



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2026

Фатхутдинова Л.М., Тимербулатова Г.А., Габидинова Г.Ф.

## Подходы к оценке *in vitro* генотоксичного потенциала наноматериалов (на примере углеродных нанотрубок)

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, Казань, Российская Федерация

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** Углеродные нанотрубки (УНТ) – высокотехнологичные материалы, однако их генотоксический и канцерогенный потенциал изучен недостаточно. Для оценки генотоксичности УНТ необходимы альтернативные методы *in vitro*, разработка которых невозможна без предварительного изучения механизмов повреждения ДНК.

**Материал и методы.** Исследование проведено на 2D- и 3D-культурах клеток дыхательной системы человека. Исследованы эффекты российских одностенных (ОУНТ TUBALL™, очищенные и неочищенные) и многостенных (МУНТ «Таунит-М») УНТ. Цитотоксичность УНТ оценивали с помощью MTS-теста и анализа лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Генотоксический потенциал исследовали методом ДНК-комет. Локализацию УНТ в клетках определяли методом просвечивающей электронной микроскопии. Для выявления окислительного стресса измеряли уровень активных форм кислорода (АФК) с использованием набора DCFDA. Профиброгенную и проапоптотическую активность УНТ определяли по экспрессии генов (*TGF-β1*, *P53*, *Bax*, *Bcl2*) методом ПЦР в реальном времени.

**Результаты.** Наибольшую чувствительность к цитотоксичности УНТ показали фибробласты, наименьшую – клетки A549. Генотоксичность УНТ выявлена на всех клетках при концентрации 20 мкг/мл. Все УНТ проникали в клетки, МУНТ обнаруживались в ядре клеток. Окислительный стресс дозозависимо индуцировался всеми типами УНТ, неочищенные ОУНТ вызывали наиболее выраженный эффект. В клетках BEAS-2B МУНТ вызывали повышение экспрессии *TGF-β1* при низких концентрациях, в то время как ОУНТ вызывали аналогичный эффект лишь при высокой концентрации. В клетках A549 все типы УНТ проявляли профиброгенный эффект во всех концентрациях. В фибробластах значимого повышения экспрессии гена *TGF-β1* не наблюдалось. В клетках BEAS-2B и A549 УНТ демонстрировали способность к инициации апоптотических сигнальных путей, в MRC5-SV40 признаков апоптоза в ответ на воздействие УНТ не выявлено. Исследования на 3D-моделях клеточных культур продемонстрировали признаки окислительного стресса в ответ на воздействие УНТ, проапоптотических и профиброгенных эффектов УНТ обнаружено не было.

**Заключение.** Генотоксичность УНТ определяется их типом и видом клеток-мишеней, проявляясь в субтоксическом диапазоне концентраций. Ключевые механизмы включают окислительный стресс, прямое повреждение ДНК и индукцию апоптоза. Результаты, полученные на 3D-моделях, демонстрируют меньшую чувствительность, что может указывать на защитную роль тканевой организации.

**Ограничения исследования.** В рамках данной работы не оценивалась возможная роль репарации ДНК. Исследование охватывает ограниченное число конкретных типов отечественных УНТ.

**Ключевые слова:** механизмы генотоксичности; BEAS-2B; A549; MRC5-SV40; наноматериалы; углеродные нанотрубки; *in vitro*

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

**Для цитирования:** Фатхутдинова Л.М., Тимербулатова Г.А., Габидинова Г.Ф. Подходы к оценке *in vitro* генотоксичного потенциала наноматериалов (на примере углеродных нанотрубок). *Токсикологический вестник*. 2026; 34(1): 5–15. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2026-34-1-5-15> <https://elibrary.ru/sxhqvq>

**Для корреспонденции:** Фатхутдинова Лилия Минвагизовна, e-mail: [liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru](mailto:liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru)

**Участие авторов:** Фатхутдинова Л.М. – дизайн исследования, анализ материала, редактирование; Тимербулатова Г.А. – культивирование клеток, проведение тестов на клетках, обобщение полученных результатов, редактирование; Габидинова Г.Ф. – разработка подходов культивирования трёхмерных моделей, проведение тестов на клетках, обзор литературы, статистическая обработка данных, обобщение полученных результатов. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех её частей.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии 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 в редакцию: 22 января 2026 / Принята в печать: 02 февраля 2026 / Опубликовано: 18 марта 2026

Liliya M. Fatkhutdinova, Gyuzel A. Timerbulatova, Gulnaz F. Gabidinova

# Approaches to the *in vitro* assessment of the genotoxic potential of carbon nanotubes

Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, 420012, Russian Federation

## ABSTRACT

**Introduction.** Carbon nanotubes (CNTs) are high-tech materials, but their genotoxic and carcinogenic potential has not been sufficiently studied. To assess the genotoxicity of CNTs, alternative *in vitro* methods are needed, the development of which is impossible without a preliminary study of DNA damage mechanisms.

**Material and methods.** The study was conducted on 2D and 3D human respiratory cell cultures. The effects of Russian single-wall (SWCNT TUBALL™, purified and unpurified) and multi-wall (MWCNT Taunit-M) CNTs were investigated. The cytotoxicity of CNTs was assessed using the MTS assay and lactate dehydrogenase (LDH) assay. The genotoxic potential was investigated using the DNA comet method. The localization of CNTs in cells was determined by transmission electron microscopy. To detect oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) levels were measured using a DCFDA kit. The pro-fibrogenic and pro-apoptotic activities of CNTs were determined by assessing gene expression (*TGF-β1*, *P53*, *Bax*, *Bcl2*) using real-time PCR.

**Results.** Fibroblasts demonstrated the highest sensitivity to CNT cytotoxicity, while A549 cells demonstrated the lowest. CNT genotoxicity was detected in all cells at a concentration of 20 µg/ml. All CNTs penetrated the cells, and MWCNTs were detected in the cell nucleus. Oxidative stress was induced dose-dependently by all types of CNTs, with unpurified SWCNTs producing the most pronounced effect. In BEAS-2B cells, MWCNTs induced an increase in *TGF-β1* expression at low concentrations, while SWCNTs induced a similar effect only at high concentrations. In A549 cells, all types of CNTs exhibited a pro-fibrogenic effect at all concentrations. In fibroblasts, no significant increase in *TGF-β1* gene expression was observed. In BEAS-2B and A549 cells, CNTs demonstrated the ability to initiate apoptotic signaling pathways, while in MRC5-SV40 cells, no signs of apoptosis in response to CNTs were detected. Studies in 3D cell culture models demonstrated signs of oxidative stress in response to CNTs; no pro-apoptotic or pro-fibrogenic effects of CNTs were detected.

**Limitations.** The possible role of DNA repair was not assessed in this study. The study covers a limited number of specific types of domestically produced CNTs.

**Conclusion.** The genotoxicity of CNTs is determined by their type and type of target cells, manifesting itself in a subtoxic concentration range. Key mechanisms include oxidative stress, direct DNA damage, and induction of apoptosis. The results obtained on 3D models demonstrate lower sensitivity, which may indicate a protective role of the tissue organization.

**Keywords:** *genotoxicity mechanisms; BEAS-2B; A549; MRC5-SV40; nanomaterials; carbon nanotubes; in vitro*

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

**For citation:** Fatkhutdinova L.M., Timerbulatova G.A., Gabidinova G.F. Approaches to the *in vitro* assessment of the genotoxic potential of carbon nanotubes. *Toksikologicheskiy vestnik / Toxicological Review*. 2026; 34(1): 5–15. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2026-34-1-5-15> <https://elibrary.ru/sxhqvv> (in Russian)

**For correspondence:** Liliya M. Fatkhutdinova, e-mail: [liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru](mailto:liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru)

**Authors' contribution:** *Fatkhutdinova L.M.* – study design, analysis of material, editing; *Timerbulatova G.A.* – cell culturing, cell testing, summarizing the results, editing; *Gabidinova G.F.* – development of approaches for culturing 3D models, cell testing, literature review, statistical data processing, summarizing the results. All co-authors approved the final version of the article and are responsible for the integrity of all parts of the article.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent and potential conflicts of interest in relation to the publication of this article.

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

Received: January 22, 2026 / Accepted: February 2, 2026 / Published: March 18, 2026

## Введение

Одностенные (ОУНТ) и многостенные (МУНТ) углеродные нанотрубки представляют собой класс высокотехнологичных материалов с уникальными механическими, электрическими и термическими свойствами, что обуславливает расширение их применения в составе композитных материалов, электронике, биомедицине и других областях [1, 2]. Вместе с этим растёт и потенциал воздействия наноматериалов на человека, преимущественно через дыхательную систему [3].

Вопрос о безопасности УНТ, их канцерогенном и генотоксическом потенциале остаётся дискуссионным [4]. Международное агентство по изучению рака (IARC) классифицировало определённые типы МУНТ (Mitsui-7) как возможный канцероген для человека (группа 2В) [5]. Генотоксичность как способность химических или физических агентов повреждать генетический материал клетки может явиться ключевым событием в инициации канцерогенеза и развитии наследственных болезней [6]. Однако генотоксический потенциал многих коммерчески производимых УНТ, в том числе отечественных, изучен недостаточно.

Наряду с изучением конечных точек генотоксичности для определения практического приложения результатов важно установление механизмов генотоксического действия. Потенциальные механизмы генотоксичности наноматериалов, в том числе УНТ, могут быть прямыми (физическое взаимодействие с ДНК или компонентами митотического аппарата) или косвенными, опосредованными через индукцию окислительного стресса, воспаления или нарушение процессов репарации ДНК [7–10].

Многочисленные экспериментальные данные, полученные как *in vivo*, так *in vitro*, свидетельствуют о способности УНТ индуцировать фиброз [11, 12–17]. Накопленные данные указывают на тесную связь между фиброзом и канцерогенезом [11]. Предположительно, профиброгенная активность УНТ может представлять собой дополнительный механизм, способствующий развитию злокачественных новообразований.

В ряде исследований *in vitro* продемонстрировано, что различные типы УНТ способны индуцировать апоптоз; при этом было зафиксировано, что апоптотические процессы под воздействием УНТ часто сопровождались повреждением ДНК. Полученные данные позволяют сделать вывод о способности различных УНТ индуцировать апоптоз и параллельном проявлении ими генотоксической активности [18, 19].

Необходимость оценки в короткие сроки опасности для здоровья человека промышленно производимых наноматериалов и наносодержащей продукции, номенклатура которых ежегодно расширяется, затрудняет использование классических токсикологических методов исследования *in vivo*, требующих значительных временных, трудовых затрат и больших материальных ресурсов [19]. Современные подходы к оценке токсичности диктуют необходимость разработки и валидации альтернативных методов *in vitro* (например, с использованием клеточных культур), частично заменяющих эксперименты на животных [20]. Культуры клеток, в том числе усовершенствованные 3D-модели (сфероиды), могут использоваться для экспериментального выявления молекулярно-клеточных механизмов и особенностей действия наноматериалов при контакте с биологическими объектами [21, 22].

Цель настоящей работы – оценка генотоксического потенциала ОУНТ и МУНТ российского производства в экспериментах *in vitro* на 2D- и 3D-клетках эпителия и фибробластов дыхательной системы человека, а также исследование ключевых механизмов, лежащих в основе генотоксического действия УНТ, для последующей разработки подходов к оценке генотоксического потенциала УНТ в экспериментах *in vitro*.

## Материал и методы

Исследования проведены на 2D-культурах клеток дыхательной системы человека: BEAS-2B (иммортиализированные клетки бронхиального эпителия человека) (Cell Applications, Inc., США); A549 (клетки аденокарциномы альвеолярного эпителия лёгких человека) (CLS Cell Lines Service, Германия) и MRC5-SV40 (иммортиализированные фибробласты лёгких человека, трансформированные SV40) (клетки предоставлены Черняком Б.В., НИИ физической химии им. А.Н. Белозерского МГУ). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в инкубаторе при температуре плюс 37 °С и 5%-м содержании CO<sub>2</sub>.

Для формирования 3D-сфероидов клетки высевали в 96-луночные планшеты с покрытием, препятствующем адгезии, и круглым дном (Cell Floater, SPL Lifesciences, Корея) [23]. Исследовали совместные культуры клеток бронхиального эпителия BEAS-2B и фибробластов лёгких человека MRC5-SV40.

В качестве материалов для исследования использованы одностенные углеродные нанотрубки

ки TUBALL™ производства группы компаний OCSiAl (Новосибирск, Россия) в двух вариантах: очищенные и не очищенные от металлических примесей, а также многостенные углеродные нанотрубки «Таунит-М» производства ООО «Нано-ТехЦентр» (Тамбов, Россия).

Суспензии УНТ для экспериментов готовили в культуральной среде DMEM (Панеко, С410п, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (BioSera, Южная Америка) и подвергали ультразвуковой соникации при помощи прибора Sonic Vibra Cell Sonicator (Sonics&Materials, США). Были подобраны следующие параметры работы прибора: 750 Ватт, 20 кГц, 40% амплитуда, пульс 5/6, время 30 минут непосредственно перед внесением в культуру клеток [24].

Диапазоны концентраций УНТ для экспериментов *in vitro* были определены на основе данных, полученных при исследовании содержания УНТ в воздухе рабочей зоны предприятий, производящих исследуемые наноматериалы, а также сведений из научной литературы, описывающих как нетоксичные, так и потенциально токсичные концентрации УНТ.

Цитотоксичность УНТ определяли с помощью MTS-теста (Promega, США), оценивающего метаболическую активность и жизнеспособность клеток, и анализа лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (набор для анализа ЛДГ, Abcam, Великобритания), определяющего целостность плазматической мембраны.

Для MTS-теста клетки инкубировали с 18 концентрациями (от 0.0006 до 200 мкг/мл) для каждого типа исследуемых УНТ в течение 72 часов. Оптическая плотность образцов в трёх повторах оценивалась с помощью микропланшетного фотометра Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. При анализе результатов MTS-теста считалось, что УНТ обладают цитотоксическим потенциалом, проявляемым в отношении клеток, если жизнеспособность клеточной культуры снижалась до  $\leq 70\%$  по сравнению с контролем, для которого жизнеспособность условно принималась за 100%.

Для анализа активности ЛДГ исследуемые клетки подвергали воздействию четырёх концентраций каждого типа УНТ (100, 50, 0.03 и 0.0006 мкг/мл) в течение 72 ч. Активность ЛДГ, высвободившейся в культуральную среду, определяли с использованием набора LDH Assay Kit (Abcam, UK (Великобритания)) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов в трёх повторах определяли на микропланшетном фотометре Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Генотоксичность оценивали с использованием щелочного варианта теста ДНК-комет (Trevigen, США). В эксперименте использованы две концентрации УНТ (20 и 0.0006 мкг/мл) при инкубации 72 ч. В качестве положительного контроля использовали доксорубин в концентрации 1 мМ/мл, в качестве отрицательного контроля – клетки без воздействия УНТ. После окрашивания флуоресцентным красителем SybrGreen (Invitrogen, США) клетки визуализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX63 (Япония) при длине волны 425–500 нм. Цифровые изображения анализировали в программе CaspLab (v.1.2.3), оценивая не менее 100 случайных комет на образец. Результаты выражали в процентах ДНК в хвосте кометы (% ДНК в хвосте кометы).

Локализацию УНТ в клетках анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии после инкубации клеток с дисперсией исследуемых УНТ в концентрации 100 мкг/мл в течение 72 часов. Визуализацию образцов проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT 7700 Exalens (Hitachi, Япония).

Уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках измеряли с помощью набора для анализа активных форм кислорода DCFDA (Abcam, Великобритания) после 72 ч инкубации клеток с УНТ в пяти концентрациях (100, 50, 20, 0.03, 0.0006 мкг/мл). Флуоресценцию образцов в трёх повторах измеряли при длине волны 485 нм с помощью микропланшетного ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Профиброгенную и проапоптотическую активность УНТ оценивали с помощью анализа экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени. Уровни мРНК профиброгенного гена *TGF-β1*, маркёров апоптоза *P53*, *Bax* и *Bcl2* оценивали в клетках, подвергнутых воздействию четырёх концентраций (100, 50, 0.03, 0.0006 мкг/мл) всех типов УНТ после 72 часов воздействия. Каждый образец анализировали в трёх повторностях. Расчёт оценки уровня мРНК генов проводили методом 2–ΔΔCt относительно контроля для каждой клеточной линии.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel 2016 и пакета R [25]. Для оценки достоверности различий применяли t-критерий Стьюдента, различия при  $p < 0.05$  считали статистически значимыми. Результаты представлены в формате  $M \pm SD$  (среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение). Интегральную оценку уровня мРНК генов – маркёров фиброза и апоптоза проводили с помощью анализа главных компонент.

## Результаты

**Определение диапазона концентраций для экспериментов *in vitro*.** Данные о содержании УНТ в воздухе рабочей зоны предприятий, производящих исследуемые наноматериалы, были использованы для расчёта диапазона концентраций в экспериментах *in vitro* [19, 26]. С учётом данных, полученных при компьютерном моделировании депонирования аэрозоля УНТ в различных отделах лёгких человека (с использованием программного обеспечения MPPD (Multiple Path Particle Dosimetry V3.04) [27]) и данных открытых источников литературы, диапазон концентраций для исследования составил 0,0006–200 мкг/мл. Нижний предел диапазона (0,0006 мкг/мл) соответствует реальной производственной экспозиции ОУНТ, а 0,03 мкг/мл – производственной экспозиции МУНТ.

С целью выбора соответствующего диапазона концентраций для дальнейших экспериментов перед оценкой генотоксичности исследовали цитотоксичность наноматериалов.

**Оценка цитотоксичности.** Оценка жизнеспособности клеток выявила значительные различия в чувствительности к УНТ в зависимости от типа клеток и наноматериала.

Для клеток бронхиального эпителия BEAS-2В порог цитотоксичности (снижение жизнеспособности до  $\leq 70\%$ ), по данным MTS-теста, составлял 100 мкг/мл для МУНТ и неочищенных ОУНТ, 50 мкг/мл – для очищенных ОУНТ. Анализ активности лактатдегидрогеназы подтвердил дозозависимое увеличение цитотоксического эффекта в тех же диапазонах концентраций.

Клетки A549 проявили наименьшую чувствительность: ни один из типов УНТ в исследованном диапазоне (до 200 мкг/мл) не привёл к значимому снижению жизнеспособности (по данным MTS-теста и анализа ЛДГ).

Фибробласты лёгких MRC5-SV40 были наиболее чувствительной линией. По данным MTS теста, цитотоксические эффекты МУНТ наблюдались уже при концентрации 0,1 мкг/мл, в то время как для очищенных и неочищенных ОУНТ порог составлял 6 мкг/мл. Данные ЛДГ-теста на клетках MRC5-SV40 свидетельствовали о цитотоксической активности УНТ во всех четырёх исследуемых концентрациях.

На основании этих данных для последующей оценки генотоксичности были выбраны две конечные точки, на которых потенциальная фрагментация ДНК при цитотоксичности не влияет на результаты теста ДНК-комет: нецитотоксическая концентрация (0,0006 мкг/мл), при которой

жизнеспособность всех линий сохранялась на уровне  $\geq 75\%$ , и субтоксическая концентрация (20 мкг/мл), при которой жизнеспособность составляла  $\geq 55\%$  (на границе или ниже порога цитотоксичности для MRC5-SV40).

**Оценка генотоксичности.** В клетках бронхиального эпителия, альвеолярного эпителия и фибробластах лёгких воздействие всех видов УНТ в концентрации 0,0006 мкг/мл, соответствующей производственной экспозиции, и при 72-часовой инкубации не вызвала значимого повышения процентного содержания ДНК в хвосте комет.

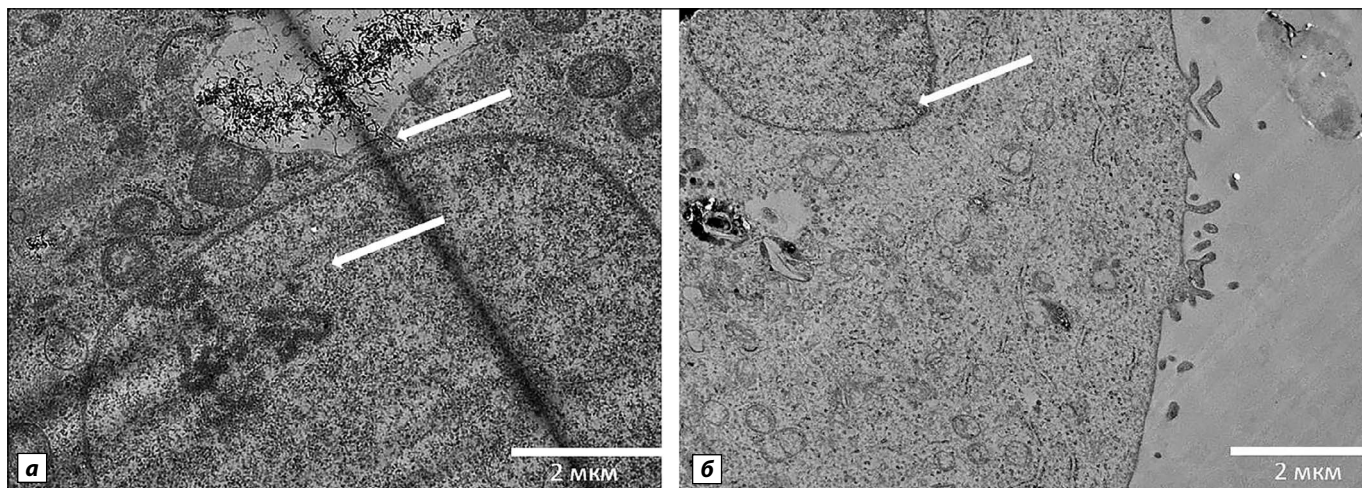
В клеточной линии бронхиального эпителия BEAS-2В при воздействии УНТ в концентрации 20 мкг/мл наблюдалось значимое повышение содержания ДНК в хвосте кометы ( $p < 0.05$ ), при этом МУНТ и не очищенные от металлических примесей ОУНТ вызывали более высокую степень повреждения ДНК по сравнению с очищенными ОУНТ.

Несмотря на отсутствие цитотоксических эффектов в клетках линии A549 вплоть до концентрации 200 мкг/мл, результаты теста ДНК-комет также продемонстрировали значимое повышение уровня повреждения генетического материала при воздействии всех видов УНТ в концентрации 20 мкг/мл ( $p < 0,05$ ), при этом процентное содержание ДНК в хвосте кометы в клетках, инкубированных с УНТ, оказалось сопоставимо с положительным контролем – доксорубицинином в концентрации 1 мМ/мл.

Воздействие МУНТ и очищенных ОУНТ в концентрации 20 мкг/мл вызывало значимое повышение доли ДНК в хвосте кометы в клетках MRC5-SV40 по сравнению с отрицательным контролем ( $p < 0.05$ ), при этом воздействие неочищенных ОУНТ не индуцировало такого эффекта.

**Оценка проникновения УНТ в клетки.** При изучении проникновения УНТ в клетки линии BEAS-2В были получены ПЭМ-изображения стадии эндоцитоза. МУНТ образуют большие скопления у плазматической мембраны клеток, единичные нанотрубки и спутанные клубки нанотрубок захватывались клетками. ОУНТ были более склонны к группированию в виде пучков, что может затруднять проникновение в клетки ввиду их длины. МУНТ также показали накопление в клетке в виде лизосомоподобных структур, где они выглядят более агрегированными, чем вне клетки.

Такие же результаты были получены при изучении проникновения УНТ в клетки альвеолярного эпителия. Кроме этого, выявлено взаимодействие МУНТ с ядерной мембраной клеток альвеолярного эпителия: наночастицы образуют



Взаимодействие МУНТ с ядром клеток A549 и MRC5-SV40 в концентрации 100 мкг/мл через 72 часа экспозиции на изображениях, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии. Увеличение  $\times 6$ .

Стрелки указывают на углеродные нанотрубки: а – клетки A549; б – клетки MRC5-SV40.

Interaction of MWCNTs with the nucleus of A549 and MRC5-SV40 cells at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  after 72 hours of exposure in transmission electron microscopy images, magnification  $\times 6$ . Arrows point to carbon nanotubes: а – A549 cells; б – MRC5-SV40 cells.

скопления вблизи ядерной мембраны клеток и проникают сквозь неё, единичные МУНТ обнаружены внутри ядра, что свидетельствует о возможном прямом воздействии данного вида УНТ на ДНК (рисунок, а).

Аналогичные результаты были получены в фибробластах MRC5-SV40: УНТ также проникают в клетки, при этом МУНТ имеют тенденцию образовывать кластеры в цитоплазме клеток. Обнаружены одиночные МУНТ, проникающие в ядерную мембрану клеток MRC5-SV40 (рисунок, б).

**Оценка проокислительных свойств УНТ.** По результатам теста DCFH-DA установлено, что во всех клеточных культурах происходило дозозависимое увеличение уровня активных форм кислорода при действии всех типов УНТ, при этом значимое повышение по сравнению с отрицательным контролем наблюдалось начиная с концентрации 20 мкг/мл (табл. 1).

Воздействие неочищенных ОУНТ по сравнению с МУНТ приводило к более высокому уровню окислительного стресса: в клетках BEAS-2B при концентрациях 20 и 50 мкг/мл с выравниванием эффектов при концентрации 100 мкг/мл, в клетках A549 и MRC5-SV40 – в диапазоне концентраций 20–100 мкг/мл. Кроме того, неочищенные ОУНТ продемонстрировали более высокий окислительный потенциал по сравнению с очищенными ОУНТ при концентрациях 20 и 50 мкг/мл.

**Оценка профиброгенных эффектов УНТ.** При оценке экспрессии гена *TGF- $\beta$ 1*, участвующего в патогенезе фиброза, в клетках бронхиального эпителия установлено, что МУНТ в концентрациях 0,0006 и 0,03 мкг/мл при 72-часовом воз-

действии вызывали повышение экспрессии гена, свидетельствующее о потенциальном профиброгенном эффекте. Для двух типов ОУНТ повышение экспрессии гена *TGF- $\beta$ 1* наблюдалось при концентрации 100 мкг/мл. В альвеолярных эпителиальных клетках A549 положительная экспрессия гена *TGF- $\beta$ 1* наблюдалась при воздействии УНТ во всех концентрациях. Для фибробластов MRC5-SV40 обнаружено подавление экспрессии гена *TGF- $\beta$ 1*, что может рассматриваться как проявление регуляторной адаптации фибробластов. Обобщённые результаты представлены в табл. 2.

**Оценка проапоптотических эффектов УНТ.** В клетках бронхиального эпителия BEAS-2B, подвергшихся воздействию УНТ, уровень экспрессии гена *P53*, играющего основную роль в регуляции транскрипции проапоптотических и антиапоптотических членов семейства белков BCL2, значимо не отличался от контроля ( $p > 0.05$ ). При этом после экспозиции к МУНТ в концентрациях 0,0006 и 0,03 мкг/мл наблюдалось повышение экспрессии гена *BAX* ( $p < 0,05$ ), инициирующего апоптоз, и сниженная экспрессия антиапоптотического гена *BCL2* ( $p < 0,05$ ); при более высоких концентрациях (50 и 100 мкг/мл) признаки апоптоза уже отсутствовали. Выраженность эффектов ОУНТ на клетках BEAS-2B отличалась от эффектов МУНТ: инициация апоптоза происходила лишь при воздействии высокой концентрации 100 мкг/мл неочищенных ОУНТ TUBALL™ – в первую очередь повышалась экспрессия проапоптотического гена *BAX* ( $p < 0,05$ ). При экспозиции очищенных ОУНТ TUBALL™

Таблица 1 / Table 1

**Уровень АФК (кратный увеличению в сравнении с контролем) в исследуемых клетках ( $M \pm SD$ )**  
**ROS level (fold increase compared to control) in the studied cells ( $M \pm SD$ )**

Исследуемый материал The material under study	Концентрации УНТ, мг/мл CNT concentrations, mg/ml	Клетки BEAS-2B BEAS-2B cells	Клетки A549 A549 cells	Клетки MRC5-SV40 MRC5-SV40 cells
Отрицательный контроль / Negative control		1 ± 0.03	1 ± 0.03	1 ± 0.03
МУНТ MWCNTs	0.0006	0.81 ± 0.019	0.98 ± 0.037	0.98 ± 0.028
	0.03	0.98 ± 0.019	0.93 ± 0.040	0.93 ± 0.044
	20	2.08 ± 0.034*	1.43 ± 0.028*	1.58 ± 0.217*
	50	3.69 ± 0.163*	2.07 ± 0.131*	2.68 ± 0.135*
	100	6.21 ± 0.782*	3.31 ± 0.205*	4.92 ± 0.237*
ОУНТ неочищенные Unpurified SWCNTs	0.0006	0.91 ± 0.002	0.96 ± 0.005	0.86 ± 0.019
	0.03	0.90 ± 0.028	1.02 ± 0.14	0.96 ± 0.002
	20	3.32 ± 0.012*#◇	4.19 ± 0.261*#◇	4.14 ± 0.015*#◇
	50	5.71 ± 0.144*#	8.35 ± 0.134*#◇	7.55 ± 0.203*#◇
	100	6.43 ± 0.012*	8.82 ± 0.197*#	8.17 ± 0.268*#
ОУНТ очищенные Purified SWCNTs	0.0006	0.90 ± 0.045	0.93 ± 0.031	0.84 ± 0.016
	0.03	0.88 ± 0.019	0.95 ± 0.029	0.96 ± 0.016
	20	2.07 ± 0.028*	2.54 ± 0.035*	2.46 ± 0.033*
	50	5.63 ± 0.085*	6.25 ± 0.089*	6.59 ± 0.172*
	100	6.86 ± 0.175*	8.04 ± 0.014*	8.35 ± 0.011*

Примечание. \* –  $p < 0.05$  при сравнении с отрицательным контролем; # –  $p < 0.05$  при сравнении с МУНТ, ◇ –  $p < 0.05$  при сравнении с очищенными ОУНТ.

Note. \* –  $p < 0.05$  when compared with the negative control; # –  $p < 0.05$  when compared with MWCNTs; ◇ –  $p < 0.05$  when compared with purified SWCNTs.

Таблица 2 / Table 2

**Относительный уровень экспрессии гена TGF-β1 в исследуемых клетках ( $M \pm SD$ )**  
**Relative expression level of the TGF-β1 gene in the studied cells ( $M \pm SD$ )**

Исследуемый материал The material under study	Концентрации УНТ, мг/мл CNT concentrations, mg/ml	Клетки BEAS-2B BEAS-2B cells	Клетки A549 A549 cells	Клетки MRC5-SV40 MRC5-SV40 cells
Контроль / Control		0 ± 0.03	0 ± 0.05	0 ± 0.18
МУНТ MWCNTs	0.0006	2.13 ± 0.26*	3.03 ± 0.50*	– 1.28 ± 0.02
	0.03	1.45 ± 0.05*	4.52 ± 0.61*	– 1.16 ± 0.05
	50	– 0.06 ± 0.75	2.04 ± 0.09*	– 1.53 ± 0.23
	100	– 0.09 ± 0.31	26.95 ± 0.20*	– 1.04 ± 0.18
ОУНТ неочищенные Unpurified SWCNTs	0.0006	0.22 ± 0.63	3.19 ± 0.25*	– 1.91 ± 0.49*
	0.03	– 1.60 ± 0.88	2.92 ± 0.11*	– 0.44 ± 0.03
	50	– 1.93 ± 0.40*	7.18 ± 0.05*	– 0.69 ± 0.45
	100	0.79 ± 0.04*	4.16 ± 0.10*	0.38 ± 0.29
ОУНТ очищенные Purified SWCNTs	0.0006	– 0.23 ± 0.08*	4.73 ± 0.16*	– 1.15 ± 0.50
	0.03	– 1.35 ± 0.47*	3.97 ± 0.23*	– 1.12 ± 0.09
	50	– 2.22 ± 0.04*	6.88 ± 0.08*	– 0.78 ± 0.05
	100	0.71 ± 0.31*	5.46 ± 0.16*	0.46 ± 0.20

Примечание. \* –  $p < 0.05$  – по сравнению с контролем.

Note. \* –  $p < 0.05$  – compared to control.

снижалась экспрессия гена *BCL2* ( $p < 0,05$ ) с изменением баланса *BAX/BCL2* до 2.68 при концентрации 100 мкг/мл, что указывает на возможность запуска процессов апоптоза.

В клетках альвеолярного эпителия A549 МУНТ статистически значимо повышали экспрессию гена *P53* по сравнению с контролем начиная с концентрации 0.03 мкг/мл ( $p < 0.05$ ); статистически значимое увеличение экспрессии генов *BAX* и *BCL2* (с повышением соотношения *BAX/BCL2* до 1,5) наблюдалось при концентрации 100 мкг/мл ( $p < 0.05$ ). Для неочищенных ОУНТ экспрессия гена *P53* статистически значимо повышалась уже при самой низкой концентрации – 0,0006 мкг/мл ( $p < 0.05$ ), для очищенных ОУНТ – начиная с 0,03 мкг/мл ( $p < 0,05$ ). При концентрации 100 мкг/мл признаки апоптоза отсутствовали, что может указывать на преобладание некротического пути гибели клеток. Во всём диапазоне концентраций соотношение *BAX/BCL2* при экспонировании клеток A549 к ОУНТ было выше 1,0 (статистически значимо для неочищенных ОУНТ в концентрациях 0,0006 и 100 мкг/мл) ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о преобладании проапоптотических процессов над антиапоптотическими.

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

**Оценка цитотоксичности, прооксидантных, профиброгенных свойств и проапоптотических эффектов УНТ на 3D-моделях клеток дыхательной системы человека.** Культивирование 3D-моделей клеточных культур проводилось в соответствии с протоколом, описанным в ранее проведённом исследовании [23].

В трёхмерной ко-культуре BEAS-2B и MRC5-SV40 повышение активности ЛДГ под действием углеродных нанотрубок отмечалось только при высокой концентрации (100 мкг/мл) для МУНТ и неочищенных ОУНТ. Можно предположить, что взаимодействие эпителиальных клеток и фибробластов и их обмен сигналами ведут к формированию наиболее приближенного к нативной ткани микроокружения и включению защитных механизмов при воздействии УНТ. Эта закономерность не наблюдалась в случае очищенных ОУНТ, что может быть связано с размерами агломератов или другими механизмами реализации

цитотоксичности, и это требует дальнейшего исследования.

В ко-культуре 3D-модели из клеток BEAS-2B и MRC5-SV40 воздействие МУНТ и очищенных ОУНТ вызывало статистически значимое повышение уровня активных форм кислорода по сравнению с контролем начиная с концентрации 20 мкг/мл. Для неочищенных ОУНТ было установлено, что при воздействии низких концентраций в клетках происходит значимое снижение уровня активных форм кислорода по сравнению с контролем с нарастанием с 20 мкг/мл и значимым увеличением только на 50 мкг/мл. В ко-культуре 3D-клеточных систем относительный уровень экспрессии гена *TGF- $\beta$ 1* не повышался по сравнению с контролем при воздействии всех типов УНТ. В ко-культуре клеток 3D бронхиального эпителия BEAS-2B и лёгочных фибробластов MRC5-SV40 признаков апоптоза при экспозиции к каждому из изучавшихся типов УНТ также обнаружено не было.

## Обсуждение

В настоящем исследовании было показано отсутствие генотоксического эффекта УНТ при концентрации, соответствующей производственной экспозиции (0,0006 мкг/мл). Однако для субтоксической концентрации УНТ 20 мкг/мл было выявлено увеличение числа нестабильных участков ДНК, что свидетельствует о дозозависимой генотоксичности этих материалов. Ранее исследования генотоксичности различных типов УНТ при более высоких концентрациях (от 80 мкг/мл и выше) показали противоречивые результаты, что может быть связано с различиями в чувствительности клеток к УНТ [28, 29], а также с физико-химическими характеристиками исследуемых УНТ [30].

В качестве механизмов генотоксичности УНТ в клетках дыхательной системы человека были исследованы генерация активных форм кислорода (АФК), прямое повреждение генетического материала при поглощении наноматериалов клеткой и хроническая персистенция УНТ внутри клетки и ядра. Кроме этого, были изучены профиброгенные эффекты и проапоптотический потенциал УНТ.

Генерация АФК широко признана основным механизмом, лежащим в основе генотоксичности [7]. Результаты анализа DCFH-DA продемонстрировали значительное увеличение внутриклеточной продукции АФК после 72 часов воздействия всех типов УНТ начиная с концентрации 20 мкг/мл. Подобные наблюдения повышенного

окислительного стресса и генотоксических эффектов, вызванных воздействием УНТ, были зарегистрированы и другими исследовательскими группами для различных типов клеток, в том числе эпителиальных клеток бронхов человека BEAS-2B [30].

Были продемонстрированы особенности проникновения разных видов УНТ и накопления их в клетках дыхательной системы человека. Проникновение УНТ в клетки происходит преимущественно посредством эндоцитоза, при этом наночастицы могут локализоваться в лизосомоподобных структурах или свободно распределяться в цитоплазме клетки. Важным наблюдением является обнаруженная склонность МУНТ к накоплению вблизи ядерной мембраны и дальнейшее проникновение внутрь ядра, что стоит рассматривать как прямой механизм генотоксичности. Выявлены различия в проникновении ОУНТ и МУНТ в клетки: для последних были показаны склонность к образованию внутриклеточных скоплений и проникновение через ядерную мембрану. Данные, подтверждающие прямой контакт МУНТ и ОУНТ с ядром, немногочисленны и встречаются лишь в единичных публикациях [30, 31].

Изученные УНТ проявляют профиброгенные свойства в эпителиальных клетках BEAS-2B и A549. Было установлено увеличение экспрессии гена *TGF-β1* в клетках бронхиального эпителия при нецитотоксических концентрациях МУНТ и высоких цитотоксических концентрациях неочищенных ОУНТ. Также было показано, что все типы УНТ при исследуемых концентрациях вызывали увеличение экспрессии профибротического фактора в клетках A549. Ни один из трёх типов УНТ не вызывал увеличения экспрессии *TGF-β1* в фибробластах MRC5-SV40. Ранее в экспериментах *in vitro* с применением культуры фибробластов человека WI38-VA13 было установлено, что воздействие УНТ индуцирует дифференциацию фибробластов с трансформацией в миофибробласты [32]. Это может менять паттерн экспрессии генов и свидетельствовать о развитии регуляторной адаптации клеток, играющих ключевую роль в развитии фиброза. Данные результаты согласуются с предыдущими исследованиями, в которых воздействие МУНТ приводило к увеличению экспрессии гена *TGF-β1* в клетках BEAS-2B [12, 17, 33]. Также была показана важная роль окислительного стресса в инициации фиброза [34–36]. В нескольких исследованиях продемонстрировано, что окислительный стресс, индуцированный УНТ, усиливает выработку и активацию профи-

бротических факторов, в том числе *TGF-β1* [12, 13, 36]. В совокупности эти данные позволяют предположить ключевую роль окислительного стресса как основного регулятора фиброгенеза, индуцированного УНТ.

Инициация апоптоза наблюдалась преимущественно при низких концентрациях УНТ. Так, МУНТ индуцировали апоптоз в клетках BEAS-2B, а неочищенные ОУНТ – в клетках A549 уже при минимальной концентрации, соответствующей производственной (0,0006 мкг/мл). Напротив, при высоких цитотоксических концентрациях в исследуемых клетках апоптоз не выявлялся. Отсутствие апоптоза при высоких цитотоксических концентрациях может объясняться доминированием альтернативных путей гибели клеток (некроз, некроптоз, аутофагия), которые опережают развитие апоптоза [37, 38]. При этом повреждение ДНК как известный фактор также может участвовать в инициации апоптоза [37].

Трёхмерные (3D) ко-культуры бронхиального эпителия и фибробластов продемонстрировали меньшую чувствительность к УНТ по сравнению с традиционными монослойными (2D) культурами. Результаты исследования токсичности УНТ на разработанных 3D-моделях продемонстрировали отсутствие проапоптотических и профиброгенных эффектов при концентрациях, соответствующих производственным экспозициям. Однако начиная с концентрации УНТ 20 мкг/мл, значительно превышающей концентрации, соответствующие производственным экспозициям, в клеточных моделях были обнаружены признаки окислительного стресса. При этом 3D-модели, приближенные по своим свойствам к нативной ткани, представляют собой эффективный скрининговый инструмент, снижающий риск ложноположительной оценки токсичности при переходе от экспериментов *in vitro* к *in vivo*.

**Ограничения исследования.** В рамках данной работы не оценивалась возможная роль репарации ДНК. Исследование охватывает ограниченное число конкретных типов отечественных УНТ.

## Заключение

Исследование показало, что генотоксичность УНТ зависит от их типа и вида клеток, проявляясь преимущественно при субтоксических концентрациях. Ключевыми механизмами токсичности УНТ являются окислительный стресс, прямое взаимодействие с ДНК (для МУНТ) и индукция апоптоза. 3D-модели демонстрируют меньшую чувствительность, что может указывать на защитную роль тканевой организации.

Проведённая оценка генотоксического потенциала трех типов промышленных УНТ на 2D- и 3D-моделях клеток дыхательной системы человека позволила сформулировать принципы проведения подобных исследований. Необходимо использовать линейку тестов для выявления различных механизмов повреждения ДНК (прямое взаимодействие, окислительный стресс, апоптоз, профиброгенный эффект). Обязательным является учёт клеточной специфичности,

для чего в скрининг следует включать не менее двух различных типов клеток дыхательной системы как наиболее вероятного органа-мишени. Для повышения прогностической ценности данных и снижения риска гипердиагностики рекомендуется использовать продвинутые 3D-модели, в частности ко-культуры, в качестве следующего шага валидации результатов, полученных на традиционных 2D-моделях клеточных культур.

## ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1–19, 21, 22, 26–37 см References)

20. Гуськова О.А., Завьялов Н.В., Скворцова Е.Л., Хамидулина Х.Х. Сравнительная оценка исследования токсических свойств наноматериалов в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. *Токсикологический вестник*. 2015; (1): 22–8. <https://elibrary.ru/ywvwcwq>
23. Габидинова Г.Ф., Тимербулатова Г.А., Убейкина Е.В., Сагафарова А.А., Фатхутдинова Л.М. Новые трёхмерные модели *in vitro* для оценки токсичности углеродных нанотрубок. *Токсикологический вестник*. 2023; 31(6): 352–62. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-6-352-362> <https://elibrary.ru/izuidk>

24. Тимербулатова Г.А., Димиев А.М., Хамидуллин Т.Л., Бойчук С.В., Дунаев П.Д., Фахруллин Р.Ф. и др. Диспергирование одностенных углеродных нанотрубок в биосовместимых средах. *Российские нанотехнологии*. 2020; 15(4): 461–9. <https://doi.org/10.1134/S1992722320040160> <https://elibrary.ru/ntuimq>
25. 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. 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>
2. He H., Pham-Huy L.A., Dramou P., Xiao D., Zuo P., Pham-Huy C. Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine. *Biomed Res. Int*. 2013; 2013: 578290. <https://doi.org/10.1155/2013/578290>
3. Guseva Canu I., Bateson T.F., Bouvard V., Debia M., Dion C., Savolainen K., et al. Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials: A review. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2016; 219(2): 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.12.005>
4. Donaldson K., Stone V., Seaton A., Tran L., Aitken R., Poland C. Re: Induction of mesothelioma in p53<sup>+/−</sup> mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci*. 2008; 33(3): 385; author reply 386–8. <https://doi.org/10.2131/jts.33.385>
5. International Agency for Research on Cancer (IARC). Available at: <https://iarc.who.int/>
6. Takagi A., Hirose A., Futakuchi M., Tsuda H., Kanno J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci*. 2012; 103(8): 1440–4. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02318.x>
7. Samadian H., Salami M.S., Jaymand M., Azarnezhad A., Najafi M., Barabadi H., et al. Genotoxicity assessment of carbon-based nanomaterials; Have their unique physicochemical properties made them double-edged swords? *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res*. 2020; 783: 108296. <https://doi.org/10.1016/j.mrrrev.2020.108296>
8. Sargent L.M., Hubbs A.F., Young S.H., Kashon M.L., Dinu C.Z., Salisbury J.L., et al. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res*. 2012; 745(1-2): 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.017>
9. Shvedova A.A., Pietroiusti A., Fadeel B., Kagan V.E. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2012; 261(2): 121–33. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.03.023>
10. Møller P., Christophersen D.V., Jensen D.M., Keramanizadeh A., Rourgaard M., Jacobsen N.R., et al. Role of oxidative stress in carbon nanotube-generated health effects. *Arch. Toxicol*. 2014; 88(11): 1939–64. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1356-x>
11. Dong J., Ma Q. Integration of inflammation, fibrosis, and cancer induced by carbon nanotubes. *Nanotoxicology*. 2019; 13(9): 1244–74. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1651920>
12. He X., Young S.H., Schwegler-Berry D., Chisholm W.P., Fernback J.E., Ma Q. Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF-κB signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation. *Chem. Res. Toxicol*. 2011; 24(12): 2237–48. <https://doi.org/10.1021/tx200351d>
13. 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. <https://doi.org/10.3390/ijms15057444>
14. Mercer R.R., Scabillon 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. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-33>
15. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer 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. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2005>
16. 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 after multi-walled carbon nanotube inhalation exposure in mice. *J. Appl. Toxicol*. 2016; 36(1): 161–74. <https://doi.org/10.1002/jat.3157>
17. Wang X., Duch M.C., Mansukhani N., Ji Z., Liao Y.P., Wang M., et al. Use of a pro-fibrogenic mechanism-based predictive toxicological approach for tiered testing and decision analysis of carbonaceous nanomaterials. *ACS Nano*. 2015; 9(3): 3032–43. <https://doi.org/10.1021/nn507243w>
18. 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>
19. 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.
20. Guskova O.A., Zavyalov N.V., Skvorcova E.L., Khamidulina Kh.Kh. Comparative assessment of investigations into toxic properties of nanomaterials *in vivo* and *in vitro* experiments. *Toksikologicheskii vestnik*. 2015; (1): 22–8. <https://elibrary.ru/ywvwcwq> (in Russian)
21. NANOREG. Grant Agreement Number 310584. Deliverable D 2.06. Validated protocols for test item preparation for key *in vitro* and ecotoxicity studies; 2016.
22. Pfuhrer S., van Benthem J., Curren R., Doak S.H., Dusinska M., Hayashi M., et al. Use of *in vitro* 3D tissue models in genotoxicity testing: Strategic fit, validation status and way forward. Report of the working group from the 7<sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*. 2020; 850–851: 503135. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503135>
23. Gabidinova G.F., Timerbulatova G.A., Ubeikina E.V., Sayagfarova A.A., Fatkhutdinova L.M. New 3D *in vitro* models for assessing the toxicity of carbon nanotubes. *Toksikologicheskii vestnik*. 2023; 31(6): 352–62. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-6-352-362> <https://elibrary.ru/izuidk> (in Russian)
24. Timerbulatova G.A., Dimiev A.M., Khamidullin T.L., Boichuk S.V., Dunayev P.D., Fakhrullin R.F., et al. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in biocompatible environments. *Rossiiskie nanotekhnologii*. 2020; 15(4): 461–9. <https://doi.org/10.1134/S1992722320040160> <https://elibrary.ru/ntuimq> (in Russian)
25. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
26. 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 MWCNT. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2016; 299: 125–31. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.02.016>
27. Applied Research Associates. Multiple-Path Particle Dosimetry Model (MPPD v 3.04). Available at: <https://ara.com/mppd/>
28. Di Ianni E., Erdem J.S., Møller P., Sahlgren N.M., Poulsen S.S., Knudsen K.B., et al. *In vitro* correlations of pulmonary inflammatory and genotoxicity of MWCNT. *Part. Fibre Toxicol*. 2021; 18(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00413-2>
29. Lindberg H.K., Falck G.C., Singh R., Suhonen S., Järventaus H., Vanhala E., et al. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells *in vitro*. *Toxicology*. 2013; 313(1): 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.008>
30. Di Giorgio M.L., Di Buccianico S., Ragnelli A.M., Aimola P., Santucci S., Poma A. Effects of single and multiwalled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat. Res*. 2011; 722(1): 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.02.008>
31. Sargent L.M., Hubbs A.F., Young S.H., Kashon M.L., Dinu C.Z., Salisbury J.L., et al. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res*. 2012; 745(1-2): 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.017>
32. Hindman B., Ma Q. Carbon nanotubes and crystalline silica induce matrix remodeling and contraction by stimulating myofibroblast transformation in a three-dimensional

- culture of human pulmonary fibroblasts: role of dimension and rigidity. *Arch. Toxicol.* 2018; 92(11): 3291–305. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2306-9>
33. Mishra A., Rojanasakul Y., Chen B.T., Castranova V., Mercer R.R., Wang L. Assessment of pulmonary fibrogenic potential of multiwalled carbon nanotubes in human lung cells. *J. Nanomater.* 2012; 13(1): 27. <https://doi.org/10.1155/2012/930931>
  34. 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. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.647929>
  35. Bargagli E., Olivieri C., Bennett D., Prasse A., Muller-Quernheim J., Rottoli P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respir. Med.* 2009; 103(9): 1245–56. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.04.014>
  36. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol. Ther.* 2010; 125(3): 376–93. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.11.004>
  37. Mohammadnejad 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/10.1080/15548627.2018.1509171>
  38. 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 Sanitaria (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)

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Фатхутдинова Лилия Минвагизовна** – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, 420012, г. Казань, Россия. E-mail: [liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru](mailto:liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru)

**Тимербулатова Гюзель Абдулхалимовна** – доцент кафедры гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420012, г. Казань, Россия. E-mail: [guzel.timerbulatova@kazangmu.ru](mailto:guzel.timerbulatova@kazangmu.ru)

**Габидинова Гульназ Фаезовна** – ассистент кафедры гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420012, г. Казань, Россия. E-mail: [gabidinova26@kazangmu.ru](mailto:gabidinova26@kazangmu.ru)

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Liliya M. Fatkhutdinova** – MD, Professor, Head of the Department of Hygiene and Occupational Medicine, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, 420012, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-9506-563X> E-mail: [liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru](mailto:liliya.fatkhutdinova@kazangmu.ru)

**Guzel A. Timerbulatova** – Senior Lecturer at the Department of Hygiene and Occupational Medicine, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, 420012, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-2479-2474> E-mail: [guzel.timerbulatova@kazangmu.ru](mailto:guzel.timerbulatova@kazangmu.ru)

**Gulnaz F. Gabidinova** – Assistant of the Department of Hygiene and Occupational Medicine, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, 420012, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-2616-5017> E-mail: [gabidinova26@kazangmu.ru](mailto:gabidinova26@kazangmu.ru)

