

Читать
онлайн
Read
online

Фатхутдинова Л.М.¹, Габидинова Г.Ф.¹, Димиев А.М.², Валева Е.В.¹,
Тимербулатова Г.А.¹

Апоптоз как механизм гибели клеток дыхательной системы человека при воздействии углеродных нанотрубок

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

²ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, Казань, Россия

Введение. Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой группу перспективных наноматериалов для использования в промышленных и биомедицинских целях. Литературные данные свидетельствуют о влиянии физико-химических особенностей УНТ на реализацию токсических эффектов, в том числе способность вызывать повреждение ДНК и индуцировать апоптоз. В настоящем исследовании проведена сравнительная оценка про-апоптотических эффектов и механизмов их реализации при воздействии одностенных и многостенных УНТ российского производства на культурах клеток дыхательной системы человека.

Материалы и методы. Клетки бронхиального эпителия BEAS-2B, альвеолярного эпителия A549 и фибробластов лёгких MRC5-SV40 человека подвергались экспозиции очищенных и неочищенных от металлических примесей ОУНТ TUBALL™ и МУНТ Таунит-М. В клетках, подвергшихся воздействию 4 концентраций (100; 50; 0,03; 0,0006 мкг/мл) всех типов исследуемых УНТ в течение 72 ч, оценивали уровень мРНК генов P53, BAX и BCL2, а также уровень активных форм кислорода.

Результаты. Все изученные в эксперименте типы УНТ инициировали апоптоз эпителиальных клеток дыхательной системы человека BEAS-2B и A549, но не фибробластов лёгких MRC5-SV40. BEAS-2B были более чувствительны к воздействию МУНТ, тогда как A549 – к ОУНТ с металлическими включениями. Признаки инициации апоптоза появлялись на низких концентрациях, в том числе соответствовавших производственным экспозициям. Механизм оксидативного стресса может выступать фактором запуска апоптоза в клетках лёгочного эпителия.

Ограничения исследования. Относительно короткое (72 ч) время экспозиции клеток и применение 2D-клеточных моделей, не учитывающих реальные взаимодействия клеток.

Заключение. Выявлены различия в механизмах реализации внутреннего пути апоптоза и чувствительности к разным типам УНТ в зависимости от вида эпителиальных клеток. Сравнительный анализ инициации апоптоза различными типами УНТ показывает, что существуют различия в потенциальных клетках-мишенях и токсических механизмах, что необходимо учитывать в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки; BEAS-2B; A549; MRC5-SV40; апоптоз; P53; BCL2; BAX; экспрессия генов

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

Для цитирования: Фатхутдинова Л.М., Габидинова Г.Ф., Димиев А.М., Валева Е.В., Тимербулатова Г.А. Апоптоз как механизм гибели клеток дыхательной системы человека при воздействии углеродных нанотрубок. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(11): 1215–1223. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-11-1215-1223> <https://elibrary.ru/pndvie>

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

Участие авторов: Фатхутдинова Л.М. – дизайн исследования, анализ материала, подготовка статьи к публикации; Габидинова Г.Ф. – обзор литературы по теме исследования, культивирование клеток, проведение тестов на клетках, статистическая обработка данных, подготовка статьи к публикации; Димиев А.М. – разработка методов подготовки суспензий материалов для внесения в клетки; Валева Е.В. – анализ экспрессии генов в клетках; Тимербулатова Г.А. – обзор литературы по теме исследования, культивирование клеток, проведение тестов на клетках, обобщение полученных результатов, 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 при поддержке Российского научного фонда № 22-25-00512. <https://rscf.ru/project/22-25-00512/>

Поступила: 12.10.2023 / Принята к печати: 15.11.2023 / Опубликована: 08.12.2023

Liliya M. Fatkhutdinova¹, Gulnaz F. Gabidinova¹, Airat M. Dimiev², Elena V. Valeeva¹,
Gyuzel A. Timerbulatova¹

Apoptosis as a mechanism of human respiratory cell death upon exposure to carbon nanotubes

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

²Kazan Federal University, Kazan, 420008, Russian Federation

Introduction. Carbon nanotubes (CNTs) are a group of promising nanomaterials for industrial and biomedical applications. There has been shown influence of the physicochemical characteristics of CNTs on the toxic effects, including the ability to cause DNA damage and induce apoptosis. In this study, there was carried out a comparative assessment of pro-apoptotic effects under exposure to single-walled and multi-walled CNTs produced in Russia on human respiratory cells.

Materials and methods. Human bronchial epithelial cells BEAS-2B, alveolar epithelial cells A549, and lung fibroblasts MRC5-SV40 were exposed to pristine and purified TUBALL™ SWCNTs and Taunit-M MWCNTs. In cells exposed to 4 concentrations (100, 50, 0.03, 0.0006 µg/ml) of all types of CNTs for 72 hours, the level of mRNA of the P53, BAX and BCL2 genes, as well as the level of reactive oxygen species were assessed.

Results. All types of CNTs initiated apoptosis in human respiratory epithelial cells BEAS-2B and A549, but not in MRC5-SV40 lung fibroblasts. BEAS-2B were more sensitive to the effects of MWCNTs, while A549 were more sensitive to pristine SWCNTs. Apoptosis was initiated at low concentrations, including those corresponding to industrial exposures. The mechanism of oxidative stress could act as a factor in triggering apoptosis in lung epithelial cells.

Limitations. Relatively short (72 hours) cell incubation time and the use of 2D cell models that do not consider real cell interactions.

Conclusion. There were revealed differences in the mechanisms of initiation of the internal pathway of apoptosis and sensitivity to different types of CNTs depending on the type of epithelial cells. Comparative analysis of the initiation of apoptosis by different types of CNTs has shown that there are differences in potential target cells and toxic mechanisms, which should be considered in further studies.

Keywords: carbon nanotubes; BEAS-2B; A549; MRC5-SV40; apoptosis; P53; BCL2; BAX; gene expression

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

For citation: Fatkhutdinova L.M., Gabidinova G.F., Dimiev A.M., Valeeva E.V., Timerbulatova G.A. Apoptosis as a mechanism of human respiratory cell death upon exposure to carbon nanotubes. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(11): 1215–1223. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-11-1215-1223> <https://elibrary.ru/pndvie> (in Russian)

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

Information about the authors:

Fatkhutdinova L.M., <https://orcid.org/0000-0001-9506-563X>
Dimiev A.M., <https://orcid.org/0000-0001-7497-1211>
Timerbulatova G.A., <https://orcid.org/0000-0002-2479-2474>

Gabidinova G.F., <https://orcid.org/0000-0003-2616-5017>
Valeeva E.V., <https://orcid.org/0000-0001-7080-3878>

Contribution: Fatkhutdinova L.M. – research design, data analysis, manuscript writing and editing; Gabidinova G.F. – review of the literature, cell cultivation, cell tests, data processing, manuscript writing; Dimiev A.M. – development of methods for preparing suspensions of materials for introduction into cells; Valeeva E.V. – cell tests (gene expression); Timerbulatova G.A. – review of the literature, cell cultivation, cell tests, summarizing the results obtained manuscript writing; 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 12, 2023 / Accepted: November 15, 2023 / Published: December 8, 2023

Введение

Углеродные нанотрубки (УНТ), обладая исключительными физико-химическими свойствами, представляют собой группу перспективных наноматериалов для использования в промышленных и биомедицинских целях [1, 2]. Их диаметр составляет от долей до десятков нанометров, длина может достигать нескольких микрометров. Уникальные свойства УНТ выражаются в высоком модуле упругости – более 1 ТПа (модуль упругости алмаза составляет 1,2 ТПа); высокой прочности – в 10–100 раз превышающей прочность стали [3]; УНТ обладают превосходной термической стабильностью и высокой электропроводностью [4, 5]. Помимо этого УНТ обладают особыми электронными и оптическими свойствами [6].

Углеродные нанотрубки улучшают механические, электрические и термические свойства полимеров в составе композитных материалов и находят широкое применение в таких отраслях, как строительство, автомобилестроение, аэрокосмическая промышленность, энергетика [1, 2]. Свойства УНТ открывают широкий потенциал для их использования в электронике [2, 7], в составе материалов для защиты от коррозии [8], солнечных элементов [9], химических сенсоров [10], аккумуляторных батарей [11], в наномедицине и нанобиотехнологии [12].

С учётом растущих объёмов производства проведение исследований в области обеспечения безопасности при производстве и применении УНТ следует считать одним из приоритетных направлений, способствующих гармоничному развитию инновационной отрасли nanoиндустрии. Безопасность УНТ вызывает обеспокоенность у специалистов в области охраны труда и потребителей продукции. Малые размеры и высокая проникающая способность, большая площадь и физико-химические свойства поверхности УНТ и, как следствие, высокая реакционная способность обуславливают активное взаимодействие с биологическими объектами [1], что может служить причиной токсичности данного типа наноматериалов.

Высокая пропускная способность и гуманность экспериментов *in vitro*, а также потенциал для изучения молекулярно-клеточных механизмов являются важными преимуществами при выборе методов для оценки токсичности, в том числе наноматериалов [13]. Применение методов *in vitro* может значительно сократить количество животных в исследованиях, позволяет изучать эффекты и механизмы действия на различных типах клеточных культур и значительно снизить экспериментальную стоимость. Оценку ток-

сичности *in vitro*, как правило, проводят на культурах клеток (2D-, 3D-модели), а также на срезах культур высокой точности, которые получают из однородных тканей в стерильных условиях [13].

В исследованиях *in vitro* описаны такие эффекты многостенных и одностенных углеродных нанотрубок (МУНТ и ОУНТ), как индукция воспалительных процессов [14], снижение жизнеспособности клеток [14, 15], окислительный стресс [15, 16], повреждение ДНК [17], индукция апоптоза [18]. Выделяют разные пути реализации апоптоза в клетках млекопитающих: внутренний митохондриальный путь и внешний путь, инициированный «рецепторами смерти». Внутренний путь апоптоза реализуется через повышение проницаемости митохондриальных мембран и может запускаться при воздействии генотоксических агентов и образовании двухцепочечных разрывов [19, 20]. Ключевой белок, играющий роль в запуске внутреннего пути апоптоза, – белок p53, основным действием которого является регуляция транскрипции проапоптотических и антиапоптотических членов семейства белков Bcl2 [19, 21]. Проапоптотические белки, такие как Bax, Bid и Bak1, встраиваются во внешнюю митохондриальную мембрану и инициируют апоптоз [19, 21]. Высвобождающийся в цитозоль цитохром C связывается с фактором активации апоптотической пептидазы 1 (APAF1) и формирует апоптосому, которая активирует CASP9, CASP3, CASP6 и CASP7, и в конечном итоге приводит к апоптозу. Антиапоптотические белки данного семейства, такие как Bcl2, поддерживают в неактивном состоянии проапоптотический белковый комплекс. Изменение баланса между проапоптотическими и антиапоптотическими белками семейства Bcl2, в частности отношение Bax/Bcl2, сигнализирует о запуске апоптоза или выживании клетки. Регулятор p53 активирует транскрипцию BAX и одновременно подавляет экспрессию BCL2 [21].

В ряде исследований *in vitro* изучались механизмы апоптоза, индуцированного УНТ [22–25]. Отмечено, что повреждение ДНК под воздействием УНТ отмечалось наряду с апоптозом [22, 23]. Действие ОУНТ на нормальные эпителиальные клетки почек крыс (NRK-52E) вызвало подтверждение ДНК и повышение уровней белка p53 [22]. Внесение МУНТ в клетки фибробластов кожи человека (NHDF) также приводило одновременно к генотоксическим и апоптотическим эффектам [23]. Результаты исследования R. Srivastava и соавт. в клетках альвеолярного эпителия A549 продемонстрировали значительную активацию генов P53, BAX, CASP3 и снижение экспрессии BCL2 под действием МУНТ [24].

Таблица 1 / Table 1

Нуклеотидная последовательность специфических праймеров и их температурные условия отжига
Nucleotide sequences of specific primers and their annealing temperatures conditions

Ген Gene	Последовательность праймера от 5' к 3' / Primer sequence from 5' to 3'		Температура отжига, °C Annealing temperature, °C
	прямой / direct	обратный / inverse	
<i>BAX</i>	<i>GGG TGG TTG CCC TTT TCT ACT</i>	<i>CCC GGA GGA AGT CCA GTG TC</i>	56
<i>BCL2</i>	<i>ATG GGG TGA ACT GGG GGA TTG</i>	<i>TTC CGA ATT TGT TTG GGG CAG GTC</i>	56
<i>P53</i>	<i>GAC GGT GAC ACG CTT CCC TGG ATT</i>	<i>GGG AAC AAG AAG TGG AGA ATG TCA</i>	56
<i>GAPDH</i>	<i>GAC CAC AGT CCA TGC CAT CA</i>	<i>TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA</i>	63
<i>ACTB</i>	<i>AGC ACA GAG CCT CGC CTT</i>	<i>CAT CAT CCA TGG TGA GCT GG</i>	61

В одном из исследований показаны различия в реализации проапоптотических эффектов под действием МУНТ и ОУНТ в клетках бронхиального эпителия человека (16HBE14). Воздействие МУНТ привело к увеличению Bcl2 и подавлению активности каспазы-3/7, что, по предположению авторов, связано с процессом аутофагии клеток. Напротив, при воздействии ОУНТ наблюдалась сверхэкспрессия каспазы-3/7 и активация проапоптотического белка Bax, что ведёт к инициации апоптоза [25].

Таким образом, вышеперечисленные данные свидетельствуют о способности разных типов УНТ индуцировать апоптотические эффекты с реализацией внутреннего пути апоптоза наряду с генотоксическим действием. В то же время имеются данные о некоторых отличиях проапоптотических эффектов под действием МУНТ и ОУНТ, что может свидетельствовать о существенном влиянии физико-химических особенностей при реализации токсических эффектов УНТ. Следует учитывать, что полученные результаты могут быть специфичными для отдельных УНТ и существует необходимость оценки токсичности каждого вида УНТ.

С учётом вышеизложенного в настоящем исследовании проведена сравнительная оценка проапоптотических эффектов и механизмов их реализации при воздействии промышленных одностенных и многостенных УНТ российского производства на культурах клеток бронхиального эпителия BEAS-2B, альвеолярного эпителия A549 и фибробластов лёгких MRC5-SV40.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовались очищенные и неочищенные от металлических примесей ОУНТ TUBALL™ (производитель – группа-компания OCSIAI, Новосибирск) и МУНТ Таунит-М (производитель – ООО «НаноТехЦентр», Тамбов). Усреднённый диаметр МУНТ Таунит-М составил 8–15 нм, ОУНТ TUBALL™ – 1,6 ± 0,4 нм; длина – более 2 нм для МУНТ Таунит-М и более 5 нм для ОУНТ TUBALL™; ОУНТ TUBALL™ содержали включения железа, МУНТ Таунит-М – включения кобальта (данные предоставлены производителями).

Дисперсии УНТ готовили по тому же протоколу, что и в ранее опубликованном исследовании [26]. УНТ суспендировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (ПанЭко, С410П, Россия) с добавлением 10%-й фетальной бычьей сыворотки (BioSera, Франция) и антибиотиков пенициллина и стрептомицина (25 000 ЕД и 25 000 мкг, 100-кратно лиофилизированный препарат, ПанЭко, Россия). Исходные дисперсии с концентрацией 200 мкг/мл готовили в биологическом боксе с использованием ультразвукового аппарата Sonic Vibra Cell Sonicator (Sonics&Materials, США) при следующих рабочих параметрах: 750 Вт, 20 кГц, амплитуда 40%, импульс 5/6, время 30 мин, остальные необходимые концентрации получали путём разведения. Наши предыдущие исследования показали, что аналогичные по мощности и при этом более длительные режимы ультразвуковой обработки при подготовке суспензий в 1% растворе

додецилсульфата натрия не приводили к существенным повреждениям и разрывам УНТ [27]. Характеристики полученных биосовместимых дисперсий оценивали методами динамического светорассеяния (анализатор Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Великобритания) и трансмиссионной электронной микроскопии (Hitachi HT7700 Exalens, Япония). При изучении динамического светорассеяния каждый образец анализировали не менее трёх раз, при этом одно измерение состояло из 15 повторений по 10 с каждое.

Диапазон исследуемых концентраций подбирался на основе анализа нетоксических и токсических концентраций по результатам исследований других авторов, а также включал концентрации, соответствующие реальным производственным экспозициям [28].

В качестве клеточных моделей были выбраны различные типы резидентных клеток дыхательной системы человека: нормальная линия клеток бронхиального эпителия человека BEAS-2B (Cell Applications, Inc., США); линия клеток аденокарциномы лёгких человека A549 (CLS Cell Lines Service, Германия), моделирующая эпителиальные клетки дыхательной системы; SV40-трансформированные клетки, полученные из диплоидных фибробластов лёгких человека MRC5, представляющие собой стромальные клетки (клетки предоставлены Черняком Б.В., НИИ физической химии им. А.Н. Белозерского МГУ). Клетки культивировали в среде DMEM с 10%-й фетальной бычьей сывороткой и антибиотиками пенициллином и стрептомицином. Клетки выращивали во влажной атмосфере с 5% CO₂ при температуре 37 °C. Клеточные культуры высевали в чашки для клеточных культур или 96-луночные планшеты в зависимости от анализа и оставляли для прикрепления в течение 48 ч перед экспериментами.

В клетках, подвергшихся воздействию 4 концентраций (100; 50; 0,03; 0,0006 мкг/мл) всех типов исследуемых УНТ в течение 72 ч, оценивали уровень мРНК генов *P53*, *BAX* и *BCL2*. Суммарную РНК получали из суспензий клеток фенол-хлороформным методом экстракции с использованием реагента TRIzol™ (Invitrogen, США). Хранили полученные образцы мРНК при минус 20 °C. Качество и количество выделенной РНК оценивали спектрофотометрически на приборе Nanodrop Lite (ThermoFisher, США). Проводили последующий синтез кДНК с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно инструкции фирмы-производителя. Уровень мРНК оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для набора оцениваемых генов проводили эксперименты, в которых варьировали количество циклов и температуру отжига праймеров. Условия амплификации и последовательности праймеров приведены в табл. 1. В качестве референтного гена использовали гены «домашнего хозяйства»: *GAPDH* для клеток BEAS-2B и MRC5-SV40 и *ACTB* – для клеток A549. Синтез олигонуклеотидных праймеров, согласно приведённым последовательностям, проводила компания «Евроген» (Россия). Для амплификации полученных кДНК использовали коммерческую смесь для ПЦР 5x qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) и термоциклер CXF96 (BioRad, США).

Проводили денатурацию при 96 °С в течение 3 мин; далее 40 циклов, включающих денатурацию при 96 °С в течение 10 с, отжиг и визуализацию, согласно подобранным температурам отжига для каждого отдельного праймера, и мелтинг для оценки пройденной реакции. Каждый образец ставился отдельно и выполнен в трёх повторностях. Расчёт оценки уровня мРНК генов проводился методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ относительно контроля для каждой клеточной линии.

Для количественной оценки активных форм кислорода (АФК) в образцах живых клеток использовали набор для анализа АФК DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Assay Kit (Abcam, Великобритания), основанный на диффузии реагента 2,7-дихлорофлуоресциндацетата в клетку, где он окисляется активными формами кислорода до обладающего флуоресценцией соединения 2,7-дихлорфлуоресцеина. Исследовались 4 концентрации УНТ (100; 50; 0,03; 0,0006 мкг/мл) в трёх типах клеточных культур после 72-часовой экспозиции. В качестве положительного контроля использовали трет-бутилгидропероксид (ТВНР), в качестве отрицательного контроля – клетки без воздействия. Каждая концентрация УНТ была исследована в трёх повторностях. Клетки культивировали в 96-луночном планшете, перед измерением уровня АФК насливали 100 мкл раствора DCFDA в концентрации 50 мкмоль, инкубировали 40 мин при 37 °С. Флуоресценцию измеряли при 485/535 нм на микропланшетном ридере Varioskan LUX (ThermoFisher Scientific, Германия). Уровень окислительного стресса выражали в виде кратного увеличения относительно отрицательного контроля.

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2016 и пакета R. Для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли *t*-критерий Стьюдента. При $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми, при $p < 0,1$ результат рассматривали как тенденцию. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение. Для интегральной оценки уровня мРНК генов – маркёров апоптоза использовался анализ главных компонент.

Результаты

Методом динамического светорассеяния выявлено присутствие УНТ в исходных суспензиях в двух различных формах: агломератах и пучках. Во всех трёх типах УНТ основной пик наблюдался в диапазоне 100–1000 нм. Кроме того, для МУНТ и неочищенных ОУНТ вторичный пик был идентифицирован в диапазоне от 10 до 100 нм, а для очищенных ОУНТ – в диапазоне от 1000 до 10 000 нм. Средний размер агломератов МУНТ в дисперсиях был в несколько раз меньше, чем у обоих типов ОУНТ: $242,37 \pm 3,11$ нм для МУНТ, $604,4 \pm 23,07$ нм для неочищенных ОУНТ и $847,43 \pm 27,3$ нм для очищенных ОУНТ. Просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) использовали для получения изображений отдельных нанотрубок, жгутов и кластеров УНТ в биосовместимых дисперсиях. ОУНТ наблюдались в виде жгутов и агломератов, тогда как МУНТ обнаруживались в виде отдельных нанотрубок. Данное обстоятельство отражает физико-химические особенности разных типов УНТ, в том числе их способность к диспергированию. Получение биосовместимых суспензий ОУНТ TUBALL™ в отличие от других УНТ является весьма сложной задачей [29], которую нам удалось успешно решить в ходе предварительных экспериментов [26].

В клетках бронхиального эпителия BEAS-2B, инкубированных в течение 72 ч со 100 мкг/мл (наиболее высокая из изученных концентраций) уровень экспрессии гена-супрессора опухолевого роста *P53* оказался выше контроля, для неочищенных ОУНТ различия с контролем были статистически значимыми (рис. 1).

Чаще всего апоптоз клеток реализуется по митохондриальнозависимому внутреннему пути апоптоза, в кото-

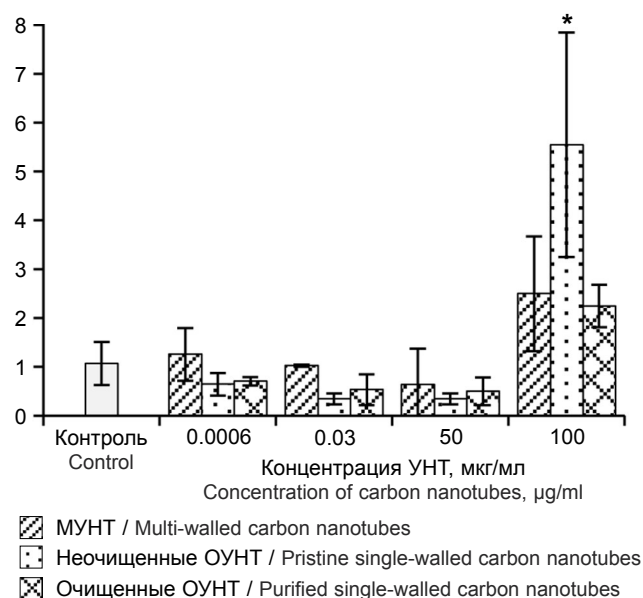


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии гена *P53* в клетках линии BEAS-2B после воздействия исследуемых материалов (инкубация – 72 ч): среднее значение \pm стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Fig. 1. Relative level of *P53* gene expression in BEAS-2B cell line after exposure to materials under study (incubation – 72 hours): mean \pm standard deviation; * – $p < 0.05$ for comparison with control.

ром участвует ряд связанных с апоптозом белков, включая проапоптотический белок *Bax*, опосредующий сигналы гибели клетки, и антиапоптотический белок *Bcl2*, ингибирующий апоптоз и продлевающий выживание клеток. Баланс данных белков может детерминировать инициацию апоптоза. В клетках бронхиального эпителия BEAS-2B, подвергшихся воздействию МУНТ, уровень экспрессии гена *P53* не отличался от контроля (см. рис. 1). При этом после экспозиции к МУНТ в концентрациях 0,0006 и 0,03 мкг/мл наблюдалось повышение экспрессии гена *BAX* и сниженная экспрессия гена *BCL2* (рис. 2, табл. 2), что свидетельствует о процессе инициации апоптоза; на более высоких концентрациях 50 и 100 мкг/мл признаки апоптоза уже отсутствовали. Наши более ранние исследования, показавшие статистически значимое повышение уровня ЛДГ в аналогичном по дизайну эксперименте [28, 30], позволяя предположить включение на высоких концентрациях отличного от апоптоза механизма гибели клеток (некроз, некроптоз, аутофагия клеток) [31]. Выраженность эффектов ОУНТ на клетках BEAS-2B отличалась от эффектов МУНТ: инициация апоптоза происходила лишь на высокой концентрации 100 мкг/мл – при воздействии неочищенных ОУНТ TUBALL™ наряду с отмеченным выше повышением экспрессии *P53* (см. рис. 1) повышалась экспрессия проапоптотического гена *BAX* (см. рис. 2), а при экспозиции очищенных ОУНТ TUBALL™ снижалась экспрессия гена *BCL2* с изменением баланса *BAX/BCL2* до 2,68 на концентрации 100 мкг/мл (см. табл. 2).

Выявленные закономерности свидетельствуют об инициации внутреннего пути апоптоза при воздействии УНТ на клетки BEAS-2B и наличии существенных различий в чувствительности клеток бронхиального эпителия к различным типам УНТ, что может быть связано с физико-химическими свойствами последних.

В клетках альвеолярного эпителия A549 многостенные углеродные нанотрубки статистически значимо повышали экспрессию гена *P53* по сравнению с контролем начиная с

Original article

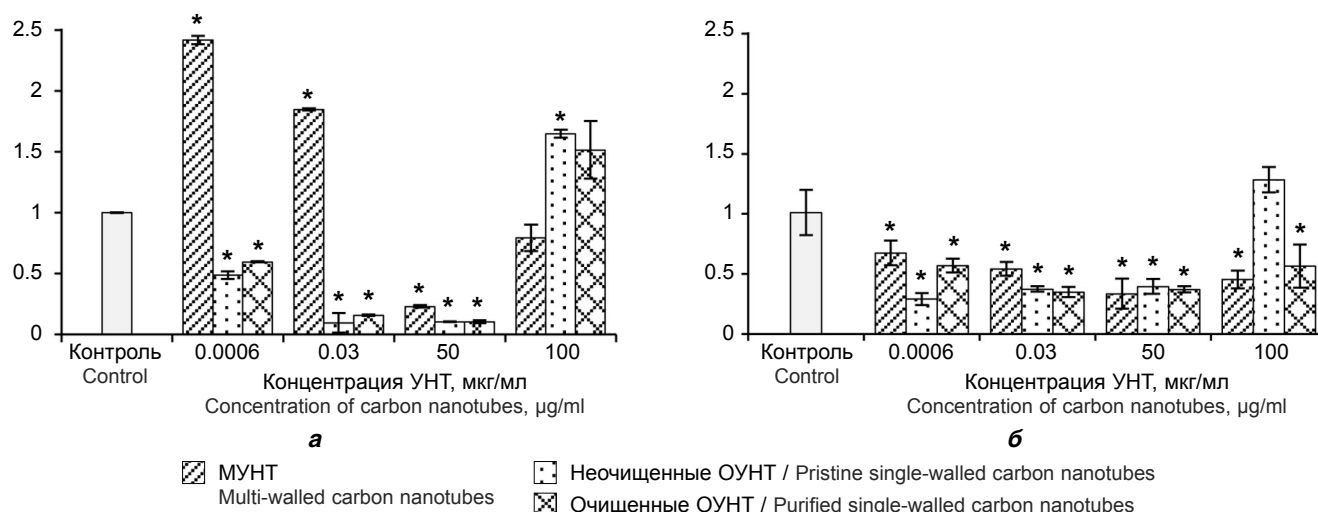


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов семейства Bcl2 (а – BAX, б – BCL2) в клетках линии BEAS-2B после воздействия исследуемых материалов (инкубация – 72 ч): среднее значение ± стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Fig. 2. Relative level of Bcl2-associated protein gene expression (a – BAX, б – BCL2) in BEAS-2B cell line after exposure to materials under study (incubation – 72 hours): mean ± standard deviation; * – $p < 0.05$ for comparison with control.

концентрации 0,03 мкг/мл (рис. 3); статистически значимое увеличение экспрессии генов *BAX* и *BCL2* (с повышением соотношения *BAX/BCL2* до 1,5) наблюдалось на концентрации 100 мкг/мл (рис. 4). Для неочищенных ОУНТ экспрессия гена *P53* статистически значимо повышалась уже на самой низкой концентрации 0,0006 мкг/мл; для очищенных ОУНТ – начиная с 0,03 мкг/мл; на 100 мкг/мл признаки апоптоза уже отсутствовали (см. рис. 3). При этом на всём диапазоне концентраций соотношение *BAX/BCL2* при экспонировании клеток A549 к ОУНТ было выше 1 (статистически значимо для неочищенных ОУНТ в концентрациях 0,0006 и 100 мкг/мл), свидетельствуя о преобладании проапоптотических процессов над антиапоптотическими (см. табл. 2).

В экспериментах с культурой фибробластов лёгких MRC5-SV40 признаков апоптоза при воздействии на клетки МУНТ обнаружено не было (рис. 5, 6). Для ОУНТ, несмотря на положительную экспрессию гена *P53* (см. рис. 5), наблюдалась тенденция к смещению соотношения *BAX/BCL2* в сторону повышенной экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* на всём диапазоне изученных концентраций, что может свидетельствовать об ингибировании апоптоза (см. табл. 2).

Для изучения потенциального патогенетического механизма, который может выступить как фактор запуска внутреннего пути апоптоза, в изучаемых клеточных культурах определялся относительный уровень активных форм кислорода. Установлено, что статистически значимое повышение

Таблица 2 / Table 2

Отношение *BAX/BCL2* в культурах клеток BEAS-2B, A549, MRC5-SV40 при воздействии различных типов УНТ
BAX/BCL2 ratio in BEAS-2B, A549, MRC5-SV40 cells cultures under exposure to different types of CNT

Исследуемый материал Material under study	Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	<i>BAX/BCL2</i> , среднее значение ± стандартное отклонение <i>BAX/BCL2</i> , mean ± standard deviation		
		BEAS-2B	A549	MRC5
Отрицательный контроль Negative control	–	0.98 ± 0.17	1.07 ± 0.35	1.00 ± 0.19
МУНТ Таунит-М MWCNT Taunit-M	0.0006	3.59 ± 0.48	1.97 ± 0.87	0.26 ± 0.07
	0.03	3.41 ± 0.39	0.43 ± 0.21	0.52 ± 0.08
	50	0.69 ± 0.29	0.89 ± 0.49	0.43 ± 0.34
	100	1.75 ± 0.55	1.50 ± 0.55	0.46 ± 0.37
Очищенные ОУНТ TUBALL™ Purified SWCNT TUBALL™	0.0006	1.04 ± 0.11	3.57 ± 2.20	0.51 ± 0.23
	0.03	0.45 ± 0.04	1.95 ± 1.00	0.39 ± 0.14
	50	0.28 ± 0.05	4.73 ± 2.68	0.14 ± 0.06
	100	2.68 ± 0.38	1.13 ± 0.03	0.09 ± 0.01
Неочищенные ОУНТ TUBALL™ Pristine SWCNT TUBALL™	0.0006	1.68 ± 0.39	2.83 ± 0.34	0.03 ± 0.0003
	0.03	0.26 ± 0.23	1.05 ± 0.21	0.41 ± 0.48
	50	0.26 ± 0.05	1.83 ± 0.14	0.20 ± 0.18
	100	1.28 ± 0.08	7.73 ± 0.51	0.31 ± 0.04

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – жирным шрифтом выделены значения, имеющие статистически значимые различия с контролем на уровне $p < 0,05$.

Note: Here and in the Table. 3: * – values that have statistically significant differences with the control at the level of $p < 0.05$ are highlighted in bold.

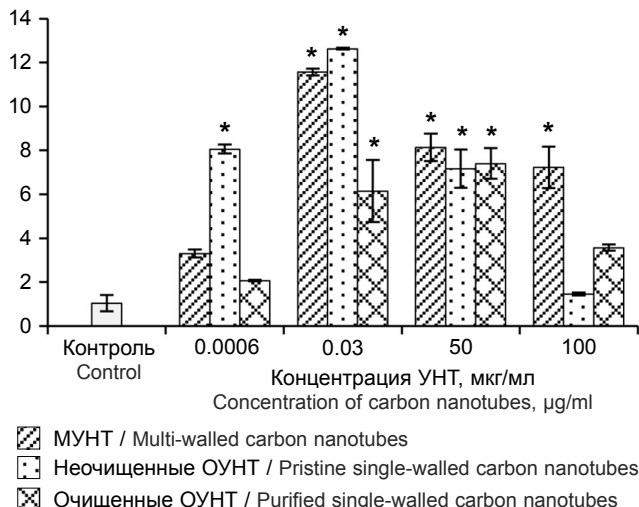


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии гена *P53* в клетках альвеолярного эпителия А549 после воздействия исследуемых материалов (инкубация – 72 ч): среднее значение ± стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Fig. 3. Relative level of *P53* gene expression in A549 cell line after exposure to materials under study (incubation – 72 hours): mean ± standard deviation; * – $p < 0.05$ for comparison with control.

активных форм кислорода происходило во всех типах клеток дыхательной системы человека при воздействии УНТ всех типов, начиная с 50 мкг/мл (табл. 3).

Относительный уровень активных форм кислорода соотносился с уровнем интегрального показателя, в качестве которого рассматривалась первая главная компонента, полученная в результате обработки массива данных по маркерам апоптоза (уровень экспрессии генов *P53*, *BAX*, *BCL2*) методом главных компонент. Компонента объясняла 84,2% дисперсии признаков со следующим коэффициентами вклада исходных показателей (уровень экспрессии *P53*, *BAX*, *BCL2*): 0,55; 0,60; 0,58. С учётом структуры данной компоненты её

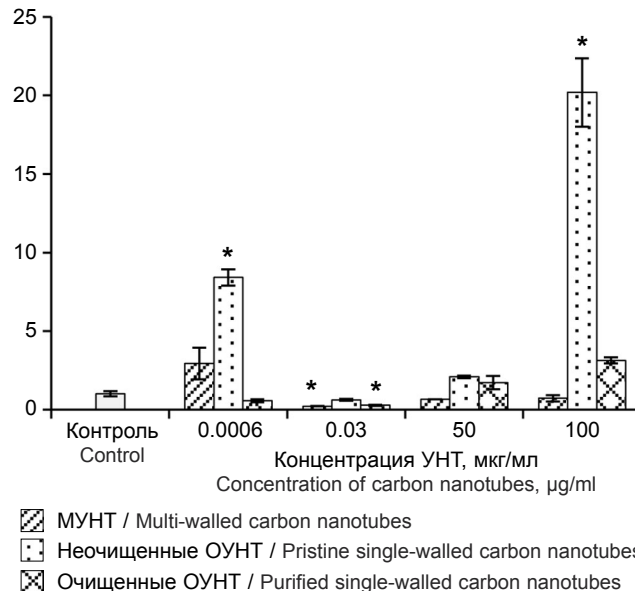


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии гена *P53* в фибробластах лёгких MRC5-SV40 после воздействия исследуемых материалов (инкубация – 72 ч): среднее значение ± стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Fig. 5. Relative level of *P53* gene expression in lung fibroblasts MRC5-SV40 cell line after exposure to materials under study (incubation – 72 hours): mean ± standard deviation; * – $p < 0.05$ for comparison with control.

значения отражают интенсивность реализации внутреннего пути апоптоза, характеризующегося одновременным повышением экспрессии генов *P53*, проапоптотического (*BAX*) и антиапоптотического (*BCL2*) белков со сдвигом равновесия в сторону проапоптотических белков. Более высокие уровни активных форм кислорода в клетках были связаны ($p = 0,08$) с более высоким значением данного интегрального показателя, что можно рассматривать как проявление тенденции и заслуживает дальнейшего изучения.

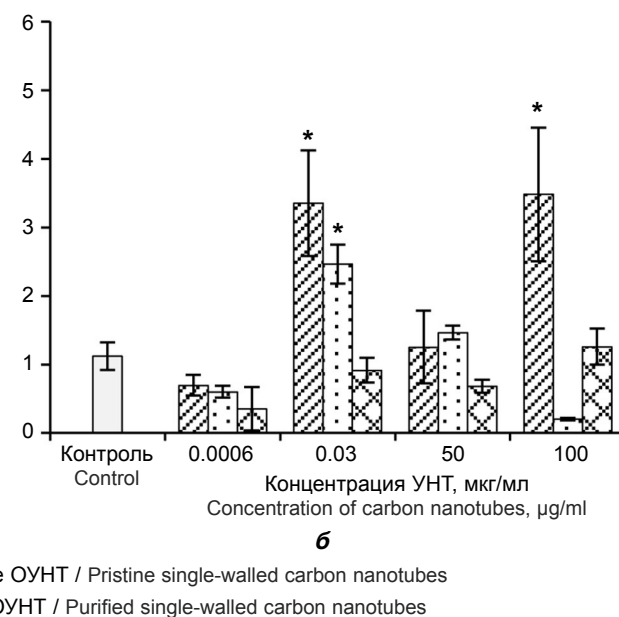
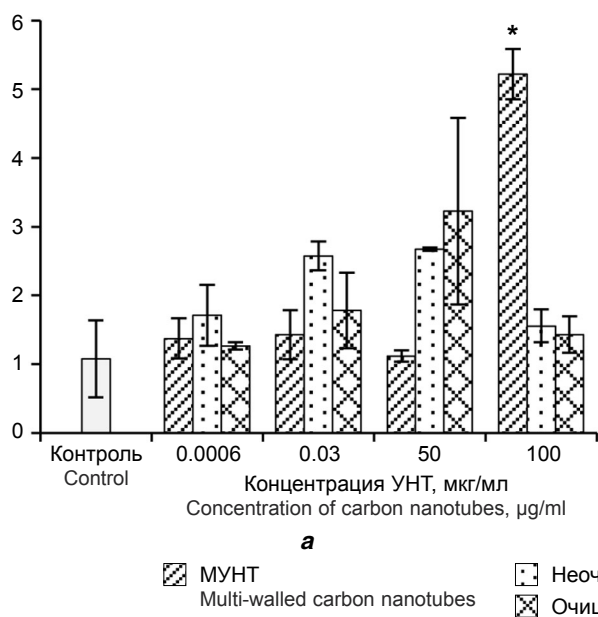


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов семейства Bcl2 (а – *BAX*, б – *BCL2*) в клетках альвеолярного эпителия А549 после воздействия исследуемых материалов (инкубация – 72 ч): среднее значение ± стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Fig. 4. Relative level of Bcl2-associated protein gene expression (а – *BAX*, б – *BCL2*) in A549 cell line after exposure to materials under study (incubation – 72 hours): mean ± standard deviation; * – $p < 0.05$ for comparison with control.

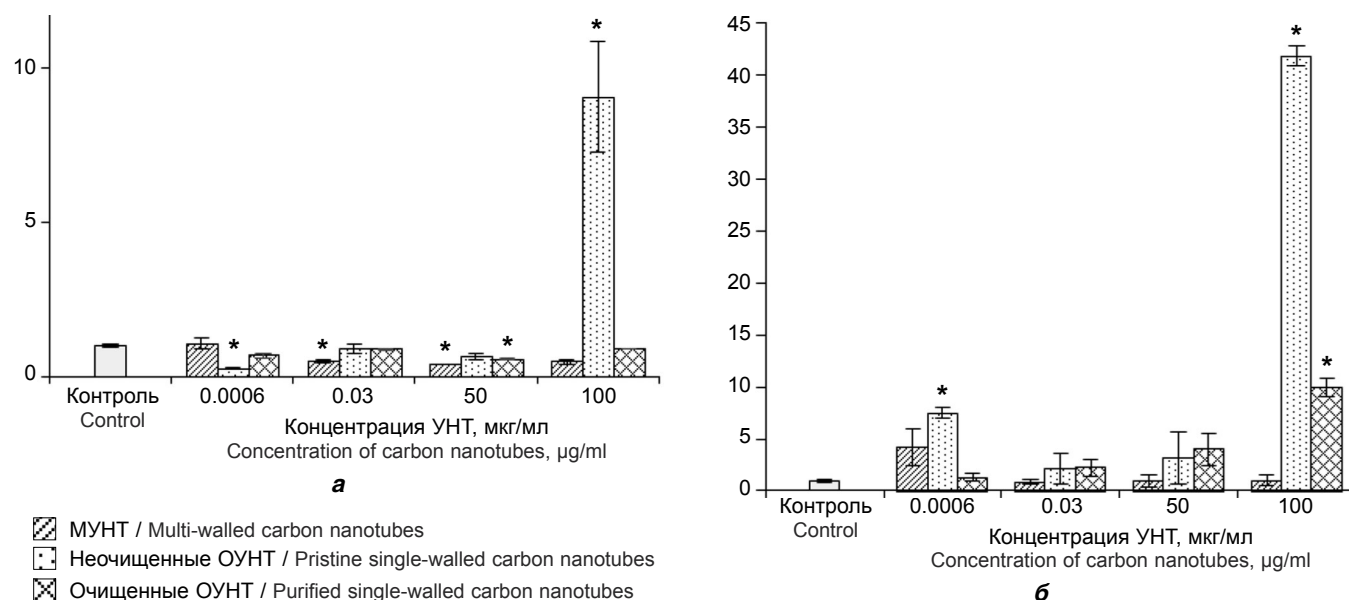


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии генов семейства Bcl2 (*a* – BAX, *б* – BCL2) в фибробластах лёгких MRC5-SV40 после воздействия исследуемых материалов (инкубация – 72 ч): среднее значение ± стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Fig. 6. Relative level of Bcl2-associated protein gene expression (*a* – BAX, *б* – BCL2) in lung fibroblasts MRC5-SV40 cell line after exposure to materials under study (incubation – 72 hours): mean ± standard deviation; * – $p < 0.05$ for comparison with control.

Таблица 3 / Table 3

Уровни активных форм кислорода в культурах клеток BEAS-2B, A549, MRC5 при воздействии различных типов УНТ
ROS levels in BEAS-2B, A549, MRC5 cells under exposure to different types of CNT

Исследуемый материал Material Under study	Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Относительный уровень активных форм кислорода, кратное увеличение по сравнению с контролем Relative ROS level, fold increase compared to control		
		BEAS-2B	A549	MRC5
Отрицательный контроль / Negative control	–	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03
МУНТ Таунит-М MWCNT Taunit-M	0.0006	0.81 ± 0.02	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.03
	0.03	0.98 ± 0.02	0.93 ± 0.04	0.93 ± 0.04
	50	3.69 ± 0.16	2.07 ± 0.13	2.68 ± 0.14
	100	6.21 ± 0.78	3.31 ± 0.20	4.92 ± 0.24
Очищенные ОУНТ TUBALL™ Purified SWCNT TUBALL™	0.0006	0.90 ± 0.05	0.93 ± 0.03	0.84 ± 0.02
	0.03	0.88 ± 0.02	0.95 ± 0.03	0.96 ± 0.02
	50	5.63 ± 0.09	6.25 ± 0.09	6.59 ± 0.17
	100	6.87 ± 0.17	8.04 ± 0.01	8.35 ± 0.01
Неочищенные ОУНТ TUBALL™ Pristine SWCNT TUBALL™	0.0006	0.91 ± 0.001	0.96 ± 0.01	0.86 ± 0.02
	0.03	0.90 ± 0.03	1.02 ± 0.14	0.96 ± 0.002
	50	5.71 ± 0.14	8.35 ± 0.13	7.55 ± 0.20
	100	6.43 ± 0.01	8.82 ± 0.20	8.17 ± 0.27

Обсуждение

Все изученные в эксперименте типы УНТ вызывали апоптоз эпителиальных клеток дыхательной системы человека BEAS-2B и A549. При экспонировании клеток бронхиального эпителия BEAS-2B к УНТ происходило повышение экспрессии гена проапоптотического белка BAX и (или) снижение экспрессии гена BCL2; при этом МУНТ оказывали более выраженное повреждающее действие на клетки BEAS-2B. Второй механизм, проявившийся повышением экспрессии P53, проапоптотического (BAX) и антиапоптотического (BCL2) генов с выраженным сдвигом равновесия в сторону проапоптотического гена, наблюдался на клетках лёгочного

эпителия A549, независимо от типа УНТ; как было показано выше, этот механизм апоптоза может быть опосредован образованием активных форм кислорода.

Апоптоз как механизм гибели клеток инициировался в основном на низких концентрациях, в том числе – в случаях воздействия МУНТ на клетки BEAS-2B и неочищенных ОУНТ на клетки A549 – на самой низкой концентрации 0,0006 мкг/мл, соответствующей потенциальным производственным экспозициям. Отсутствие признаков апоптоза на высоких цитотоксических концентрациях, отмеченное для клеток BEAS-2B, подвергшихся воздействию МУНТ, и клеток A549, экспонированных к ОУНТ, возможно, объясняется массовой гибелью клеток вследствие некроза, некроптоза

или аутофагии [31, 32]. Как отмечалось выше, в ряде исследований было показано, что воздействие УНТ приводило одновременно к генотоксическим и апоптотическим эффектам [22, 23]. Известно, что повреждение клеточной ДНК может явиться одним из факторов инициации апоптоза [31]. Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные позволяют предположить потенциальное повреждение ДНК эпителиальных клеток дыхательной системы человека в ответ на воздействие УНТ в нецитотоксическом диапазоне концентраций, что требует дальнейшей верификации.

Сравнительный анализ инициации апоптоза различными типами УНТ показывает, что существуют различия в реакции потенциальных клеток-мишеней. В частности, при изучении генотоксичности и канцерогенных эффектов МУНТ следует обратить внимание на бронхиальное дерево и поиск отличных от окислительного стресса механизмов токсического действия. Лёгкие могут явиться органом-мишенью для разных типов УНТ с большей чувствительностью для одностенных углеродных нанотрубок, и окислительный стресс, возможно, играет важную роль в повреждении клеток.

С учётом того, что токсичность УНТ в экспериментах *in vitro* может варьировать в зависимости от их длины, диаметра, способа получения, дисперсности и используемой культуральной среды [32], при экстраполяции полученных результатов на другие типы УНТ и при иных способах подготовки материалов для внесения в биологические системы необходимо учитывать применённую методику диспергирования. Ограничениями настоящего исследования являются

также относительно короткое (72 ч) время экспозиции клеток и применение 2D-клеточных моделей, не учитывающих реальные взаимодействия клеток. Разработка и применение бескаркасных 3D-клеточных моделей, в том числе сокультур, является перспективным направлением для повышения точности экстраполяции результатов от моделей *in vitro* к моделям на живых организмах.

Заключение

Все изученные в эксперименте типы УНТ инициировали апоптоз эпителиальных клеток дыхательной системы человека BEAS-2B и A549, но не фибробластов лёгких. При этом выявлены различия в механизмах реализации внутреннего пути апоптоза и чувствительности к разным типам УНТ в зависимости от вида эпителиальных клеток. Клетки бронхиального эпителия BEAS-2B были более чувствительны к воздействию МУНТ, тогда как клетки лёгочного эпителия A549 – к ОУНТ с металлическими включениями, что проявлялось признаками инициации апоптоза на низких концентрациях, в том числе соответствовавших потенциальным производственным экспозициям. Механизм окислительного стресса может выступать фактором запуска апоптоза в клетках лёгочного эпителия. Сравнительный анализ инициации апоптоза различными типами УНТ показывает, что существуют различия в потенциальных клетках-мишенях и токсических механизмах, что необходимо учитывать в дальнейших исследованиях.

Литература

(п.п. 1–27, 29, 31 см. References)

28. Тимербулатова Г.А., Дунаев П.Д., Димиев А.М., Габидинова Г.Ф., Хаертдинов Н.Н., Фахруллин Р.Ф. и др. Сравнительная характеристика различных волоконистых материалов в экспериментах *in vitro*. *Казанский медицинский журнал*. 2021; 102(4): 501–9. <https://doi.org/10.17816/KMJ2021-501> <https://elibrary.ru/wlppem>
30. Габидинова Г.Ф., Тимербулатова Г.А., Даминова А.Г., Галялдинов Ш.Ф., Димиев А.М., Крючкова М.А. и др. Оценка воздействия промышленных одностенных и многостенных углеродных нано-

- трубок на культуры эпителиальных клеток дыхательных путей человека. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(12): 1509–20. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-12-1509-1520> <https://elibrary.ru/ivtviw>
32. 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): 176–86. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-2-176-186> <https://elibrary.ru/yirfel>

References

1. Eatemadi A., Daraee H., Karimkhanloo H., Kouhi M., Zarghami N., Akbarzadeh A., et al. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Res. Lett.* 2014; 9(1): 393. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-393>
2. 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>
3. Ahmadi M., Zabihi O., Masoomi M., Naebe M. Synergistic effect of MWCNTs functionalization on interfacial and mechanical properties of multi-scale UHMWPE fibre reinforced epoxy composites. *Comp. Sci. Technol.* 2016; 134: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2016.07.026>
4. Collins P.G., Avouris P. Nanotubes for electronics. *Sci. Am.* 2000; 283(6): 62–9. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1200-62>
5. Maruyama B., Alam K. Carbon nanotubes and nanofibers in composite materials. *Sampe J.* 2002; 38(3): 59–70.
6. Morsi M.A., Rajeh A., Al-Muntaser A.A. Reinforcement of the optical, thermal and electrical properties of PEO based on MWCNTs/Au hybrid fillers: Nanodielectric materials for organoelectronic devices. *Compos. Part B Eng.* 2019; 173: 106957. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.106957>
7. Ajori S., Ansari R., Darvizeh M. Vibration characteristics of single- and double-walled carbon nanotubes functionalized with amide and amine groups. *Physica B Condens. Matter.* 2015; 462: 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2015.01.003>
8. Hassan A.G., Mat Yajid M.A., Saud S.N., Bakar T.A., Arshad A., Mazlan N. Effects of varying electrodeposition voltages on surface morphology and corrosion behavior of multi-walled carbon nanotube coated on porous Ti-30 at. % Ta shape memory alloys. *Surf. Coat. Technol.* 2020; 401: 126257. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126257>
9. Chen M., Zhao G., Shao L.L., Yuan Zh., Jing Q., Huang K., et al. Controlled synthesis of nickel encapsulated into nitrogen-doped carbon nanotubes with covalent bonded interfaces: the structural and electronic modulation strategy

- for efficient electrocatalyst in dye-sensitized solar cells. *Chem. Materials*. 2017; 29(22): 9680–94. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b03385>
10. Nurazzi N., Demon N., Zulaikha S. Composites based on conductive polymer with carbon nanotubes in DMMP gas sensors – an overview. *Polimery*. 2021; 66(2): 85–98. <https://doi.org/10.14314/polimery.2021.2.1>
11. Guo F., Kang T., Liu Z., Tong B., Guo L., Wang Y., et al. Advanced lithium metal-carbon nanotube composite anode for high-performance lithium-oxygen batteries. *Nano Lett.* 2019; 19(9): 6377–84. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02560>
12. Bianco A., Kostarelos K., Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005; 9(6): 674–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.005>
13. NANoREG. Validated protocols for test item preparation for key *in vitro* and ecotoxicity studies; 2016.
14. Adhwa S., Rea C., O'Hare P., Mathur A., Roy S.S., Dunlop P.S., et al. Comparative *in vitro* cytotoxicity study of carbon nanotubes and titania nanostructures on human lung epithelial cells. *J. Hazard. Mater.* 2011; 191(1–3): 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.035>
15. 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>
16. Park E.J., Zahari N.E., Lee E.W., Song J., Lee J.H., Cho M.H., et al. SWCNTs induced autophagic cell death in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. In Vitro*. 2014; 28(3): 442–50. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.012>
17. 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. <https://doi.org/10.1080/15287390701601251>
18. Clift M.J., Endes C., Vanhecke D., Wick P., Gehr P., Schins R.P., et al. A comparative study of different *in vitro* lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes. *Toxicol. Sci.* 2014; 137(1): 55–64. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft216>

Original article

19. Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66(8): 1547–54. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00510-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00510-0)
20. Wang J.Y.J. DNA damage and apoptosis. *Cell Death Diff.* 2001; 8(11): 1047–8. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400938>
21. Basu A., Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol. Hum. Reprod.* 1998; 4(12): 1099–109. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.12.1099>
22. Nam C.W., Kang S.J., Kang Y.K., Kwak M.K. Cell growth inhibition and apoptosis by SDS-solubilized single-walled carbon nanotubes in normal rat kidney epithelial cells. *Arch. Pharm. Res.* 2011; 34(4): 661–9. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0417-4>
23. Patlolla A., Knighten B., Tchounwou P. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. *Ethn. Dis.* 2010; 20(1 Suppl. 1): S1-65-72.
24. Srivastava R.K., Pant A.B., Kashyap M.P., Kumar V., Lohani M., Jonas L., et al. Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549. *Nanotoxicol.* 2011; 5(2): 195–207. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.503944>
25. 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>
26. Timerbulatova G., Boichuk S., Dunaev P., Porfiriyeva N.N., Fatkhutdinova L.M., Dimiev A., et al. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in biocompatible environments. *Nanotechnol. Russ.* 2020; 15(7–8): 437–44. <https://doi.org/10.1134/S1995078020040163> <https://elibrary.ru/biepln>
27. Khamidullin T., Galyaltdinov Sh., Valimukhametova A., Brusko V., Khannanov A., Maat S., et al. Simple, cost-efficient and high throughput method for separating single-wall carbon nanotubes with modified cotton. *Carbon.* 2021; 178: 157–63. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.03.003>
28. Timerbulatova G.A., Dunaev P.D., Dimiev A.M., Gabidinova G.F., Khaertdinov N.N., Fakhrullin R.F., et al. Comparative characteristics of various fibrous materials in *in vitro* experiments. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2021; 102(4): 501–9. <https://doi.org/10.17816/KMJ2021-501> <https://elibrary.ru/wlppem> (in Russian)
29. Predtechenskiy M.R., Khasin A.A., Bezrodny A.E., Bobrenok O.F., Dubov D.Yu., Muradyan V.E., et al. New perspectives in SWCNT applications: Tuball SWCNT. Part 1. Tuball by itself – All you need to know about it. *Carbon Trends.* 2022; 8: 100175. <https://doi.org/10.1016/j.cartre.2022.100175>
30. Gabidinova G.F., Timerbulatova G.A., Daminova A.G., Galyaltdinov Sh.F., Dimiev A.M., Kryuchkova M.A., et al. 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): 1509–20. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-12-1509-1520> <https://elibrary.ru/ivtviw> (in Russian)
31. Mohammadinejad R., Moosavi M.A., Tavakol S., Vardar D.Ö., Hosseini A., Rahmati M., et al. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy.* 2019; 15(1): 4–33. <https://doi.org/10.1080/1554862.2018.1509171>
32. Gmshinskiy I.V., Khotimchenko S.A., Riger N.A., Nikityuk D.B. Carbon nanotubes: mechanisms of the action, biological markers and *in vivo* toxicity assessment (review of literature). *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal).* 2017; 96(2): 176–86. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-2-176-186> <https://elibrary.ru/yirfel> (in Russian)