.S., Qian S., Stacey M.W., Beskok A. Dispersion state and toxicity of mwCNTs in cell culture medium with different T80 concentrations. *Colloids. Surf. B Biointerfaces*. 2010; 78(1): 36–43.
19. Schrand A.M., Schlager J.J., Dai L., Hussain S.M. Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. *Nat. Protoc.* 2010; 5(4): 744–57.
20. Al-Jamal K.T., Kostarelos K. Assessment of cellular uptake and cytotoxicity of carbon nanotubes using flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2010; 625: 123–34.
21. Raffa V., Ciofani G., Orazio V., Riggio C., Cuschieri A. Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. *Nanomedicine*. 2010; 5(1): 89–97.
22. Sohaebuddin S.K., Thevenot P.T., Baker D., Eaton J.W., Tang L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicol.* 2010; 7: 22.
23. Geys J., Nemery B., Hoet P.H. Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicol. In Vitro*. 2010; 24(2): 620–9.
24. Gusev A.A., Fedorova I.A., Tkachev A.G., Godymchuk A.Yu., Kuznetsov D.V., Polyakova I.A. Acute toxic and cytogenetic effects of carbon nanotubes on aquatic organisms and bacteria. *Nanotechnol. Russia*. 2012; 7(9-10): 509–16.
25. Schrand A.M., Johnson J., Dai L., Hussain S.M., Schlager J.J., Zhu L. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of carbon nanomaterials. In: Webster T.J., ed. *Safety of Nanoparticles, Nanostructure Science and Technology*. New York: Springer; 2009: 159–187.
26. Madani S.Y., Mandel A., Seifalian A.M. A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev.* 2013; 4: 21521.
27. Lyon D.Y., Thill A., Rose J., Alavarez P.J., Ecotoxicological impacts of nanomaterials. In: Weisner R., Bottero J.Y., eds. *Environmental Nanotechnology: Applications and Implications of Nanomaterials*. New York: McGrawHill; 2007: 445–79.
28. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of carbon nanotubes. In: Warren C.W., ed. *BioApplications of Nanoparticles*. New York: Springer; 2007: 181–204.
29. Schrand A.M., Daia L., Schlager J.J., Hussain S.M., Osawa E. Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds. *Diamond Relat. Mater.* 2007; 16(12): 2118–23.
30. Shvedova A.A., Castranova V., Kisin E.R., Schwegler-Berry D., Murray A.R., Gandelsman V.Z. et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2003; 66(20): 1909–26.
31. Cui D., Tian F., Ozkan C.S., Wang M., Gao H. Effects of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 2005; 155(1): 73–85.
32. Panessa-Warren B.J., Maye M.M., Warren J.B., Crosson K.M. Single walled carbon nanotube reactivity and cytotoxicity following extended aqueous exposure. *Environ. Pollut.* 2009; 157(4): 1140–51.
33. 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.
34. Satomi F., Okazaki Y., Ito D., Asakawa A., Nagai H., Masafumi T. et al. Asbestos and multi-walled carbon nanotubes generate distinct oxidative responses in inflammatory cells. *J. Clin Biochem. Nutr.* 2015; 56(2): 111–7.
35. Patlolla A., Patlolla B., Tchounwou P. Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube. *Mol. Cell Biochem.* 2010; 338(1-2): 225–32.
36. Coccini T., Roda E., Sarigiannis D.A., Mustarelli P., Quartarone E., Profumo A. et al. Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon nanotubes examined by different cytotoxicity methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells. *Toxicology*. 2010; 269(1): 41–53.
37. Genaidy A., Tolaymat T., Sequeira R., Rinder M., Dionysiou D. Health effects of exposure to carbon nanofibers: systematic review, critical appraisal, meta analysis and research to practice perspectives. *Sci. Total. Envi.* 2009; 407(12): 3686–701.
38. Park K.H., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(50): 50212–6.
39. Ma X., Zhang L.H., Wang L.R., Xue X., Sun J.H., Wu Y. et al. Single-walled carbon nanotubes alter cytochrome c electron transfer and modulate mitochondrial function. *ACS Nano*. 2012; 6(12): 10486–96.
40. Liu H.L., Zhang Y.L., Yang N., Zhang Y.X., Liu X.Q., Li C.G. et al. A functionalized single-walled carbon nanotube-induced autophagic cell death in human lung cells through Akt-TSC2-mTOR signaling. *Cell Death Dis.* 2011; 2(5): e159.
41. Dong J., Ma Q. Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity. *Nanotoxicology*. 2015; 9(5): 658–76.
42. Hussain S., Sangtian S., Anderson S., Snyder R., Marshburn J.D., Rice A.B. et al. Inflammasome activation in airway epithelial cells after multi-walled carbon nanotube exposure mediates a profibrotic response in lung fibroblasts. *Part. Fibre Toxicol.* 2014; 11: 28.
43. Shipkowski K.A., Taylor A.J., Thompson E.A., Glista-Baker E.E., Sayers B.C., Messenger Z.J., et al. An allergic lung microenvironment suppresses carbon nanotube-induced inflammasome activation via STAT6-dependent inhibition of caspase-1. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0128888.
44. Vietti G., Lison D., van den Brule S. Mechanisms of lung fibrosis induced by carbon nanotubes: towards an Adverse Outcome Pathway (AOP). *Part. Fibre Toxicol.* 2015; 13: 11.
45. Girtsman T.A., Beamer C.A., Wu N., Buford M., Holian A. IL-1R signalling is critical for regulation of multi-walled carbon nanotubes-induced acute lung inflammation in C57Bl/6 mice. *Nanotoxicology*. 2014; 8(1): 17–27.
46. Katwa P., Wang X., Urankar R.N., Podila R., Hilderbrand S.C., Fick R.B. et al. Carbon nanotube toxicity paradigm driven by mast cells and the IL-33/ST2 axis. *Small*. 2012; 8(18): 2904–12.
47. Wang X., Shannahan J.H., Brown J.M. IL-33 modulates chronic airway resistance changes induced by multi-walled carbon nanotubes. *Inhal. Toxicol.* 2014; 26(4): 240–9.
48. Tsukahara T., Matsuda Y., Haniu H. The role of autophagy as a mechanism of toxicity induced by multi-walled carbon nanotubes in human lung cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(1): 40–8.
49. Azad N., Iyer A.K., Wang L., Liu Y., Lu Y., Rojanasakul Y. Reactive oxygen species-mediated p38 MAPK regulates carbon nanotube-induced fibrogenic and angiogenic responses. *Nanotoxicology*. 2013; 7(2): 157–68.
50. Polimeni M., Gulino G.R., Gazzano E., Kopecka J., Marucco A., Fenoglio I. et al. Multi-walled carbon nanotubes directly induce epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells via the TGF- $\beta$ -mediated Akt/GSK-3 $\beta$ /SNAIL-1 signalling pathway. *Part. Fibre Toxicol.* 2015; 13: 27.
51. Huizar I., Malur A., Patel J., McPeck M., Dobbs L., Wingard C. et al. The role of PPAR $\gamma$  in carbon nanotube-elicited granulomatous lung inflammation. *Respir Res.* 2013; 14(1): 7.
52. Di Y.P., Tkach A.V., Yanamala N., Stanley S., Gao S., Shurin M.R. et al. Dual acute proinflammatory and antifibrotic pulmonary effects of short palate, lung, and nasal epithelium clone-1 after exposure to carbon nanotubes. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2013; 49(5): 759–67.
53. Khaliullin T.O., Kisin E.R., Myurrey R.E., Zalyalov R.R., Shvedova A.A., Fatkhutdinova L.M. Toxic effects of carbon nanotubes in cultures of macrophages and bronchial epithelial cells. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. 2014; (1): 199–210. (in Russian)
54. Patlolla A., McGinnis B., Tchounwou P. Biochemical and histopathological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotube in Swiss-Webster mice. *J. Appl. Toxicol.* 2011; 31(1): 75–83.
55. Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O. Challenges for assessing carbon nano-material toxicity to the skin. *Carbon*. 2006; 44: 1070–8.
56. Jacobsen N.R., Møller P., Jensen K.A., Vogel U., Ladefoged O., Loft S. et al. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE $^{-/-}$  mice. *Part. Fibre Toxicol.* 2009; 6: 1.
57. Han S.G., Andrews R., Gairola C.G. Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. *Inhal. Toxicol.* 2010; 22(4): 340–7.
58. Crouzier D., Follot S., Gentilhomme E., Flahaut E., Arnaud R., Dabouis V. et al. Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology*. 2010; 272(1-3): 39–45.
59. Murphy F.A., Schinwald A., Poland C.A., Donaldson K. The

- mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 2012; 9: 8.
60. Khaliullin T.O., Kisin E.R., Zalyalov R.R., Shvedova A.A., Fatkhutdinova L.M. Biological effects of multi-walled carbon nanotubes in pulmonary exposure *in vivo*. *Toksikologicheskii vestnik.* 2013; (4): 17–21. (in Russian)
  61. Fatkhutdinova L.M., Khaliullin T.O., Vasil'yeva O.L., Zalyalov R.R., Mustafin I.G., Kisin E.R. et al. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016; 299: 125–31.
  62. Manke A., Luanpitpong S., Dong C., Wang L., He X., Battelli L. et al. Effect of fiber length on carbon nanotube-induced fibrogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(5): 7444–61.
  63. Mezentseva M.V., Russu L.I., Loseva E.V., Loginova N.A., Panov N.V., Shchetvin M.N. et al. Changes in cytokine synthesis, but not c-fos expression in the brain of rats when administered intranasally with single-walled carbon nanotube. *Nanotekhnologii: razrabotka, primeneniye – XXI vek.* 2015; 7(2): 26–32. (in Russian)
  64. Mezentseva M.V., Russu L.I., Loseva E.V., Loginova N.A., Panov N.V., Shchetvin M.N. et al. Changes in cytokine synthesis, but not c-fos expression in the brain of rats when administered intranasally with single-walled carbon nanotube. *Biomeditsinskaya radioelektronika.* 2014; (8): 38–43. (in Russian)
  65. Sager T.M., Wolfarth M.W., Andrew M., Hubbs A., Friend S., Chen T. et al. Effect of multi-walled carbon nanotube surface modification on bioactivity in the C57BL/6 mouse model. *Nanotoxicology.* 2014; 8(3): 317–27.
  66. Jessop F., Holian A. Extracellular HMGB1 regulates multi-walled carbon nanotube-induced inflammation *in vivo*. *Nanotoxicology.* 2015; 9(3): 365–72.
  67. Trifonova O.P., Il'in V.A., Kolker E.V., Lisitsa A.V. Big Data in Biology and Medicine: Based on material from a joint workshop with representatives of the international Data-Enabled Life Science Alliance, July 4, 2013, Moscow, Russia. *Acta naturae.* 2013; 5(3): 13–6.
  68. Ding L.H., Stilwell J., Zhang H.J., Elboudwarej O., Jiang H., Selegue J.P. et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nanoonions on human skin fibroblast. *Nano Lett.* 2005; 5(12): 2448–64.
  69. Alazzam A., Mfoumou E., Stiharu I., Kassab A., Darnel A., Yasmeen A. et al. Identification of deregulated genes by single wall carbon-nanotubes in human normal bronchial epithelial cells. *Nanomedicine.* 2010; 6(4): 563–9.
  70. Poulsen S.S., Jacobsen N.R., Labib S., Wu D., Husain M., Williams A. et al. Transcriptomic analysis reveals novel mechanistic insight into murine biological responses to multi-walled carbon nanotubes in lungs and cultured lung epithelial cells. *PLoS One.* 2013; 8(11): e80452.
  71. Tilton S.C., Karin N.J., Tolic A., Xie Y., Lai X., Hamilton R.F. et al. Three human cell types respond to multi-walled carbon nanotubes and titanium dioxide nanobelts with cell-specific transcriptomic and proteomic expression patterns. *Nanotoxicology.* 2014; 8(5): 533–48.
  72. Fujita K., Fukuda M., Fukui H., Horie M., Endoh S., Uchida K. et al. Intratracheal instillation of single-wall carbon nanotubes in the rat lung induces time-dependent changes in gene expression. *Nanotoxicology.* 2015; 9(3): 290–301.
  73. Dymacek J., Snyder-Talkington B.N., Porter D.W., Mercer R.R., Wolfarth M.G., Castranova V. et al. mRNA and miRNA regulatory networks reflective of multi-walled carbon nanotube-induced lung inflammatory and fibrotic pathologies in mice. *Toxicol. Sci.* 2015; 144(1): 51–64.
  74. Snyder-Talkington B.N., Dong C., Sargent L.M., Porter D.W., Staska L.M., Hubbs A.F. et al. mRNAs and miRNAs in whole blood associated with lung hyperplasia, fibrosis, and bronchiolo-alveolar adenoma and adenocarcinoma following multi-walled carbon nanotube inhalation exposure in mice. *J. Appl. Toxicol.* 2016; 36(1): 161–74.
  75. Labib S., Williams A., Yauk C.L., Nikota J.K., Wallin H., Vogel U. et al. Nano-risk Science: application of toxicogenomics in an adverse outcome pathway framework for risk assessment of multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.* 2016; 13: 15.
  76. Nikota J., Williams A., Yauk C.L., Wallin H., Vogel U., Halappanavar S. Meta-analysis of transcriptomic responses as a means to identify pulmonary disease outcomes for engineered nanomaterials. *Part. Fibre Toxicol.* 2015; 13: 25.
  77. Shvedova A.A., Yanamala N., Kisin E.R., Khailullin T.O., Birch E.M., Fatkhutdinova L.M. Integrated analysis of dysregulated ncRNA and mRNA expression profiles in humans exposed to carbon nanotubes. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0150628.
  78. Witzmann F.A., Monteiro-Riviere N. Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocyte. *Nanomedicine.* 2006; 2(3): 158–68.
  79. Haniu H., Matsuda Y., Takeuchi K., Kim Y.A., Hayashi T., Endo M. Proteomics-based safety evaluation of multi-walled carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010; 242(3): 256–62.
  80. Shen Z.L., Nie H.Y., Wang H.F., Yang B., Zhong L.J., Zou X.J. et al. Two types of MWNTs with different surface modifications induce differential expression of proteins in RAW264.7 cells. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2010; 42(3): 345–50. (in Chinese)
  81. Li J., Zhang G., Zhang X., Jia Z., Gao X., Jiang Y. et al. Proteomic analysis of cellular response induced by multi-walled carbon nanotubes exposure in A549 cells. *PLoS One.* 2014; 9(1): e84974.
  82. Hilton G.M., Taylor A.J., McClure C.D., Parsons G.N., Bonner J.C., Beremana M.S. Toxicoproteomic analysis of pulmonary carbon nanotube exposure using LC-MS/MS. *Toxicology.* 2015; 329: 80–7.
  83. Ray S., Chandra H., Srivastava S. Nanotechniques in proteomics: current status, promises and challenges. *Biosens Bioelectron.* 2010; 25(11): 2389–401.
  84. Li P., Lai X., Witzmann F.A., Blazer-Yost B.L. Bioinformatic analysis of differential protein expression in Calu-3 cells exposed to carbon nanotubes. *Proteomes.* 2013; 1(3): 219–39.
  85. Lai X., Blazer-Yost B.L., Clack J.W., Fears S.L., Mitra S., Ntim S.A. et al. Protein expression profiles of intestinal epithelial co-cultures: effect of functionalised carbon nanotube exposure. *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* 2013; 3(1-2): 10.
  86. Baron P.A., Deye G.J., Chen B.T., Schwegler-Berry D.E., Shvedova A.A., Castranova V. Aerosolization of single-walled carbon nanotubes for an inhalation study. *Inhal. Toxicol.* 2008; 20(8): 751–60.
  87. Oberdörster G., Castranova V., Ashgharian B., Sayre P. Inhalation exposure to carbon nanotubes (CNT) and carbon nanofibers (CNF): methodology and dosimetry. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2015; 18: 121–212.
  88. Aschberger K., Johnston H.J., Stone V., Aitken R.J., Hankin S.M., Peters S.A. et al. Review of carbon nanotubes toxicity and exposure – appraisal of human health risk assessment based on open literature. *Crit. Rev. Toxicol.* 2010; 40(9): 759–90.
  89. Van der Zande M., Junker R., Walboomers X.F., Jansen J.A. Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2011; 17(1): 57–69.
  90. Silva R.M., Doudrick K., Franz L.M., Tee S.C., Anderson D.S., Wu Z. et al. Instillation versus inhalation of multiwalled carbon nanotubes: exposure-related health effects, clearance, and the role of particle characteristics. *ACS Nano.* 2014; 8(9): 8911–31.
  91. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R.R., Murray A.R., Johnson V.J., Potapovich A.I. et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005; 289(5): 698–708.
  92. Chou C.C., Hsiao H.Y., Hong Q.S., Chen C.H., Peng Y.W., Chen H.W. et al. Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano. Lett.* 2008; 8(2): 437–45.
  93. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 2004; 77(1): 126–34.
  94. Kisin E.R., Murray A.R., Keane M.J., Shi X.C., Schwegler-Berry D., Gorelik O. et al. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2007; 70(24): 2071–9.
  95. Teeguarden J.C., Webb-Robertson B.J., Waters K.M., Murray A.R., Kisin E.R., Varnum S.M. et al. Comparative proteomics and pulmonary toxicity of instilled single-walled carbon nanotubes, crocidolite asbestos, and ultrafine carbon black in mice. *Toxicol. Sci.* 2011; 120(1): 123–35.
  96. Rybalkin S.P., Mikhina L.V., Onatskiy N.M., Aldobaev V.N., Blokhin V.A., Tret'yakova A.V. et al. The study of nanostructured carbon toxicity in the form of single-walled carbon nanotubes, and shortened single-wall carbon nanotubes at inhalation in rats. *Prikladnaya toksikologiya.* 2013; 4(1): 32–9. (in Russian).
  97. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Arepalli S., Hunter R.L. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit. Rev. Toxicol.* 2006; 36(3): 189–217.

98. Shvedova A.A., Yamamala N., Kisin E.R., Tkach A.V., Murray A.R., Hubbs A. et al. Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung: one year postexposure comparisons. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2014; 306(2): L170–82.
99. Li J.G., Li W.X., Xu J.Y., Cai X.Q., Liu R.L., Li Y.J. et al. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ. Toxicol.* 2007; 22(4): 415–21.
100. Wang X., Katwa P., Podila R., Chen P., Ke P.C., Rao A.M. et al. Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice. *Part. Fibre Toxicol.* 2011; 8: 24.
101. Hamilton R.F., Wu Z., Mitra S., Shaw P.K., Holian A. Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology. *Part. Fibre Toxicol.* 2013; 10: 57.
102. Mercer R.R., Hubbs A.F., Scabilloni J.F., Wang L., Battelli L.A., Friend S. et al. Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.* 2011; 8: 21.
103. Aiso S., Yamazaki K., Umeda Y. Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Ind. Health.* 2010; 48(6): 783–95.
104. Mercer R.R., Scabilloni J.F., Hubbs A.F., Wang L., Battelli L.A., McKinney W. et al. Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure. *Part. Fibre Toxicol.* 2013; 10: 38.
105. Ma-Hock L., Strauss V., Treumann S., Küttler K., Wohlleben W., Hofmann T. et al. Comparative inhalation toxicity of multi-wall carbon nanotubes, graphene, graphite nanoplatelets and low surface carbon black. *Part. Fibre Toxicol.* 2013; 10: 23.
106. Porter D.W., Hubbs A.F., Chen B.T., McKinney W., Mercer R.R., Wolfarth M.G., et al. Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology.* 2013; 7(7): 1179–94.
107. Umeda Y., Tatsuya K., Misae S., Kondo H., Tadao T., Shigetoshi A. et al. Two-week toxicity of multi-walled carbon nanotubes by whole-body inhalation exposure in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 2013; 26(2): 131–40.
108. Porter D.W., Hubbs A.F., Mercer R.R., Wu N., Wolfarth M.G., Sriram K. et al. Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology.* 2010; 269(2-3): 136–47.
109. Pauluhn J. Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol. Sci.* 2010; 113(1): 226–42.
110. Pothmann D., Simar S., Schuler D., Dony E., Gaering S., Le Net J.L. et al. Lung inflammation and lack of genotoxicity in the comet and micronucleus assays of industrial multiwalled carbon nanotubes Graphistrength® C100 after a 90-day nose-only inhalation exposure of rats. *Part. Fibre Toxicol.* 2015; 12: 21.
111. Bergin I.L., Witzmann F.A. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* 2013; 3:1.
112. Buford M.C., Hamilton J., Raymond F., Holian A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 2007; 4: 6.
113. Rastogi R., Kaushal R., Tripathi S.K., Sharma A.L., Kaur I., Bharadwaj L.M. Comparative study of carbon nanotube dispersion using surfactants. *J. Colloid. Interface Sci.* 2008; 328(2): 421–8.
114. Jackson P., Jacobsen N.R., Baun A., Birkedal R., Kühnel D., Jensen K.A. et al. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem. Cent. J.* 2013; 7: 154.
115. Jachak A., Lai S.K., Hida K., Suk J.S., Markovic N., Biswal S. et al. Transport of metal oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes in human mucus. *Nanotoxicology.* 2012; 6(6): 614–22.
116. Coyuco J.C., Liu Y., Tan B.J., Chiu G.N. Functionalized carbon nanomaterials: exploring the interactions with Caco-2 cells for potential oral drug delivery. *Int. J. Nanomedicine.* 2011; 6: 2253–63.
117. Ju L., Zhang W., Wang X., Hu J., Zhang Y. Aggregation kinetics of SDBS-dispersed carbon nanotubes in different aqueous suspensions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2012; 409: 159–66.
118. Lim J.H., Kim S.H., Lee I.C., Moon C., Kim S.H., Shin D.H. et al. Evaluation of maternal toxicity in rats exposed to multi-wall carbon nanotubes during pregnancy. *Environ. Health Toxicol.* 2011; 26: e2011006.
119. Philbrook N.A., Walker V.K., Afroz A.R., Saleh N.B., Winn L.M. Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Reprod. Toxicol.* 2011; 32(4): 442–8.
120. Folkmann J.K., Risom L., Jacobsen N.R., Wallin H., Loft S., Møller P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 2009; 117(5): 703–8.
121. Szendi K., Varga C. Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. *Anticancer Res.* 2008; 28(1A): 349–52.
122. Kolosnjaj-Tabi J., Hartman K.B., Boudjemaa S., Ananta J.S., Morgant G., Szwarc H. et al. In vivo behavior of large doses of ultra-short and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. *ACS Nano.* 2010; 4(3): 1481–92.
123. Vasyukova I.A., Gusev A.A., Khaliullin T.O., Fatkhutdinova L.M., Ubogov A.Yu. Multi-walled carbon nanotubes and their effect on the male reproductive system. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya.* 2014; 6(1): 10–5. (in Russian)
124. Masyutin A.G., Erokhina M.V., Sychevskaya K.A., Gusev A.A., Vasyukova I.A., Tkachev A.G. et al. Multiwall carbon nanotubes induce pathological changes in the digestive system organs of mice. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2016; 161(1): 143–8. (in Russian)
125. Masyutin A., Erokhina M., Sychevskaya K., Gusev A., Vasyukova I., Smirnova E. et al. Multi-walled carbon nanotubes: biodegradation by gastric agents in vitro and effect on murine intestinal system. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering.* 2015; 98: 012008.
126. Khrupach L.V., Rakhmanin Yu.A., Mikhaylova R.I., Knyazeva T.D., Koganova Z.I., Zheleznyak E.V. et al. Biochemical effects of chronic peroral administration of carbon nanotubes and activated charcoal in drinking water in rats. *Gigiena i sanitariya.* 2014; 93(5): 36–42. (in Russian)
127. Gorsheneva E.B. Dose-dependent effect of multi-walled carbon nanotubes and carbon black particles in oral administration to laboratory mice. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya.* 2014; 6(1): 48–55. (in Russian)
128. Zhu Y., Zhao Q., Li Y., Cai X., Li W. The interaction and toxicity of multiwalled carbon nanotubes with *Styloynchia mytilus*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006; 6(5): 1357–64.
129. Ferguson P.L., Chandler G.T., Templeton R.C., Demarco A., Scrivens W.A., Englehart B.A. Influence of sediment-amendment with single-walled carbon nanotubes and diesel shoot on bioaccumulation of hydrophobic organic contaminants by benthic invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42(10): 3879.
130. Bourdiol F., Mouchet F., Perrault A., Fourquaux I., Datas L., Gancet C. et al. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon.* 2013; 54: 175–91.
131. Al Faraj A., Fauvelle F., Luciani N., Lacroix G., Levy M., Crémilieux Y. et al. In vivo biodistribution and biological impact of injected carbon nanotubes using magnetic resonance techniques. *Int. J. Nanomedicine.* 2011; 6: 351–61.
132. Cherukuri P., Gannon C.J., Leeuw T.K., Schmidt H.K., Smalley R.E., Curley S.A. et al. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *PNAS.* 2006; 103(50): 18882–6.
133. Mercer R.R., Scabilloni J.F., Hubbs A.F., Battelli L.A., McKinney W., Friend S. et al. Distribution and fibrotic response following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.* 2013; 10: 33.
134. Shinohara N., Nakazato T., Ohkawa K., Tamura M., Kobayashi N., Morimoto Y. et al. Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation. *J. Appl. Toxicol.* 2016; 36(4): 501–9.
135. Sturmcorres R. Clearance of carbon nanotubes in the human respiratory tract – a theoretical approach. *Ann. Transl. Med.* 2014; 2(5): 46.
136. Shityakov S., Salvador E., Pastorin G., Förster C. Blood-brain barrier transport studies, aggregation, and molecular dynamics simulation of multiwalled carbon nanotube functionalized with fluorescein isothiocyanate. *Int. J. Nanomedicine.* 2015; 10: 1703–13.
137. Albini A., Pagani A., Pulze L., Bruno A., Principi E., Congiu T. et al. Environmental impact of multi-wall carbon nanotubes in a novel model of exposure: systemic distribution, macrophage accumulation, and amyloid deposition. *Int. J. Nanomedicine.* 2015; 10: 6133–45.