

УДК 57.085.23

doi: 10.17223/19988591/25/14

Т.О. Халиуллин¹, Е.Р. Кисин², Э. Мюррэй²,
Р.Р. Залялов¹, А.А. Шведова², Л.М. Фатхутдинова¹

¹ Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

² Национальный институт охраны и здоровья труда, г. Моргантаун, США

Токсические эффекты углеродных нанотрубок в культурах клеток макрофагов и бронхиального эпителия

На сегодняшний день есть основания предполагать наличие риска здоровью людей, имеющих контакт с углеродными нанотрубками (УНТ). Была проведена сравнительная оценка токсических эффектов промышленных однослойных и многослойных УНТ (ОУНТ / МУНТ) в культурах макрофагов (RAW 264.7) и клеток бронхиального эпителия (BEAS-2B). RAW 264.7 оказались гораздо более чувствительны к воздействию различных типов УНТ, чем клетки BEAS-2B. Внесение МУНТ не сопровождалось достоверным снижением жизнеспособности макрофагов, но вызвало повреждение клеточных мембран; оксидативный стресс имел дозо- и времязависимый характер. ОУНТ вызвали значительное снижение жизнеспособности и индукцию оксидативного стресса. Улучшенная темнопольная микроскопия выявила адсорбцию и накопление МУНТ и ОУНТ на поверхности и внутри макрофагов. BEAS-2B оказались маловосприимчивы к экспозиции МУНТ. Внесение ОУНТ в культуру BEAS-2B вызвало небольшое статистически значимое дозо- и времязависимое снижение жизнеспособности и выраженное снижение уровня восстановленного глутатиона только при самой высокой концентрации наночастиц. Результаты исследования свидетельствуют о различиях в токсическом действии различных УНТ и о необходимости взвешивающего подхода к оценке токсичности наноматериалов и разработке отечественной нормативной документации с учетом особых физико-химических свойств углеродных наноматериалов.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки; нанотоксикология; *in vitro*; макрофаги; RAW 264.7.

Введение

Одно- и многослойные углеродные нанотрубки, как одни из самых перспективных наноматериалов, получают все большее распространение. В мире наблюдается значительный рост предприятий, производящих и использующих готовые УНТ. Одновременно растет число лиц, потенциально экспонированных к аэрозолю углеродных нанотрубок на своих рабочих местах [1, 2]. Накопленные данные дают основания предположить наличие риска здоровью людей, имеющих производственный контакт с углеродными наночастицами. Волокнистая структура углеродных нанотрубок может обуславливать патогенность, свойственную минеральным волокнам (асбест,

диоксид кремния) [3–5]. Существует мнение, что углеродные наноразмерные частицы опаснее частиц микроразмера за счет большей проникающей способности, удельной поверхности и реактогенности [6].

Целью исследования была сравнительная оценка токсических эффектов промышленных однослойных и многослойных УНТ в культурах клеток макрофагов и бронхиального эпителия.

Материалы и методики исследования

Частицы. Одно- и многослойные углеродные нанотрубки были получены промышленным методом каталитического осаждения паров (ООО «Нанотехцентр», г. Тамбов). В растворе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) УНТ визуально представляли собой спутанные клубки размером до 5 мкм в ширину и отдельные волокна. В таблице приведены характеристики нанотрубок, предоставленные предприятиями-производителями.

Физико-химические характеристики промышленных углеродных нанотрубок

Физико-химические характеристики	Многослойные углеродные нанотрубки	Однослойные углеродные нанотрубки
Наружный диаметр, нм	8–15	1–2
Внутренний диаметр, нм	4–8	0,8–1,4
Длина, мкм	2 и более	3 и более
Общий объем примесей, %	до 5	4–7
Насыпная плотность, г/см ³	0,03–0,05	0,15
Удельная геометрическая поверхность, м ² /г	300–320	1100
Термостабильность, °С	До 600	До 700

Дозировка. УНТ были растворены вместе с ДПФХ (0,01 мкг/мл) с целью увеличения дисперсии частиц [7, 8]. С целью оценки дозозависимых эффектов в культурах были выбраны концентрации 0,02, 0,2, 2,4 и 24 мкг на см² поверхности монослоя (0,1, 1, 10, 100 мкг/мл среды). Эти концентрации использовались в предыдущих исследованиях по сравнительной оценке токсичности углеродных частиц нано- и микроразмера [9–11].

Культуры клеток. Были взяты две линии клеток: трансформированные мышинные макрофаги RAW 264.7 и иммортализованные клетки нормального человеческого бронхиального эпителия BEAS-2B. Клетки были выращены с использованием сред MEM (Minimal Essential Media, «Gibco», США) и DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, «Gibco», США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в термостатах (37°C, 5% CO₂). Клетки были засеяны в 96-луночные планшеты в количестве около 2 000 на лунку.

В культурах клеток непосредственно в среде были измерены уровни лактатдегидрогеназы (ЛДГ) как маркера повреждения клеточных мембран [12]. В лизатах культур с помощью реагента ThioGlo® («Calbiochem», США) определялись уровни внутриклеточного глутатиона для косвенной оценки активности свободнорадикального окисления. Жизнеспособность клеток определялась методом флюоресценции.

Часть клеток (RAW 264.7, экспонированные к МУНТ и ОУНТ, концентрация 0,2 мг/см², через 2, 4, 6, 24 и 48 ч) была собрана, отмыта и отброшена на стекла для изучения с помощью улучшенной темнопольной микроскопии («CytoViva®», США).

Статистическая обработка проводилась с использованием t-критерия Стьюдента в программном пакете Microsoft Excel 2010. Данные представлены в виде средней $\pm$ ошибка средней. Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Для исследования нами были взяты мышинные макрофаги RAW 264.7, так как именно макрофаги являются клетками, запускающими и поддерживающими различные типы иммунных ответов в случаях контакта с инородным материалом [13].

Внесение МУНТ в культуру RAW 264.7 не вызвало достоверного снижения жизнеспособности (рис. 1, А), однако сопровождалось повышением концентраций ЛДГ во внеклеточной среде через 48 ч при всех дозировках (но не через 24 ч) (рис. 1, Б). Оксидативный стресс имел дозо- и времязависимый характер (рис. 1, В): уровни внутриклеточного восстановленного глутатиона снижались с повышением дозы и времени воздействия (для самой высокой дозы).

Внесение ОУНТ в культуру RAW 264.7 привело к снижению жизнеспособности на 10–15% через 24 ч после экспозиции независимо от дозы. Спустя 48 часов при 2,4 мкг/см² ОУНТ жизнеспособность снизилась до 78%, а при 24 мкг/см² – до 50% от уровня неэкспонированных клеток (рис. 2, А). Уровни ЛДГ резко выросли через 48 ч при концентрациях 0,2, 2,4 и 24 мкг/см² (рис. 2, Б), что в целом совпало с зафиксированным снижением жизнеспособности в тех же группах. Было обнаружено значительное снижение уровней восстановленного глутатиона: чем больше были экспозиционная доза и время воздействия, тем ниже уровни (рис. 2, В).

Клетки бронхиального эпителия BEAS-2B, играющие ведущую роль в эвакуации пылевых частиц из дыхательного тракта, оказались маловосприимчивы к внесению МУНТ: через 24 и 48 ч не было зафиксировано достоверного снижения жизнеспособности по сравнению с контрольной культурой. Такие же результаты были получены при оценке показателей повреждения клеток и оксидативного стресса (данные не приведены).

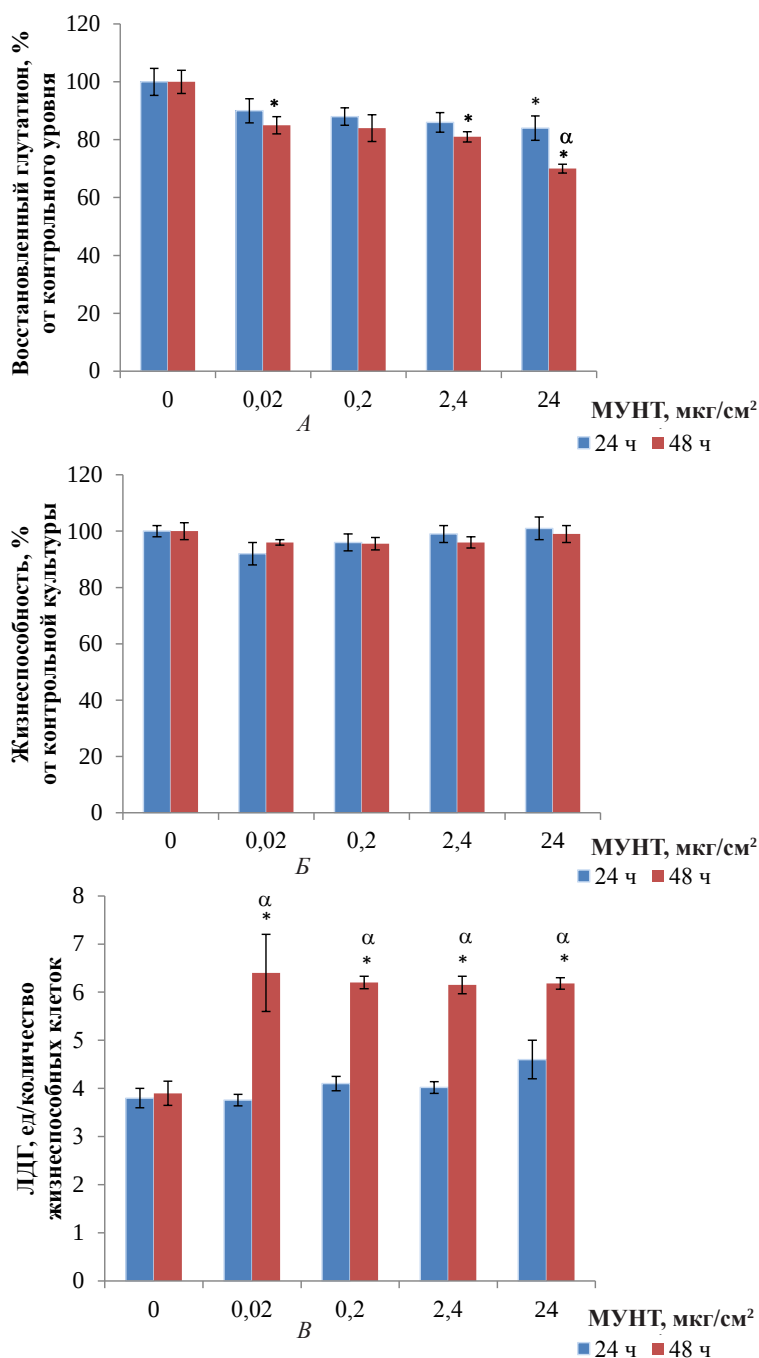


Рис. 1. Результаты внесения многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ) в культуру RAW 264.7 макрофагов. * – $p < 0,05$ vs. контроль, α – $p < 0,05$ vs. 24 ч

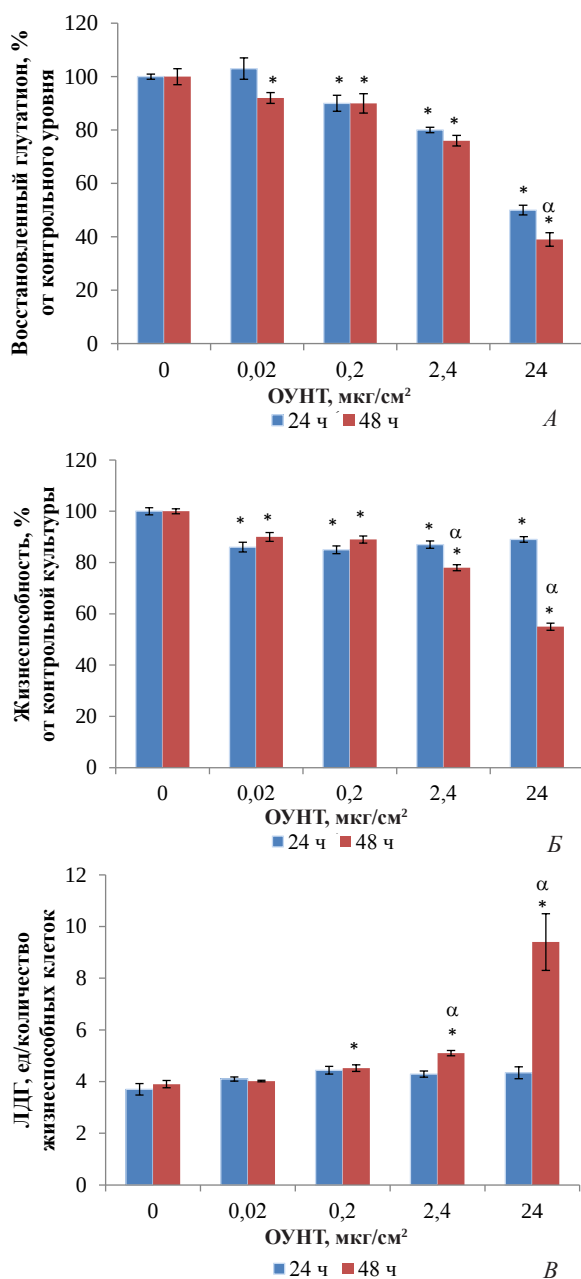


Рис. 2. Результаты внесения однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ) в культуру RAW 264.7 макрофагов. * – $p < 0,05$ vs. контроль, α – $p < 0,05$ vs. 24 ч

Внесение ОУНТ в культуру BEAS-2B через 24 и 48 ч вызвало небольшое статистически достоверное дозо- и времязависимое снижение жизнеспособ-

ности и выраженное снижение уровня восстановленного глутатиона при самой высокой концентрации наночастиц в 24 мкг/см² (данные не приведены).

Последовательное изучение экспонированных культур RAW 264.7 методом улучшенной темнопольной микроскопии выявило адсорбцию и накопление МУНТ и ОУНТ на поверхности и внутри клеток. С увеличением времени экспозиции увеличивалось количество УНТ, визуально определяемое внутри и снаружи клеток (рис. 3).

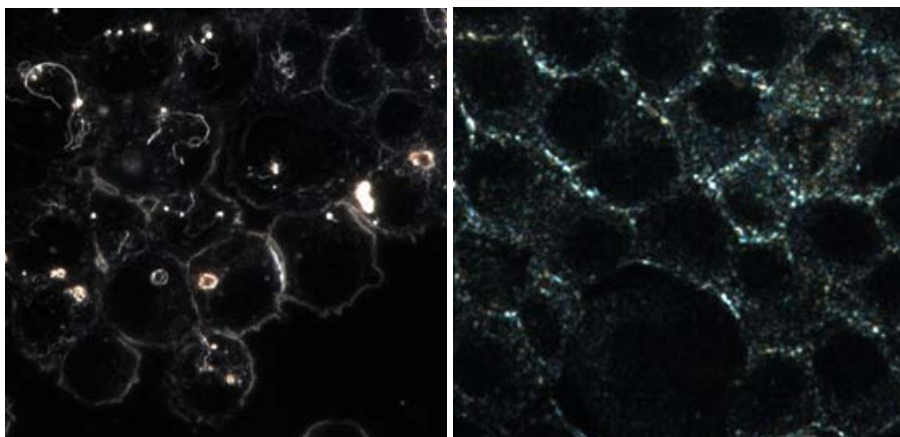


Рис. 3. Слева – экспозиция RAW 264.7 к МУНТ, 24 ч, 0,2 мкг/см².
Справа – контрольная культура (фотографии сделаны Т.О. Халиуллиным)

Полученные данные позволяют предположить, что исследуемые промышленные ОУНТ обладают токсическим действием, вызывая индукцию оксидативного стресса и гибель клеток. В то же время МУНТ, не приводя к значительному снижению жизнеспособности, оказывают повреждающее воздействие на мембраны чувствительных клеток (макрофагов). Это хорошо соотносится с данными, полученными в исследовании Hirano и др. [14], где было обнаружено, что МУНТ может ассоциироваться с мембраной макрофагов и нарушать ее целостность.

Сравнительные исследования токсичности ОУНТ и МУНТ *in vitro* многочисленны. Имеющиеся данные носят разнонаправленный характер. Одни исследователи обнаружили, что ОУНТ обладают большей цитотоксичностью [11, 15, 16]. Другие сообщили об отсутствии острых токсических эффектов для обоих типов УНТ [17]. Некоторые выявили снижение жизнеспособности при экспозиции УНТ, но не обнаружили количественных различий между одно- и многослойными трубками [18, 19]. Бактерии *E. coli*, *P. aeruginosa* и др. оказались наиболее чувствительны к воздействию ОУНТ, в то время как МУНТ показали умеренную токсичность [20]. Согласно нашим результатам, и ОУНТ и МУНТ обладают токсическим действием, но

механизмы и проявления эффектов различны, что необходимо учитывать в будущем при проведении сравнительных токсикологических исследований.

Одной из особенностей нашего исследования является изучение реакции макрофагов. Опыты *in vivo* говорят о значительной роли последних в развитии острого и хронического воспаления, а также профибротических изменений в легких в ответ на экспозицию УНТ [9, 21, 22]. Также было показано, что ОУНТ в гораздо меньшей степени, чем МУНТ, аккумулируются макрофагами [23]. В предыдущих исследованиях на RAW 264.7 макрофагах, изучая генотоксические эффекты экспозиции к УНТ, исследователи обнаружили признаки повреждения генетического аппарата клеток в концентрациях выше 0,1 мкг/см² для ОУНТ и выше 1 мкг/см² для МУНТ, хотя цитотоксические эффекты проявились лишь при самых высоких дозах (100 мкг/мл²) [24]. Механизмы вредного воздействия остаются малоизученными, а исследований с применением культур макрофагов сравнительно мало.

Наше исследование показало, что УНТ действительно оказывает токсическое действие на RAW 264.7 макрофаги, в отличие от бронхиального эпителия. Необходимо отметить, что в эксперименте использовались им-мортиализованные лейкемические макрофаги, которые, однако, способны к фагоцитозу, имеют выраженную лизосомальную активность и секретируют большинство биологически активных веществ, свойственных нормальным макрофагам, в том числе различные цитокины и медиаторы.

Экспериментальные данные, полученные для одного образца УНТ должны с осторожностью экстраполироваться на УНТ, полученные другими предприятиями и / или при других условиях. Так, были обнаружены различные ответные реакции на введение МУНТ, различающихся по морфологии и длине, в плевральную полость крыс – от незначительного локального воспалительного ответа в случае скрученных коротких нанотрубок до выраженной воспалительной реакции и образования гранулем в случае более длинных ригидных структур [25]. УНТ, полученные методом каталитического пиролиза углеводородов, также различаются по содержанию того или иного катализатора. Профессиональная экспозиция на первичном производстве предполагает контакт как с неочищенным, так и с очищенным от катализаторов материалом, в то время как вторичное производство и применение – контакт с уже очищенными (и / или функционализированными) нанотрубками. Исследователи указали на роль контаминантов – катализаторов в развитии оксидативного стресса в случае контакта клеток с УНТ [17, 26]. А в опыте на мышах очищенные ОУНТ оказались менее токсичными для мышей, чем образцы, содержащие остаточные количества катализаторов – железа и никеля [27].

Заключение

Макрофаги (RAW 264.7) оказались гораздо более чувствительны к воздействию различных типов УНТ, чем клетки бронхиального эпителия

(BEAS-2B). Действие ОУНТ на клетки привело к индукции оксидативного стресса и гибели клеток. Внесение МУНТ не вызвало значительного снижения жизнеспособности, однако сопровождалось признаками повреждения мембран макрофагов. Полученные результаты показывают, что необходим поиск доступных *in vitro* и *in silico* моделей для оценки различных параметров токсичности наночастиц. Сравнение различных типов УНТ должно опираться не только на оценку жизнеспособности, но и на специфические показатели вредного воздействия, такие как оксидативный стресс, повреждение клеточных мембран, цитокиновый профиль. Кроме того, в нормативных документах необходимо классифицировать наночастицы не только по признаку химического состава, но и по морфологическим особенностям.

Литература

1. *Lux Research*. The Nanotech Report. 5th ed. N.Y., NY : Lux Research, 2007.
2. Доклад Global Markets and Technologies for Carbon Nanotubes // Сайт: BCC Research. Market forecasting. URL: <http://www.bccresearch.com/report/carbon-nanotubes-markets-technologies-nan024e.html>
3. Wick P., Manser P., Limbach L.K. et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity // *Toxicol Lett*. 2007. № 168(2). P. 121–131.
4. Takagi A., Hirose A., Nishimura T., Kanno J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice // *Cancer Sci*. 2012. № 103(8). P. 1440–1444.
5. Kim J.S., Song K.S., Lee J.K. et al. Toxicogenomic comparison of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) and asbestos // *Arch Toxicol*. 2012. Apr. № 86(4). P. 553–562.
6. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // *Science*. 2006. № 311(5761). P. 622–627.
7. Davoren M., Herzog E., Casey A. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells // *Toxicol In Vitro*. 2007. № 21(3). P. 438–448.
8. Herzog E., Byrne H.J., Davoren M., Casey A., Duschl A., Oostingh G.J. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples // *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009. № 236(3). P. 276–281.
9. Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R. et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 2005. № 289. P. 698–708.
10. Tabet L., Bussy C., Amara N. et al. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells // *J. Toxicol Environ Health A*. 2009. № 72(2). P. 60–73.
11. Tian F., Cui D., Schwarz H., Estrada G.G., Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts // *Toxicol In Vitro*. 2006. № 20(7). P. 1202–1212.
12. Drent M., Cobben N.A.M., Henderson R.F. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation // *Eur Respir J*. 1996. Vol. 9. P. 1736–1742.
13. Mossman B.T., Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. № 157. P. 1666–1680.
14. Hirano S., Fujitani Y., Furuyama A., Kanno S. Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells // *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010. Nov 15. № 249(1). P. 8–15.

15. Jia G., Wang H., Yan L. *et al.* Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene // *Environ Sci Technol.* 2005. Mar 1. № 39(5). P. 1378–1383.
16. Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M., Liu X., Williams Q.L. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines // *Sci Total Environ.* 2010. Mar 15. № 408(8). P. 1812–1817.
17. Pulskamp K., Diabaté S., Krug H.F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants // *Toxicol Lett.* 2007. Jan 10. № 168(1). P. 58–74.
18. Murr L.E., Garza K.M., Soto K.F. *et al.* Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment // *Int J Environ Res Public Health.* 2005 Apr. № 2(1). P. 31–42.
19. Palomäki J., Karisola P., Pykkänen L., Savolainen K., Alenius H. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells // *Toxicology.* 2010. Jan 12. № 267(1–3). P. 125–131.
20. Kang S., Mauter M.S., Elimelech M. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent // *Environ Sci Technol.* 2009. Apr 1. № 43(7). P. 2648–2653.
21. Porter D.W., Hubbs A., Mercer R. *et al.* Mouse pulmonary dose- and time-course response induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes // *Toxicol.* 2010. № 269. P. 136–147.
22. Shvedova A.A., Kisin E., Murray A.R. *et al.* Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis // *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008. № 295(4). P. 552–565.
23. Mercer R.R., Hubbs A.F., Scabilloni J.F. *et al.* Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes // *Part Fibre Toxicol.* 2011. Vol. 8. P. 21–33.
24. Migliore L., Saracino D., Bonelli A. *et al.* Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells // *Environ Mol Mutagen.* 2010 May. № 51(4). P. 294–303.
25. Poland C.A., Duffin R., Kinloch I. *et al.* Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study // *Nat Nanotechnol.* 2008 Jul. Vol. 3(7). P. 423–428.
26. Kagan V.E., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A. *et al.* Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron // *Toxicol Lett.* 2006 Aug 1. Vol. 165(1). P. 88–100.
27. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation // *Toxicol Sci.* 2004. Vol. 77(1). P. 126–134.

Поступила в редакцию 15.05.2013 г.

Авторский коллектив:

Халиуллин Тимур Оскарович – ассистент кафедры гигиены, медицины труда Казанского государственного медицинского университета (г. Казань, Россия). E-mail: khaliullin.40k@gmail.com

Кисин Елена Рафаиловна – биолог, сотрудник отдела исследований в области патологии и физиологии Национального института охраны и здоровья труда (г. Моргантаун, США). E-mail: edk8@cdc.gov

Мюррей Ребекка Эшли – PhD, сотрудник отдела исследований в области патологии и физиологии Национального института охраны и здоровья труда (г. Моргантаун, США). E-mail: edk8@cdc.gov

Залаялов Рамиль Равилович – канд. мед. наук, ст. преп. кафедры общей гигиены Казанского государственного медицинского университета (г. Казань, Россия). E-mail: ramilzal@nm.ru

Шведова Анна Александровна – д-р мед. наук, руководитель отдела исследований в области патологии и физиологии Национального института охраны и здоровья труда (г. Моргантаун, США). E-mail: ats1@cdc.gov

Фатхутдинова Лилия Минвагизовна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гигиены, медицины труда Казанского государственного медицинского университета (г. Казань, Россия). E-mail: liliya.fatkhutdinova@gmail.com

*Timur O. Khaliullin¹, Elena R. Kisin², Rebecca Ashley Murray²,
Ramil R. Zalyalov¹, Anna A. Shvedova², Liliya M. Fatkhutdinova¹

¹ Department of Hygiene and Occupational Medicine, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation. *E-mail: khaliullin.40k@gmail.com

² Pathology and Physiology Research Branch, Health Effects Laboratory Division National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, USA

Toxic effects of carbon nanotubes in macrophage and bronchial epithelium cell cultures

Single- and multi-walled carbon nanotubes (SWCNTs / MWCNTs), being one of the most promising nanomaterials are becoming more and more common. Accumulated data suggest that there is a risk to human health, upon the occupational contact with carbon nanoparticles. The aim of this study was to evaluate the comparative toxic effects of industrial single- and multi-walled CNTs in macrophages and bronchial epithelial cells. RAW 264.7 murine macrophages culture exposure to MWCNT did not result in significant viability loss but was accompanied by an increase in lactate dehydrogenase (LDH) concentrations in the extracellular medium 48 hours post exposure at all doses (but not after 24 hours). Oxidative stress had a dose- and time-dependent nature, intracellular glutathione levels decreased with increasing dose and exposure time (for the highest dose). SWCNTs exposure of the RAW 264.7 culture reduced the viability by 10–15% after 24 hours, regardless of the dose. After 48 hours viability decreased to 78% at 2.4 ug/cm² SWCNT, and at 24 ug/cm² – down to 50% of the unexposed cells. LDH levels rose sharply 48 hours after exposure at concentrations of 0.2, 2.4 and 24 ug/cm², which generally coincides with the observed viability loss in the same groups. A significant decrease in reduced glutathione levels was found: the higher exposure dose and exposure time were, the lower were the levels. Bronchial epithelial cells BEAS-2B appeared to be little susceptible to the MWCNT introduction: after 24 and 48 hours there were no significant decrease in viability compared to the control culture. The same results were obtained when assessing the cell damage and oxidative stress indicators. BEAS-2B exposure to SWCNTs after 24 h and 48 h caused a small statistically significant dose- and time-dependent viability decrease and a considerable reduction in reduced glutathione levels at highest concentration of nanoparticles 24 ug/cm². Macrophages (RAW 264.7) were much more sensitive to different types of CNTs than bronchial epithelial cells (BEAS-2B). The results show the necessity for available *in vitro* and *in silico* models to evaluate different parameters of nanoparticles toxicity. Comparison of different CNT types should be based not only on viability assessment, but also on specific exposure indicators and biomarkers, such as oxidative stress, cell membrane damage and cytokine profile changes. In addition, during the process of new regulations introduction, nanoparticles should be classified not only by chemical composition, but also by their morphological features.

Key words: carbon nanotubes; nanotoxicology; *in vitro*; macrophages; RAW 264.7.

Received May 15, 2013

References

1. The Nanotech Report. 5th ed. Vol.2. Lux Research. New York, NY: Lux Research; USA; 2007.
2. Global Markets and Technologies for Carbon Nanotubes. [Internet] BCC Research. Market forecasting. July 2012. Available from: <http://www.bccresearch.com/report/carbon-nanotubes-markets-technologies-nan024e.html>
3. Wick P, Manser P, Limbach LK et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 2007;168(2):121-131.
4. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Kanno J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* 2012;103(8):1440-1444.
5. Kim JS, Song KS, Lee JK et al. Toxicogenomic comparison of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) and asbestos. *Arch Toxicol.* 2012 Apr;86(4):553-562.
6. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311(5761):622-627.
7. Davoren M, Herzog E, Casey A. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(3):438-448.
8. Herzog E, Byrne HJ, Davoren M, Casey A, Duschl A, Oostingh GJ. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;236(3):276-281.
9. Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289:698-708.
10. Tabet L, Bussy C, Amara N et al. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J. Toxicol Environ Health A.* 2009;72(2):60-73.
11. Tian F, Cui D, Schwarz H, Estrada GG, Kobayashi H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro.* 2006;20(7):1202-1212.
12. Drent M, Cobben NAM, Henderson R.F. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J.* 1996;9:1736-1742.
13. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 May;157:1666-1680.
14. Hirano S, Fujitani Y, Furuyama A, Kanno S. Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Nov;15;249(1):8-15.
15. Jia G, Wang H, Yan L et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol.* 2005 Mar;1;39(5):1378-1383.
16. Hu X, Cook S, Wang P, Hwang HM, Liu X, Williams QL. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines. *Sci Total Environ.* 2010 Mar;15;408(8):1812-1817.
17. Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett.* 2007 Jan;10;168(1):58-74.
18. Murr LE, Garza KM, Soto KF et al. Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2005 Apr;2(1):31-42.
19. Palomäki J, Karisola P, Pyllkkänen L, Savolainen K, Alenius H. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology.* 2010 Jan;12;267(1-3):125-131.
20. Kang S, Mauter MS, Elimelech M. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent. *Environ Sci Technol.* 2009 Apr;1;43(7):2648-2653.

21. Porter DW, Hubbs A, Mercer R et al. Mouse pulmonary dose- and time-course response induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicol.* 2010;269:136–147.
22. Shvedova AA, Kisin E, Murray AR et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(4):552-565.
23. Mercer RR, Hubbs AF, Scabilloni JF et al. Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol.* 2011;8:21-33.
24. Migliore L, Saracino D, Bonelli A et al. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ Mol Mutagen.* 2010 May;51(4):294-303.
25. Poland CA, Duffin R, Kinloch I et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.* 2008 Jul;3(7):423-428.
26. Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA et al. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicol Lett.* 2006Aug;165(1):88-100.
27. Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci.* 2004;77(1):126-134.