

ТОКСИЧНІСТЬ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОСТРУКТУР У СИСТЕМАХ *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

С.В. Прилуцька, к.біол.н, Д.М. Ротко, Ю.І. Прилуцький, професор,
В.К. Рибальченко, професор

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

РЕЗЮМЕ. Створення нових біосумісних нетоксичних наноматеріалів для ранньої діагностики і лікування захворювань є важливою комплексною проблемою сучасної нанобіотехнології. В огляді узагальнено літературні дані та результати власних досліджень авторів щодо токсичної дії фуллеренів C_{60} , вуглецевих нанотрубок, графену та їхніх модифікацій у системах *in vitro* та *in vivo*. Проаналізовано ризики і перспективи використання цих унікальних наноструктур у біомедицині.

Ключові слова: фуллерен C_{60} , вуглецева нанотрубка, графен, токсичність *in vitro* та *in vivo*.

РЕЗЮМЕ. Создание новых биосовместимых нетоксичных наноматериалов для ранней диагностики и лечения заболеваний является важной комплексной проблемой современной нанобиотехнологии. В обзоре обобщены литературные данные и результаты собственных исследований авторов относительно токсического действия фуллеренов C_{60} , углеродных нанотрубок, графена и их модификаций в системах *in vitro* и *in vivo*. Проанализированы риски и перспективы использования этих уникальных наноструктур в биомедицинских целях.

Ключевые слова: фуллерен C_{60} , углеродная нанотрубка, графен, токсичность *in vitro* и *in vivo*.

SUMMARY. Creation of new nontoxic biocompatible nanomaterials for early diagnosis and treatment of diseases is an important complex problem of modern nanobiotechnology. The literature data and own results of the authors regarding the toxic effects of C_{60} fullerenes, carbon nanotubes, graphene and their modifications *in vitro* and *in vivo* systems are summarized in the review. The risks and prospects of using these unique nanostructures for biomedical applications were analyzed.

Key words: C_{60} fullerene, carbon nanotube, graphene, toxicity *in vitro* and *in vivo*.

Однією з актуальних проблем розвитку сучасних нанобіотехнологій є вирішення комплексного завдання, що лежить на стику хімії, фізики, матеріалознавства, біології та медицини і передбачає цілеспрямований пошук (дизайн), синтез, вивчення властивостей нових матеріалів розміром до 100 нм, яким притаманна висока біодоступність та біосумісність, низька токсичність та специфічна біоактивність, що мають практичне значення для можливого застосування у лікуванні найпоширеніших захворювань. Передбачається, що за допомогою запропонованих унікальних нанотехнологій буде розв'язана проблема ранньої діагностики злоякісних пухлин з визначенням їх локалізації та адресної доставки лікарських препаратів до біологічних мішеней. Серед можливих перспективних і ефективних біомедицинічних агентів значне місце посідають вуглецеві наноструктури, зокрема фуллерен C_{60} [1], нанотрубка [2] та графен [3].

Фуллерен C_{60} — це молекула майже сферичної форми (діаметр 0,72 нм), поверхня якої складається з 12 п'ятикутників і 20 шестикутників, у вузлах яких міститься 60 атомів карбону, поєднаних між собою одинарними і подвійними хімічними зв'язками. Серед можливих інших типів фуллеренів найбільший інтерес для експериментальних біологічних досліджень становить саме молекула C_{60} , яка легко утворюється під час синтезу, характеризується високою хімічною стабільністю та унікальними фотофізичними властивостями [4-5].

Вуглецева нанотрубка (ВНТ) представляє собою циліндрично згорнутий графен, поверхня якого складається з правильних шестикутників, у вершинах яких розміщені атоми карбону. Залежно від кількості згорнутих графенових шарів, з яких вони можуть складатися, ВНТ поділяють на одностінні (ОВНТ) та багатостінні (БВНТ). БВНТ структури типу "російської матрьошки" — це сукупність коаксіально вкладених одна в одну циліндричних ОВНТ. Зазвичай внутрішній діаметр ОВНТ становить від 0,4 до декількох нм. Зовнішній діаметр БВНТ залежно від кількості стінок (відстань між сусідніми стінками близька до величини 0,34 нм — відстані між сусідніми площинами кристалічного графіту) — від десятків до сотень нм, а внутрішній — 4-15 нм. Довжина ВНТ варіює в межах від сотень нм до декількох десятків мкм. Характерною для ВНТ властивістю є агрегування індивідуальних ВНТ з утворенням досить міцних пучків, зв'язок, джгутів. Електрична провідність ОВНТ може мати металічний чи напівпровідниковий характер [5-6]. БВНТ притаманні типові металічні властивості [5-6].

Графен представляє собою шар атомів карбону, з'єднаних у гексагональну сітку товщиною в один атом. Його можна представити також як окрему площину графіту. Наразі встановлено, що саме графен — не лише найміцніший матеріал на Землі, а й найкращий (за кімнатної температури) провідник [7]. Завдяки нанорозмірності, поєднанню

міцності з гнучкістю і малою масою, анти/про-оксидантним властивостям, біодоступності, здатності взаємодіяти з біомолекулами і про-никати всередину клітин перелічені вуглецеві наноструктури є наразі потенційними фармацевтичними сполуками нового класу [8-11]. Однак, передусім потрібно детально з'ясувати їхній вплив на довкілля і зокрема на біооб'єкти загалом. Тому актуальність досліджень токсичної дії як чистих (немодифікованих) фулеренів C_{60} , ВНТ і графену, так і їх модифікацій на клітинному, органному та організменному рівнях не викликає сумнівів.

Токсичність фулеренів C_{60}

Відомості щодо токсичної дії фулеренів C_{60} та їх похідних наразі є суперечливими, що зумовлено, насамперед, концентрацією і розміром цих наночастинок, типом їх хімічної функціоналізації.

Фулерени C_{60} (2.4 мкг/мл), виготовлені з використанням тетрагідрофурану (ТГФ), викликали токсичну дію, а саме посилювали продукцію активних форм кисню (АФК) і процеси перекисного окиснення ліпідів внаслідок пошкодження мембрани клітин різних типів (зокрема, фібробластів шкіри, гепатоцитів і астроцитів) [12]. ТГФ- C_{60} (≤ 10 мкг/мл) не проявляли токсичної активності щодо макрофагів людини у системі *in vitro*, незважаючи на локалізацію в цитоплазмі, ядрі та лізосомах клітин [13]. Нарешті, ТГФ- C_{60} проявляли вищу токсичність порівняно з немодифікованими фулеренами C_{60} у клітинних лініях кератиноцитів NTCC2544 та фібробластів шкіри NHDF людини, меланоми В6 та L929 фібросаркоми миші (діаметр наночастинок становив < 36 нм) [14].

Токсична дія фулеренів C_{60} щодо дермальних фібробластів HDF та клітин карциноми людини HepG2 істотно залежить від типу їх функціоналізації [15]. Так, немодифіковані фулерени C_{60} проявляли більш токсичні ефекти порівняно з їх водорозчинними похідними - фулеренмалонатом, $Na^{+}_{2-3}[C_{60}O_{7-9}(OH)_{12-15}]^{(2-3)-}$ і $C_{60}(OH)_{24}$.

Після 24 год інкубації фулереноли $C_{60}(OH)_{24}$ (1-100 мкг/мл) інтерналізувалися клітинами епітеліоцитів лінії HUVES і викликали дозозалежне зменшення їх життєздатності, яке було аутофагічним і неапоптичним [16]. Після хронічного впливу (10 діб) фулереноли негативно впливали на прикріплення клітин та сповільнювали їх ріст.

Цитотоксичний ефект фулеренолів має значні відмінності щодо різних клітинних ліній [17]. Так, гідроксильовані фулерени $C_{60}(OH)_x$ за концентрації 50 мкг/мл у розчині DMEM істотно зменшують життєздатність і викликають зупинку клітинного циклу в G1-

фазі клітин легень (CHL) та яйцеклітин (CHO) китайського хом'ячка. Однак незначно і без зупинки клітинного циклу вони впливають на виживаність клітин фібросаркоми мишей L929: значення LD_{50} для CHO — 199 мкг/мл, CHL — 75 мкг/мл і L929 — > 1000 мкг/мл.

Ступінь гідроксильовання поверхні фулеренолів також впливає на їх цитотоксичну дію [18]. Так, при культивуванні епідермальних кератиноцитів людини з фулеренолами $C_{60}(OH)_{20}$, $C_{60}(OH)_{24}$ і $C_{60}(OH)_{32}$ через 24 год спостерігали зменшення кількості життєздатних клітин лише у присутності $C_{60}(OH)_{32}$ за концентрації 42.5 мкг/мл.

За дії фулеренолів $C_{60}(OH)_{24}$, розчинених у диметилсульфоксиді, на ізольовані гепатоцити щурів виявлено концентраційно-залежну (0.125-0.25 мМ) клітинну загибель, зумовлену структурно-функціональними пошкодженнями мітохондрій (зростанням неспецифічної проникності, мітохондріальною деполаризацією та інгібуванням синтезу АТФ), а також окисненням глутатіону, тіольних груп білків і перекисним окисненням ліпідів на пізніх стадіях [19]. Токсичний ефект фулеренолів $C_{60}(OH)_{12}$ та фулерену C_{60} за аналогічних концентрацій був менш вираженим, що вказує на те, що гепатотоксичність фулеренолів може залежати від кількості гідроксильних груп на їх поверхні.

Через 24 год після перорального введення шурам суспензії фулеренів C_{60} у фізіологічному розчині або маїсовій олії у концентрації 0.064 та 0.64 мг/кг збільшувався рівень 8-окси-7,8-дигідро-2'-дезоксигуанозину (8-окси-дГ) у клітинах печінки і легень, водночас як в епітеліоцитах товстого кишечника подібного ефекту не спостерігали [20]. При інкубації гепатоцитів лінії HepG2 з фулеренами C_{60} у водній суспензії за концентрації 0.46 мг/мл виявили незначне збільшення вмісту 8-окси-дГ [21]. При цьому формування ковалентних аддуктів ДНК не відбувалось.

При оцінюванні генотоксичної дії суспензій фулеренів C_{60} у воді та етанолі щодо клітин лімфоцитів людини методом "ДНК-комет" виявлено дозозалежну токсичну відповідь [22]. У порівнянні з водною суспензією фулеренів C_{60} , генотоксична відповідь на дію молекул C_{60} , суспендованих в етанолі, була нижчою за їх однакових концентрацій (2.2 мкг/мл). Припускається, що ця відмінність зумовлена різною концентрацією гідратованих фулеренів C_{60} у суспензіях або збільшеним гідроксильованням їх поверхні в етанолі. Пошкодження ДНК відбувається внаслідок окисного стресу.

Додавання немодифікованих фулеренів C_{60} у діапазоні концентрацій 10^{-6} - 10^{-5} М (розмір наночастинок не перевищував 3 нм) до сус-

пензій нормальних (тимоцитів) і трансформованих (асцитної карциноми Ерліха (АКЕ) та лейкозу L1210) клітин не впливало на їх життєздатність, накопичення продуктів ПОЛ у гомогенатах печінки і мозку та стійкість еритроцитів до гемолізу [23].

Дослідження токсичності фулеренів C_{60} та їх похідних ускладнюється тим, що системна відповідь організму загалом на їх дію може значно відрізнятися від результатів, отриманих у дослідах на ізольованих клітинах [24].

Гістопатологічний аналіз та біохімічні тести крові та сечі після одноразового інтравенозного введення шурам водного розчину фулерену $C_{60}(OH)_{30}$ концентрацією 10 мг/кг не виявили його токсичної відповіді упродовж 48 год [25].

Після інтратрахеального введення шурам водних суспензій фулерену C_{60} та фулерену $C_{60}(OH)_{24}$ у концентраціях 0.2-3.0 мг/кг на 2-у добу спостерігали тимчасові запальні процеси у легенях тварин. Повідомляється про відсутність токсичного впливу на тканину легень через 1 тиждень, 1 та 3 місяці після введення обох типів фулеренів [26].

Для водорозчинних поліалкілсульфонованих фулеренів C_{60} , які вводили шурам інтраперитонеально, значення величини LD_{50} становить 600 мг/кг, а мішенню їх токсичної дії є нирки, печінка та жовчний міхур [27].

Після введення шурам шляхом інтраназальної інгаляції як нано- (діаметр 55 нм), так і мікрочастинок (0.93 мкм) фулеренів C_{60} упродовж 10 днів запальних процесів у легенях тварин не було виявлено [28].

Фулерени C_{60} у концентрації 0.12 мг/м³ і діаметром частинок 96 нм потрапляли в організм шурів шляхом вдихання упродовж 6 год/день, 5 днів/тиждень, загалом 4 тижні [29]. Зареєстровано підвищення експресії невеликої кількості генів, пов'язаної з розвитком запалення, оксидативним стресом, апоптозом та активністю металоендопептидаз. Фулерени C_{60} були виявлені в альвеолярних макрофагах та епітеліальних клітинах. Водночас запалення і пошкодження тканин не було значним.

Інтраперитонеальне введення мікронізованих фулеренів C_{60} мишам навіть за високої концентрації 2.5-5.0 г/кг не викликало летальної або гострої токсичності [30]. На ранніх стадіях фулерени C_{60} накопичувалися у клітинах печінки (HSC), що призводило до їх гіпертрофії та гіперплазії. Такі прояви активації клітин HSC свідчать про початок фіброгенезу в печінці внаслідок їх трансформації у міофібробластоподібні клітини (MFC), викликані оксидативним стресом. Але після введення фулеренів C_{60} , незважаючи на активацію HSC, фіброз не розвивався, морфологічні показники печінки не змінювалися.

Через 56 діб після дії фулеренів C_{60} кількість активованих HSC зменшувалася без трансформації у MFC, що, можливо, зумовлено здатністю молекул C_{60} знешкоджувати вільні радикали.

Упродовж 3 тижнів після інтраперитонеального введення шурам водної суспензії фулеренів C_{60} за концентрації 0.5-2.0 г/кг не виявлено гострої або надгострої гепатотоксичності [31]. Гістопатологічні дані підтвердили нормальну паренхімальну структуру печінки без ознак запалення або фіброзу. Значення тесту сериналаніамінотрансферазної активності засвідчили про відсутність пошкодження паренхімних клітин. Концентрація акумуляованого фулерену C_{60} у гепатоцитах з часом зменшувалася, що вказує на їх здатність виводитися з печінки шурів. Інтраперитонеальні ін'єкції шурам водних суспензій фулеренів C_{60} у концентрації 2 мг/кг упродовж 3, 7 та 14 діб перед введенням CCl_4 (1 мг/кг) викликали гепатопротекторну дію. Продемонстровано збереження нормальної морфології печінки, відсутність некротичної або апоптичної загибелі клітин, 12-разове зменшення значень тесту сериналаніамінотрансферазної активності у порівнянні з контрольною групою шурів, яким вводили лише CCl_4 . Припускається, що гепатопротекторний ефект фулеренів C_{60} обумовлений запобіганням розвитку оксидативного стресу внаслідок елімінації ними радикалів $CCl_3O\cdot$ і $CCl_3\cdot$.

Оцінювали протизапальну дію фулеренів $C_{60}(OH)_{20+2}$ за концентрації 0.02-200 мкг у фізіологічному розчині при інтратрахеальному введенні в організм мишей [32]. Запальні процеси у легенях мишей викликали впливом частинок а-кварцу. Попереднє введення фулеренів (<20 мкг) зменшувало наступну запальну відповідь, викликану наночастинками кварцу. Водночас інтратрахеальне введення фулеренів у концентрації 200 мкг (10 мг/кг) викликало запальну відповідь легень, пов'язану з підвищеним синтезом макрофагами запального білка-2. Припускається, що за низьких концентрацій фулереноли проявляють захисні протизапальні властивості завдяки знешкодуванню генерованих АФК.

Важливо зазначити, що наразі більшість літературних даних свідчать, що немодифіковані фулерени C_{60} за низьких концентрацій (близьких до фізіологічних) не проявляють гострої токсичної дії у системах *in vitro* та *in vivo* [33-34]. Припускається, що головними механізмами цитотоксичної дії фулеренів є викликане ними перекисне окиснення ліпідів, розвиток оксидативного стресу та пов'язані з цим наслідки, зокрема генотоксичність і некроз [35].

Токсичність вуглецевих нанотрубок

Відомості щодо токсичної дії ВНТ наразі є суперечливими, що зумовлено, насамперед, такими їхніми характеристиками як тип (ОВНТ або БВНТ), розмір (довжина і діаметр), функціоналізація поверхні хімічними групами, ступінь очистки від домішок металу-каталізатора, концентрація [36-38].

Внаслідок клітинного контакту з БВНТ (діаметр 67 нм, довжина 2.7 мкм; концентрація 2, 5 та 10 мкг/мл) тривалістю до 10 год дозозалежно зменшувалася життєздатність епітеліоцитів бронхів людини BEAS-2B, зростає вміст у культуральному супернатанті фактора інгібування міграції макрофагів, індукувалися фосфорилування р38, ERK1, HSP27 та синтез прозапальних цитокінів IL-6, IL-8, MIF [39]. Припускається, що запальна і цитотоксична відповідь після асоціації БВНТ з клітинами викликана порушеннями цілісності плазматичної мембрани та її функцій.

За дії високоочищених ОВНТ у концентраціях 15, 30 та 60 мкг/мл спостерігали низький токсичний вплив на виживаність клітин, а також посилення продукції NO макрофагами мишей. У той же час макрофаги людини генерували NO у незначній кількості [40].

Високоочищені ОВНТ (за концентрації <0,38 мкг/см²) та БВНТ (3,06 мкг/см²) упродовж 6 год інкубації з альвеолярними макрофагами гвінейських мурчаків активно фагоцитувалися клітинами [41]. Показано, що обидва типи ВНТ знижували життєздатність макрофагів.

За концентрацій 1, 10, 25 та 50 мкг/мл ОВНТ інгібували попередньо стимульовану ліпополісахаридами проліферацію В-лімфоцитів та значно знижували активність клітин — природних кілерів [42].

За концентрацій 1, 5 та 10 мкг/мл очищені ОВНТ спричиняли ушкодження ДНК Т-лімфоцитів людини після 6 год інкубації. За концентрації 25 мкг/мл вони знижували життєздатність Т-лімфоцитів на 29, 31 та 23% через 24, 48 та 72 год інкубації відповідно [43]. При збільшенні дози до 50 мкг/мл кількість життєздатних клітин знижувалася на 32, 42 та 43% через 24, 48 та 72 год інкубації відповідно. Припускається, що зменшення кількості життєздатних клітин пов'язано зі зниженням метаболічної активності Т-лімфоцитів.

Функціоналізація ОВНТ поліетиленгліколом та амонієм (шляхом 1,3-диполярного циклоприєднання) зменшувала їх негативний вплив на життєздатність В- і Т-лімфоцитів та макрофагів *in vitro*, зокрема ОВНТ за концентрації 1-10 мкг/мл не спричиняли загибель і порушення функціональних властивостей В- і Т-лімфоцитів [44].

Неочищені ОВНТ (з домішками заліза і нікелю) за концентрації 0.06 мкг/мл зменшували життєздатність епідермальних кератиноцитів людини (HaCaT), збільшуючи генерування вільних радикалів і знижуючи активність антиоксидантної системи у клітинах [45]. Присутність домішок металів у складі ОВНТ призводила до виникнення токсичних ефектів в епітеліальних клітинах легень людини (NR 8383, A549) [46], у той час як очищені ОВНТ і БВНТ (5-100 мкг/мл) не спричиняли токсичної дії на ці клітини.

Функціоналізовані ВНТ залежно від їх типу і концентрації у середовищі інкубації прискорювали процеси гемолізу еритроцитів щура та знижували життєздатність нормальних і трансформованих клітин за умов *in vitro* [47]. Так, водні суспензії карбоксифункціоналізованих ОВНТ і БВНТ у концентраціях >0,5 мкг/мл і >0,1 мкг/мл відповідно спричиняли токсичну дію на тимоцити і клітини лейкозу L1210, яка мала часо- та дозозалежний характер. Водні суспензії карбоксифункціоналізованих БВНТ у концентраціях до 25 мкг/мл достовірно не проявляли токсичної дії на еритроцити і тимоцити щурів, у той час як за концентрації 50 мкг/мл прискорювався гемоліз еритроцитів, знижувалася кількість життєздатних тимоцитів і гальмувалася активність мітохондріального електронно-транспортного ланцюга [48].

Цитотоксичних ефектів при культивуванні фібробластів мишей лінії L929 з карбоксифункціоналізованими БВНТ не виявлено, хоча спостерігали утворення ізольованих клітин, а після 7 днів — взаємодію між мембранами клітин L929 та БВНТ, а також прикріплення їх до стінок фібробластів [49]. Інкубація фібробластів мишей лінії L929 упродовж 7 днів з високоочищеними нефункціоналізованими БВНТ протягом 96 год не знижувала їх життєздатності і сприяла високій адгезії [50]. При інкубації фібробластів людини з очищеними БВНТ упродовж 7 днів не спостерігали синтезу передзапального цитокіну IL-6, продукції вільних радикалів, зниження життєздатності фібробластів [51].

При шкірному контакті мишей з неочищеними ОВНТ (масова частка заліза 30%) упродовж 5 днів за концентрацій 40, 80 та 160 мкг/тварину спостерігали зростання товщини епідермісу шкіри, акумуляцію та активацію дермальних фібробластів, поліморфоядерних лейкоцитів і тучних клітин, вивільнення прозапальних цитокінів, виснаження вмісту глутатіону, окиснення тиольних і карбонільних груп білків, підвищення активності мієлопероксидази, що асоціюється з генеруванням вільних радикалів та оксидативним стресом [52].

Неочищені та високоочищені БВНТ (довжина 10-20 мкм, діаметр 100-150 нм) були субкутанно імплантовані мишам у кількості 1 мг [53]. Аналізуючи зміни у периферичних Т-клітинах та рівнях цитокінів показано, що для БВНТ з домішками властива токсична дія, водночас як високоочищені БВНТ проявляли високу біосумісність.

Одноразове введення БВНТ викликало цитотоксичну і запальну відповідь у легенях мишей [54]. На 1-й і 7-й день після інтратрахеального введення тваринам суспензії 20 або 40 мкг БВНТ у 40 мкл фосфатнобуферного розчину виявлено значну міграцію поліморфоядерних лейкоцитів. Аналіз рідини бронхоальвеолярного лаважу на 1-у добу свідчив про значне зростання загального вмісту лактатдегідрогенази, TNF- α , IL-1 β , муцину і сурфактантного білка D. Однак на 7-й день усі показники біомаркерів, окрім сурфактантного білка та муцину, вернулись на початковий рівень. Зростання вмісту 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину в сечі та зменшення рівня позаклітинної супероксиддисмутази свідчать про системний оксидативний стрес.

Після одноразового інтратрахеального закраплювання щурам високодиспергованих у воді з використанням Tween 80 БВНТ (діаметр 60 нм, довжина 1.5 мкм; концентрація 0.04, 0.2 і 1 мг/кг) виявлено дозозалежне пошкодження легень [55]. Короткотривалу запальну реакцію у легенях спостерігали лише у групі з дозуванням БВНТ 1 мг/кг. БВНТ, що знаходились у легенях щурів, переважно були фагоцитовані альвеолярними макрофагами, які до 6 місяців після інстиляції акумулювалися в альвеолах (деякі з них у вигляді гранульом). Інтратрахеальне введення очищених БВНТ (12.5 мг/тварину) викликало розвиток патології легень гвінейських мурчаків та пневмонії упродовж 3 місяців після впливу. Водночас спостерігали збільшення кількості макрофагів, еозинофілів, лімфоцитів і нейтрофілів у легенях [56]. ОВНТ ефективніше знешкоджуються макрофагами, а ніж БВНТ, що може бути пов'язано з їхніми меншими розмірами [57].

БВНТ (діаметр 10-50 нм) після вдихання мишами у концентрації 30 мг/м³ упродовж 6 год переміщуються до субплевральної ділянки, після чого проникають у субплевральну стінку та субплевральні макрофаги [58]. На наступну добу зростала кількість та розміри скупчень моноядерних клітин, серед яких були присутні макрофаги з вмістом БВНТ. Через 2 та 6 тижнів після вдихання розвивався субплевральний фіброз. Токсична дія за такого способу надходження БВНТ мала дозозалежний характер. При вдиханні БВНТ у меншому дозуванні (1 мг/м³) подібного ефекту не спостерігали.

Мишей піддавали глотковій аспірації 10, 20, 40 та 80 мкг БВНТ [59]. Розподіл їх проникнення оцінювали на 1, 7, 28 та 56 добу. Протягом 1-ї доби акумуляцію БВНТ спостерігали у повітряних шляхах, альвеолярних та субплевральних ділянках (18%, 81.6% та 0.6%, відповідно). Висока щільність проникнення у субплевральну тканину та інтраплевральну ділянку на 7-у добу після вдихання знижувалась завдяки виведенню альвеолярними макрофагами, досягаючи стабільного рівня з 28 до 56-ї доби.

Пильові аерозолі БВНТ при вдиханні мишами упродовж 90 днів викликали пошкодження, аналогічні до ефектів інтратрахеального введення — запалення та утворення мультифокальних гранульом у легенях та асоційованих лімфатичних вузлах за концентрацій 0.5 та 2.5 мг/м³ [60]. За максимальної концентрації 2.5 мг/м³ також проявлялась нейтрофілія. Проте ознак систематичної токсичності не спостерігали.

Частково деградовані ОВНТ після 12 год інкубації з мієлопероксидазою людини (hMPO) та H₂O₂ викликали меншу запальну відповідь у мишей у порівнянні з недеградованими ОВНТ [61]. Кількість нейтрофілів та рівень цитокінів у тварин, яким фарингіальною аспірацією вводили біодеградовані ОВНТ у суспензії фосфатно-буферного розчину дозуванням 40 мкг/тварину, на 1-у і 7-у добу не відрізнялись від контрольних значень, у їх легенях не було виявлено гранульом, у той час як недеградовані короткі ОВНТ викликали гостру запальну відповідь.

ОВНТ та БВНТ (60 мкг/200 мкл фосфатного буфера) циркулювали у крові мишей упродовж 3,5 год, після чого їх було виведено з кровотоку в інтактному вигляді із сечею. Цитотоксичних ефектів та загибелі тварин не зафіксовано [62].

Взаємодія ВНТ з різними ділянками біомембрани (адсорбція, ініціювання появи крайових дефектів у структурі ліпідного бішару, формування трансмембранної пори і проникнення крізь клітинну плазматичну мембрану) [63-64], їх дія як модуляторів/блокаторів потенціалкерованих калієвих каналів [65] здатна спричиняти цитотоксичні ефекти. Існує також думка [9], що токсична дія ВНТ може бути пов'язана з їх здатністю генерувати АФК, що призводить до окисного стресу і загибелі клітин.

Токсичність графену

Незважаючи на перспективи використання графену як елементів штучних мембран та ефективних адсорбентів, питання його токсичності залишається наразі відкритим. Так, автори роботи [66] вказують на значні

відмінності у взаємодії чистого і функціоналізованого графену з біосистемами.

Епітеліоцити нирок мавп лінії Vero інкубували за присутності графену (товщина 0.8 нм, концентрація 25 мкг/мл) упродовж 24 год. З використанням конфокальної мікроскопії виявлено значну акумуляцію чистого графену на клітинних мембранах. Дослідження механічного пошкодження плазматичної мембрани внаслідок акумуляції графену, як можливого чинника некрозу, проводили за допомогою лактатдегідрогеназного (ЛДГ) тесту. Показники ЛДГ були низькими навіть за високої концентрації графену 300 мкг/мл. Отже, накопичення графену на поверхні мембран клітин не викликало їхнього пошкодження, що могло б призвести до некрозу.

Активацию ранніх стадій апоптичної загибелі клітин лінії Vero викликали внутрішньоклітинним генеруванням АФК внаслідок акумуляції чистого графену на плазмалемі. За дії графену у концентрації 10-300 мкг/мл упродовж 24 год на епітеліоцити виявлено, що кількість АФК у клітинах дозозалежно зростала. Інші можливі шляхи розвитку апоптичної відповіді на дію графену включають блокування Ca^{2+} каналів та зниження транспорту поживних речовин. Внаслідок взаємодії з чистим графеном у концентрації 100 мкг/мл 50% клітин лінії Vero загинуло, а за його концентрації 300 мкг/мл частка мертвих клітин збільшувалась до 60%.

Функціоналізований карбоксильними групами графен потрапляв всередину епітеліоцитів, локалізуючись у перинуклеарному просторі. Він проявляв незначний вплив на життєздатність цих клітин — за максимальної концентрації 300 мкг/мл 89% клітин залишались життєздатними. За однакової концентрації обох зразків графену у культуральному середовищі ефективна концентрація акумульованого на поверхні клітин епітеліоцитів чистого графену була значно вищою порівняно з інтерналізованим карбоксифункціоналізованим графеном. Припускається, що функціоналізація поверхні графену має вирішальне значення для пригнічення цитотоксичних ефектів, пов'язаних із сильними гідрофобними взаємодіями, наслідком яких є акумуляція графену на клітинних мембранах.

Оксид графену (ОГ; розміри 160 ± 90 нм, 430 ± 300 нм і 780 ± 410 нм) у концентрації 10-200 мкг/мл не здатний проникати всередину клітин карциноми людини лінії A549 [67]. Однак мали місце дозозалежні прояви оксидативного стресу та незначне зменшення життєздатності клітин за високих концентрацій ОГ. При культивуванні клітин A549 на субстраті з ОГ спостерігали нормальну адгезію та відсутність

ознак цитотоксичного впливу. Встановлено, що розмір ОГ впливає на його токсичність: за високих концентрацій більші ОГ (780 ± 410 нм) є менш токсичними. Концентраційно-залежні прояви цитотоксичності ОГ пояснюються можливістю блокування ними мембранних пор, на що вказує зниження показників ЛДГ-тесту в експериментах.

При культивуванні фібробластів людини HDF з ОГ (розмір >1 мкм) у концентрації <20 мкг/мл упродовж 1-5 діб токсичного ефекту не було виявлено [68]. За високої концентрації (50 мкг/мл) спостерігали зменшення клітинної адгезії, проникнення ОГ всередину клітин з локалізацією у лізосомах, мітохондріях і цитоплазмі, а також апоптоз клітин. Припускається, що внутрішньоклітинна передача сигналу до ядра після прикріплення ОГ до поверхні клітин викликає зменшення експресії генів, пов'язаних із синтезом білків адгезії.

Інтравенозне введення мишам ОГ у концентрації 0.1-0.25 мг не викликало токсичної відповіді. За високої концентрації ОГ 0.4 мг у легенях формувалися гранульоми, значна кількість піддослідних тварин загинула. Показано, що ОГ накопичувався у легенях, печінці, селезінці та нирках. Специфічна форма великих ОГ значно ускладнює його виведення нирками, тому його накопичення за високих концентрацій негативно впливало на функціонування органів, що призводило до загибелі організму загалом.

Інкубація тромбоцитів з ОГ упродовж 10 хв викликала інтегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ -опосередковану агрегацію та адгезію клітин до іммобілізованого фібриногену [69]. Агрегація тромбоцитів за концентрації ОГ 2 мкг/мл була сильнішою, а ніж за дії тромбіну. Молекулярні механізми посилення ОГ реактивності тромбоцитів проявлялися у вивільненні внутрішньоклітинного Ca^{2+} , активації Src-кіназ, значному фосфорилуванні внутрішньоклітинних білків за залишками Tug. За концентрацій ОГ 5-20 мкг/мл спостерігали дозозалежну деполаризацію мітохондріальної мембрани. За високої концентрації ОГ (20 мкг/мл) індукувався апоптичний шлях загибелі клітин без ознак некротичного порушення цілісності мембрани. У гістологічних зрізах легень мишей, отриманих через 15 хв після інтравенозного введення ОГ у концентрації 250 мкг/кг, спостерігали розвиток тромбозу та значну тромбоемболію судин.

Модифікація поверхні графену аміногрупами повністю усувала його активаційну дію на тромбоцити [70]. При інтравенозному введенні мишам аміномодифікованого графену (АГ) у концентрації 250 мкг/кг не відбувалося розвитку тромбозу. Інкубація тромбоцитів людини з АГ за концентрацій 2-20 мкг/мл не

впливала на внутрішньоклітинну Ca^{2+} -сигналізацію та активацію фосфорилування Тугзалишків. Тромбоцити зберігали життєздатність після 1 год впливу АГ у концентрації 20 мкг/мл. Продемонстровано відсутність гемолізу за концентрації АГ 50 мкг/мл. Припускається, що висока гемосумісність АГ зумовлена поєднанням його гідрофільних властивостей з екрануванням негативного заряду гідроксильних і карбоксильних груп.

Показано [71], що після інтравенозного введення мишам одно- та двошарового графену (розмір 10-30 нм), функціоналізованого біосумісним поліетиленгліколем (ПЕГ-графен) у концентрації 20 мг/кг, він накопичувався, головним чином у ретикулоендотеліальній системі, включаючи печінку і селезінку, та поступово виводився нирками та фекально. З використанням біохімічних тестів крові та гістологічних даних встановлено, що ПЕГ-графен не викликав помітної токсичності у мишей упродовж 3 місяців після введення.

Отже, хімічна структура, розмір, концентрація — це головні чинники, які зумовлюють токсичну дію графену у системах *in vitro* та *in vivo*.

Ризики біомедичного застосування

Разом зі значними перспективами у використанні розглянутих вуглецевих наноструктур у медицині, зокрема у ранній діагностиці

та лікуванні захворювань, існують також певні проблеми і перестороги на цьому шляху. Так, вдихання цих наночастинок викликає запальні процеси у легенях. Дані біологічних випробувань водних дисперсій фулеренів C_{60} і ВНТ насторожують щодо можливого токсичного впливу на організм людини. З іншого боку, наводяться аргументовані докази, що немодифіковані фулерени C_{60} не є токсичними загалом, або, як і ВНТ, не виявляють гострої токсичної дії у системах *in vitro* та *in vivo* за низьких (фізіологічних) концентрацій. Наразі достовірно встановлено, що токсичність молекул C_{60} , ВНТ і графену істотно залежить від модифікації їхньої поверхні, умов синтезу і обробки.

Отже, питання токсичності нановуглецевих частинок, їх надходження і розповсюдження у внутрішньоклітинному просторі, накопичення в органах та виведення з допустимою швидкістю залишаються досі відкритими. Тому в разі встановлення біобезпеки для організму ці вуглецеві наноструктури можуть набути широкого застосування у фармакології, наприклад, для таргетного спрямування до клітинних органел, впливу на внутрішньоклітинні процеси та індукції загибелі трансформованих клітин [72-75].

ЛІТЕРАТУРА

1. C_{60} : Buckminsterfullerene / H.W. Kroto, S. Heath, S.C. O'Brien [et al.] // *Nature*. — 1985. — V.318. — P. 162–163.
2. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon / Iijima S. // *Nature*. — 1991. — V.354. — P. 56–58.
3. Electric field effect in atomically thin carbon films / K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov [et al.] // *Science*. — 2004. — V.306. — P. 666–669.
4. Елецкий А.В. Фуллерены и структуры углерода / А.В. Елецкий, Б.М. Смирнов // *УФН*. — 1995. — Т. 165. — С. 977–1009.
5. Dresselhaus M.S. Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes: Their Properties and Applications. / M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P.C. Eklund. — New York: Academic Press — 1996. — 985 p.
6. Елецкий А.В. Углеродные нанотрубки / А.В. Елецкий // *УФН*. — 1997. — Т. 167. — С. 945–972.
7. Сагалянов І.Ю. Графенові системи: способи виготовлення й оброблення, структуроутворення та функціональні властивості / І.Ю. Сагалянов, Ю.І. Прилуцький, Т.М. Радченко, В.А. Татаренко // *УФМ*. — 2010. — Т. 11. — С. 95–138.
8. Прилуцька С.В. Вуглецеві нанотрубки як новий клас матеріалів для біонанотехнології / С.В. Прилуцька, О.В. Ременяк, Ю.В. Гончаренко, Ю.І. Прилуцький // *Біотехнологія*. — 2009. — Т. 2. — С. 55–66.
9. Прилуцька С.В. Перспективи використання вуглецевих нанотрубок у протираковій терапії / С.В. Прилуцька, О.В. Ременяк, А.П. Бурлака, Ю.І. Прилуцький // *Онкологія*. — 2010. — Т. 12. — С. 5–9.
10. Ротко Д.М. Вуглецеві нанотрубки як новітні матеріали для нейроінженерії / Д.М. Ротко, С.В. Прилуцька, К.І. Богущька, Ю.І. Прилуцький // *Біотехнологія*. — 2011. — Т. 4. — С. 9–24.
11. Прилуцька С.В. Фулерен C_{60} та його похідні як протипухлинні агенти: перспективи і проблеми / С.В. Прилуцька, Ю.М. Кічмаренко, К.І. Богущька, Ю.І. Прилуцький // *Біотехнологія*. — 2012. — Т. 5. — С. 9–17.
12. Nano- C_{60} cytotoxicity is due to lipid peroxidation / C.M. Sayes, A.M. Gobin, K.D. Ausman [et al.] // *Biomater*. — 2005. — V.26. — P. 7587–7595.
13. Uptake of C_{60} by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography / A.E. Porter, K. Muller, J. Skepper [et al.] // *Acta Biomater*. — 2006. — V.2. — P. 409–419.
14. The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes / Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, D. Kleut [et al.] // *Biomater*. — 2007. — V.28. — P. 5437–5448.
15. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes / C.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Guo [et al.] // *Nano Lett*. — 2004. — V.4. — P. 1881–1887.
16. Yamawaki H. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells / H. Yamawaki, N. Iwai // *Am. J. Physiol*. — 2006. — V. 290. — P. C1495–C1502.
17. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullereneol in different cell lines / Y. Su, J.Y. Xu, P. Shen [et al.] // *Toxicol*. — 2010. — V.10. — P.155–159.
18. In vitro toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells / J.G. Saathoff, A.O. Inman, X.R. Xia [et al.] // *Toxicol. in vitro*. — 2011. — V.25. — P. 2105–2112.
19. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction / Y. Nakagawa, T. Suzuki, H. Ishii [et al.] // *Arch. Toxicol*. — 2011. — V.85. — P.1429–1440.
20. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C_{60} fullerenes and single-walled carbon nanotubes /

- J.K. Folkmann, L. Risom, N.R. Jacobsen [et al.] // *Environ. Health Perspect.* — 2009. — V.117. — P.703–708.
21. Matsuda S. Genotoxicity of colloidal fullerene C₆₀ / S. Matsuda, S. Matsui, Y. Shimizu, T. Matsuda // *Environ. Sci. Technol.* — 2011. — V.1. — P.4133–4138.
 22. Stable colloidal dispersions of C₆₀ fullerenes in water: evidence for genotoxicity / A. Dhawan, J.S. Taurozzi, A.K. Pandey [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* — 2006. — V. 40. — P.7394–7401.
 23. Study of C60 fullerenes and C60-containing composites cytotoxicity in vitro / S.V.Prylutska, O.P. Matyshevska, A.A. Golub [et al.] // *Mater. Sci. Engineer. C.* — 2007. — V.27. — P. 1121–1124.
 24. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity / H.J. Johnston, G.R. Hutchison, F.M. Christensen [et al.] // *Toxicol. Sci.* — 2010. — V.114. — P. 162–182.
 25. Lack of hydroxylated fullerene toxicity after intravenous administration to female sprague-dawley rats / N.A. Monteiro-Riviere, K.E. Linder, A.O. Inman [et al.] // *J. Toxicol. Environ. Health, Part A.* — 2012. — V.75. — P. 367–373.
 26. Sayes C.M. Comparative pulmonary toxicity assessments of C₆₀ water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles / C.M. Sayes, A.A. Marchione, K.L. Reed, D.B. Warheit // *Nano Lett.* — 2007. — V.7. — P. 2399–2406.
 27. Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C60 in rats / H.H. Chen, C. Yu, T.H. Ueng [et al.] // *Toxicol. Pathol.* — 1998. — V.26. — P. 143–151.
 28. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C₆₀ fullerene nanoparticles and microparticles / G.L. Baker, A. Gupta, M.L. Clark [et al.] // *Toxicol. Sci.* — 2008. — V.101. — P. 122–131.
 29. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C₆₀ fullerene particles / K. Fujita, Y. Morimoto, A. Ogami [et al.] // *Toxicol.* — 2009. — V.258. — P. 47–55.
 30. Moussa F. Early effects of C₆₀ administration in Swiss mice: A preliminary account for in vivo C₆₀ toxicity / F. Moussa // *Fuel Energy Abstracts.* — 1996. — V. 37. — P. 137.
 31. [60] fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity / N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel [et al.] // *Nano Lett.* — 2005. — V.5. — P. 2578–2585.
 32. Polyhydroxylated C60 fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice / M. Roursgaard, S.S. Poulsen, C.L. Kepley [et al.] // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* — 2008. — V.103. — P. 386–388.
 33. Kolosnjaj J. Toxicity studies of fullerenes and derivatives / J. Kolosnjaj, H. Szwarc, F. Moussa // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2007. — V.620. — P. 168–180.
 34. Review of fullerene toxicity and exposure-appraisal of a human health risk assessment, based on open literature / K. Aschberger, H.J. Johnston, V. Stone [et al.] // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* — 2010. — V.58. — P. 455–473.
 35. Rouse J.G. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes / J.G. Rouse, J. Yang, A.R. Barton, N.A. Monteiro-Riviere // *Toxicol. in vitro* — 2006. — V.20. — P. 1313–1320.
 36. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials / A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio [et al.] // *Nano Lett.* — 2006. — V. 6. — P. 1121–1125.
 37. Toxicity of single-walled carbon nanotube: How we were wrong? / H.X. Ren, X. Chen, J.H. Liu [et al.] // *Mater. Today.* — 2009. — V.13. — P. 6–8.
 38. Zhao X. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels / X. Zhao, R. Liu // *Environ. Inter.* — 2012. — V.40. — P. 244–255.
 39. Hirano S. Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells / S. Hirano, Y. Fujitani, A. Furuyama, S. Kanno // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 2010. — V.249. — P. 8–15.
 40. Fiorito S. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages / S. Fiorito, A. Serafino, F. Andreola, P. Bernier // *Carbon.* — 2006. — V. 44. — P. 1100–1105.
 41. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene / G. Jia, H. Wang, L. Yan [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* — 2005. — V. 39. — P. 1378–1383.
 42. Zhang J. Effect of single-walled carbon nanotubes on primary immune cells in vitro / J. Zhang, X. Ji, C. Liu [et al.] // *Front. Mater. Sci. China.* — 2008. — V.2. — P. 228–232.
 43. Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes / O. Zeni, R. Palumbo, R. Bernini [et al.] // *Sensors.* — 2008. — V.8. — P. 488–499.
 44. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells / H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin [et al.] // *Nano Lett.* — 2006. — V.6. — P. 1522–1528.
 45. Exposure to carbon nanotube material II: assessment of the biological effects of nanotube materials using human keratinocytes / A.A. Shvedova, E.R. Kisin, A.R. Murray [et al.] // *J. Toxicol. Environ. Health.* — 2003. — V.66. — P. 1901–1918.
 46. Pulskamp K. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants / K. Pulskamp, S. Diabate, H.F. Krug // *Toxicol. Lett.* — 2007. — V.168. — P. 58–74.
 47. Ременяк О.В. Порівняльний аналіз цитотоксичності вуглецевих нанотрубок / О.В. Ременяк, С.В. Прилуцька, Ю.І.Прилуцький, О.П. Матишевська // *Доповіді НАН України.* — 2010. — № 3. — С. 180–183.
 48. Estimation of multi-walled carbon nanotubes toxicity in vitro / S.V. Prylutska, I.I. Grynyuk, O.P. Matyshevska [et al.] // *Physica E.* — 2008. — V.40. — P. 2565–2569.
 49. Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks scaffolds for cell seeding and growth / M.A. Correa-Duarte, N. Wagner, J. Rojas-Chapana [et al.] // *Nano Lett.* — 2004. — V. 4. — P. 2233–2236.
 50. Biocompatibility of multi-walled carbon nanotubes grown on titanium and silicon surfaces / A.O. Lobo, E.F. Antunes, M.B.S. Palma [et al.] // *Mater. Sci. Engineer. C.* — 2008. — V.28. — P. 532–538.
 51. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility / J. Chlopek, B. Czajkowska, B. Szaraniec [et al.] / Chlopek J., Czajkowska B., Szaraniec B. [et al.] // *Carbon.* — 2006. — V.44. — P. 1106–1111.
 52. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes / A.R.Murray, E.Kisin, S.S. Leonard [et al.] // *Toxicol.* — 2009. — V.257. — P. 161–171.
 53. In vivo immunological toxicity in mice of carbon nanotubes with impurities / I. Koyama, S. Kim, Y.A. Hayashi [et al.] // *Carbon.* — 2009. — V.47. — P. 1365–1372.
 54. Han S.G. Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes / S.G. Han, R. Andrews, C.G. Gairola // *Inhalation Toxicol.* — 2010. — V.22. — P. 340–347.
 55. Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats / N. Kobayashi, M. Naya, M. Ema [et al.] // *Toxicol.* — 2010. — V.276. — P. 143–153.
 56. Preliminary results on the pathogenic effects of intratracheal exposure to one-dimensional nanocarbons / H. Grubek-Jaworska, P. Nejman, N. Czuminska [et al.] // *Carbon.* — 2006. — V.44. — P. 1057–1063.
 57. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study / C.A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* — 2008. — V.3. — P. 423–428.
 58. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice / J.P. Ryman-Rasmussen, M.F. Cesta, A.R. Brody [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* — 2009. — V.4. — P. 747–751.
 59. Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes / R.R. Mercer, A.F. Hubbs, J.F. Scabilloni [et al.] // *Particle Fibre Toxicol.* — 2010. — V.7. — P. 28–34.

60. Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months / L. Ma-Hock, S. Treumann, V. Strauss [et al.] // *Toxicol. Sci.* — 2009. — V.112. — P. 468–481.
61. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation / V.E. Kagan, N.V. Konduru, W. Feng [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* — 2010. — V.5. — P. 354–359.
62. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers / R. Singh, D. Pantarotto, L. Lacerda [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — V.103. — P. 3357–3362.
63. Мембранотропна дія вуглецевих нанотрубок / О.В. Ремеляк, С.В. Прилуцька, А.В. Бичко [та ін.] // *Доповіді НАН України.* — 2009. — N 2. — С. 163–167.
64. Effect of iron-doped multi-walled carbon nanotubes on lipid model and cellular plasma membranes / S. Prylutska, R. Bilyy, T. Schkandina [et al.] // *Mater. Sci. Engineer. C.* — 2012. — V.32. — P. 1486–1489.
65. Park K.H. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers / K.H. Park, M. Chhowalla, Z. Iqbal, F. Sesti // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V.278. — P. 50212–50216.
66. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene / A. Sasidharan, L.S. Panchakarla, P. Chandran [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* — 2011. — V.3. — P. 2461–2464.
67. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells / Y. Chang, S.T. Yang, J.H. Liu [et al.] // *Toxicol. Lett.* — 2011. — V.5. — P. 201–210.
68. Wang K. Biocompatibility of graphene oxide / K. Wang, J. Ruan, H. Song [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* — 2011. — V.6. — P. 1–8.
69. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets / S.K. Singh, M.K. Singh, M.K. Nayak [et al.] // *ACS Nano.* — 2011. — V.5. — P. 4987–4996.
70. Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications / S.K. Singh, M.K. Singh, P.P. Kulkarni [et al.] // *ACS Nano.* — 2012. — V.6. — P. 2731–2740.
71. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice / K. Yang, J. Wan, S. Zhang [et al.] // *ACS Nano.* — 2011. — V.5. — P. 516–522.
72. Hyperthermic effect of multi-walled carbon nanotubes stimulated with near infrared irradiation for anticancer therapy: in vitro studies / A. Burlaka, S. Lukin, S. Prylutska [et al.] // *Exp. Oncol.* — 2010. — V.32. — P. 48–50.
73. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis / S.V. Prylutska, A.P. Burlaka, Yu.I. Prylutsky [et al.] // *Exp. Oncol.* — 2011. — V.33. — P. 162–164.
74. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy / S.V. Prylutska, A.P. Burlaka, P.P. Klymenko [et al.] // *Cancer Nanotechnol.* — 2011. — V.2. — P. 105–110.
75. Comparative study of antitumor effect of pristine C₆₀ fullerenes and doxorubicin / S.V. Prylutska, A.P. Burlaka, Yu.I. Prylutsky [et al.] // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4. — С. 82–87.

Надійшла до редакції 26.06.2012 р.