

Гмошинский И.В.<sup>1</sup>, Шипелин В.А.<sup>1</sup>, Хотимченко С.А.<sup>1,2</sup>

## Наноцеллюлозы: характеристика опасности и возможные риски (обзор литературы)

<sup>1</sup>ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», лаборатория пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий, 109240, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», 119991, Москва, Россия

Наноцеллюлозы (НЦ) имеют широкие перспективы применения в производстве изделий медицинского назначения, композиционных материалов и покрытий, электроники, пищевой и фармацевтической продукции. К основным видам НЦ относятся нановолокнистая (НВЦ), нанокристаллическая (НКЦ), выделяемые из природного (преимущественно растительного) сырья, и получаемая путём микробного синтеза бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ). Производственный процесс НЦ может включать множество факторов, способных влиять на её токсикологические характеристики, такие как остаточные количества химикатов и ферментных препаратов, используемых при выделении и модификации НЦ, контаминация НЦ из природных источников микотоксинами, тяжёлыми металлами, пестицидами, диоксинами. В случае НЦ микробного происхождения остаётся открытым вопрос о безопасности соответствующих штаммов-продуцентов, большинство из которых являются генетически модифицированными. Отдельного внимания заслуживает способность НЦ проявлять токсичность для живых организмов в отличие от её химического аналога в традиционной форме. Расширение ассортимента продукции, содержащей НЦ и тесно контактирующей с человеком, в первую очередь пищевой продукции, упаковочных материалов, фармакологических препаратов и изделий медицинского назначения, требует тщательной оценки возможных рисков, связанных с воздействием НЦ на организм человека.

Целью настоящей статьи является обзор литературы о потенциальных рисках, обусловленных токсическим действием НЦ на живые организмы при различных путях экспозиции, за период с 2010 по 2021 г.

Приводятся сведения о токсичности в системах *in vitro*, в частности о способности к индукции окислительного стресса и воспаления. Представлены результаты исследований ингаляционной и пероральной токсичности *in vivo*, данные о канцерогенности, реакции иммунных клеток на НЦ и её способности к индукции иммунологической толерантности. По результатам сравнительного анализа проведённых исследований установлено, что различные виды НЦ слабо влияют на жизнеспособность клеток *in vitro* и не обладают выраженной острой токсичностью *in vivo*. Однако противоречивые результаты исследований провоспалительных и иммунологических эффектов различных форм НЦ указывают на необходимость проведения дальнейшего их изучения с целью установления максимальных недействующих доз, в первую очередь при ингаляционном и пероральном путях поступления.

**Ключевые слова:** наноцеллюлоза; нановолокна; наноматериалы; токсичность *in vivo*; токсичность *in vitro*; иммунотоксичность; канцерогенность; дендритные клетки; иммунологическая толерантность; эндотоксин; обзор

**Для цитирования:** Гмошинский И.В., Шипелин В.А., Хотимченко С.А. Наноцеллюлозы: характеристика опасности и возможные риски (обзор литературы). *Гигиена и санитария*. 2023; 102(2): 181–190. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-2-181-190> <https://elibrary.ru/kifnig>

**Для корреспонденции:** Гмошинский Иван Всеволодович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Москва. E-mail: gmosh@ion.ru

**Участие авторов.** Все соавторы внесли равнозначный вклад в исследование и подготовку статьи к публикации.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Поисково-аналитическая работа проведена за счёт средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема Минобрнауки России № 0410-2022-0003).

Поступила: 05.08.2022 / Принята к печати: 08.12.2022 / Опубликовано: 25.03.2023

Ivan V. Gmoshinski<sup>1</sup>, Vladimir A. Schipelin<sup>1</sup>, Sergey A. Khotimchenko<sup>1,2</sup>

## Nanocelluloses: hazard characteristics and possible risks (literature review)

<sup>1</sup>Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and food Safety, Department of food toxicology and nanotechnology safety evaluation, Moscow, 109240, Russian Federation;

<sup>2</sup>First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Department of Food Hygiene and Toxicology, Moscow, 119991, Russian Federation

Nanocelluloses (NCs) have broad application prospects in medicine as implants, cell scaffolds and dressings, in the production of composite materials and coatings, electronics, food and pharmaceutical products. The main types of NCs include nanofibrous (NFC), nanocrystalline (NCC) cellulose isolated from natural, predominantly plant materials, and bacterial nanocellulose (BNC) obtained by microbial synthesis. The production process of NC can include many factors potent of affecting their toxicological characteristics, such as residual amounts of chemicals and enzyme preparations used in the isolation and modification of NC, contamination of NC from natural sources with mycotoxins, heavy metals, pesticides, and dioxins. In the case of NCs of microbial origin, the question of the safety of the respective producer strains remains open, most of which are genetically modified. Special attention deserves the ability of NC to exhibit toxicity to living organisms, different from their chemical counterpart in its traditional form. Expanding the range of products containing NC in close contact with human, primarily food products, packaging materials, pharmacological preparations and medical materials, requires a thorough assessment of the possible risks associated with the impact of NC on the human body.

The purpose of the research is to review the literature over 2010 to 2021 on the potential risks associated with the toxic effects of NC on living organisms through various exposure routes.

Information is provided on toxicity in *in vitro* systems, in particular, the ability to induce oxidative stress and inflammation. There are presented results of studies on inhalation and oral toxicity in *in vivo*, data on carcinogenicity, immune cell response to NC and its ability to induce immunological tolerance. Based on the results

of a comparative analysis of the studies, various NC types were found to have little effect on cell viability and acute toxicity *in vivo*, however, the conflicting results of studies of the pro-inflammatory and immunological effects of different NCs indicate the need for further long-term studies to establish the maximum inactive doses of NC, primarily, with their inhalation and oral intake.

**Keywords:** nanocellulose; nanofibers; nanomaterials; *in vivo* toxicity; *in vitro* toxicity; immunotoxicity; carcinogenicity; ecotoxicity; dendritic cells; immunological tolerance; endotoxin; review

**For citation:** Gmshinski I.V., Shipelin V.A., Khotimchenko S.A. Nanocelluloses: hazard characteristics and possible risks (literature review). *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(2): 181–190. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-2-181-190> <https://elibrary.ru/kifnig> (In Russian)

**For correspondence:** Ivan V. Gmshinsky, MD, PhD, DSci., Leading Researcher at the Laboratory of Food Toxicology and Safety Assessment of Nanotechnology, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety. Department of food toxicology and nanotechnology safety evaluation, Moscow, 109240, Russian Federation. E-mail: gmosh@ion.ru

#### Information about the authors:

Gmshinsky I.V., <https://orcid.org/0000-0002-3671-6508> Shipelin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-0015-8735> Khotimchenko S.A., <https://orcid.org/0000-0002-5340-9649>

**Contribution.** All co-authors made an equal contribution to the research and preparation of the article for publication.

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

**Acknowledgments.** The search and analytical work were carried out using the funds of the state assignment grant as part of the Basic Research Program (subject of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 0410-2022-0003).

Received: August 5, 2022 / Accepted: December 8, 2022 / Published: March 25, 2023

## Введение

Спрос на материалы из наноцеллюлозы (НЦ) постоянно возрастает из-за их уникальных свойств, таких как высокая прочность на растяжение, низкая плотность и высокая термическая стабильность, биосовместимость и биоразлагаемость. В 2019 г. объём производства НЦ ведущими фирмами во всём мире составил не менее 11 000 тонн [1], а к 2025 г., согласно прогнозу, только в качестве упаковочных материалов ежегодно будет использоваться более 160 000 тонн НЦ [2]. Различные виды НЦ имеют широкие перспективы использования в электронике, в качестве композиционных материалов и покрытий, пищевых ингредиентов, носителей лекарственных препаратов, основы изделий медицинского назначения и др. [3, 4]. НЦ представлена продуктами переработки растительной целлюлозы, включающими нановолокнистую целлюлозу (НВЦ) с длиной волокон более 500 нм и толщиной 10–20 нм и нанокристаллическую целлюлозу (НКЦ) с длиной волокон от 100 до 500 нм и диаметром менее 100 нм [5], а также бактериальной наноцеллюлозой (БНЦ), получаемой путём микробного синтеза и состоящей из перепутанных клубков или пластов целлюлозных волокон толщиной менее 100 нм [6].

Увеличение экспозиции человека изделиями из НЦ ставит вопрос о возможных рисках, связанных с её воздействием на организм. Предполагается, что природа этих рисков может быть связана, во-первых, с особыми биологическими эффектами волокон целлюлозы в наноформе, отличающимися её от аналога, получаемого по традиционной технологии [7]. Во-вторых, на токсичность НЦ могут оказывать влияние остаточные количества химикатов, применяемых при её модификации, а также микотоксинов, тяжёлых металлов, пестицидов, диоксинов и др.), происходящих из её природных источников [8]. В-третьих, применение БНЦ и других видов НЦ, обработанных гидролазами микробного происхождения, ставит вопрос о безопасности соответствующих штаммов-продуцентов, особенно если они являются генетически модифицированными (ГММ) [9, 10]. Поскольку ранее на таможенной территории ЕАЭС в пищу человека продукция, содержащая НЦ, не использовалась, её следует рассматривать согласно ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» в качестве «пищевой продукции нового вида», подлежащей государственной регистрации. При этом необходима всесторонняя оценка безопасности такой продукции для здоровья человека [11].

Целью настоящей статьи является обзор литературных данных о потенциальных рисках токсического действия НЦ на организм при различных путях экспозиции, предусмотренных вероятностными сценариями контакта с данной продукцией. Для анализа были отобраны источники, содержащиеся в международных реферативных базах данных PubMed, WoS и Scopus и удовлетворяющие требованиям

научной достоверности и полноты. Поиск источников был проведён по сочетанию ключевых слов *nanocellulose AND (toxic OR toxicity)* преимущественно за период 2010–2021 гг.

## Результаты исследований *in vitro*

Токсикологические исследования *in vitro* с использованием культур клеток, соответствующих по своим цитологическим характеристикам основным группам клеток органов и тканей человека (клетки кишечного и бронхолегочного эпителия, печени, почек, костного мозга, соединительной ткани, иммунные клетки), занимают по числу публикаций ведущее место в современных нанотоксикологических исследованиях. С одной стороны, это обусловлено отсутствием ограничений этического характера, свойственных проведению исследований на лабораторных животных. С другой стороны, применение в качестве тест-объекта клеточных культур позволяет просто, однозначно и наглядно охарактеризовать влияние тестируемого наноматериала на функциональное состояние отдельных видов клеток и лежащие в основе этого молекулярно-биологические механизмы. Вместе с тем проведение тестов *in vitro* требует высокой культуры эксперимента, повышенного внимания к наличию необходимых контролей и учёта возможного содержания в исследуемых наноматериалах следов посторонних токсичных примесей. Значительный объём данных применительно к НЦ и различным её формам накоплен при оценке их влияния на жизнеспособность клеток (цитотоксичность) и предполагаемого прооксидантного, провоспалительного и иммунотоксического действия, не обязательно сопровождающегося гибелью изучаемого биологического объекта.

**Цитотоксичность.** Исследования цитотоксичности НЦ в культурах клеток животных и человека привели к частично противоречивым результатам.

С одной стороны, в ряде ранних исследований цитотоксичность не была выявлена либо выражалась незначительно [12, 13]. Авторы сообщали об отсутствующем или незначительном снижении жизнеспособности макрофагов мыши под влиянием НВЦ и НКЦ [14], эндотелиальных клеток капилляров головного мозга человека [12] и миелиоидных клеток [14]. В трёхклеточной модели, воспроизводящей барьер эпителиальной ткани человека (слой эпителиальных клеток, дополнительных макрофагами, происходящими из моноцитов крови человека, и дендритные клетки на апикальной и базолатеральной сторонах соответственно), не было выявлено значительной цитотоксичности у двух разных типов НВЦ, выделенных из хлопка (размером  $170 \pm 72$  мкм  $\times$   $19 \pm 7$  нм) и панцирей асцидий ( $2,3 \pm 1,4$  мкм  $\times$   $31 \pm 7$  нм), в сравнительно низкой концентрации от 0,14 до 1,57 мкг/см<sup>2</sup> [15, 16]. Скорость поглощения НКЦ макрофагами зависела от дозы и времени и была меньшей для продукта из асцидий по сравнению с НКЦ

растительного происхождения [17]. При действии БНЦ на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) [18] ни один из экспериментов с использованием реакции восстановления соли тетразолия (МТТ-тест), морфологии клеток, оценки апоптоза и некроза с помощью проточной цитометрии не показал значительных изменений через 24 или 48 ч при дозе БНЦ до 1 мг/мл. В этой же работе воздействие БНЦ в дозе 0,5–5 мг/мл *in vivo* при однократном внутривенном введении самцам мышей C57/Bl6 не показало вредных эффектов через 7 сут. Аналогичные результаты были получены при действии БНЦ (с размерами 50–1500 × 3–5 нм) на фибробласты мыши (3Т3) и клетки яичника китайского хомячка (СНО) [19].

НВЦ, модифицированная под действием 2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (ТЕМРО), обладала низким цитотоксическим эффектом *in vitro* (жизнеспособность клеток выше 70%) и не проявляла мутагенности [20]. При действии НКЦ на 9 клеточных линий (НВМЕС, bEnd.3, RAW 264.7, MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, KB, PC-3 и С6) показано с использованием теста лактатдегидрогеназы и МТТ практически полное отсутствие токсического эффекта в интервале доз, отвечающем реалистическому сценарию экспозиции макроорганизма (0–50 мкг/мл). С помощью флуоресцентного мечения установлено, что частицы НКЦ практически не захватывались этими клетками [21].

С другой стороны, имеются исследования, которые показали цитотоксические эффекты НЦ. Так, в работе [22], выполненной на эмбриональных клетках почек человека (НЕК 293) и клетках бабочек Sf9, отрицательно заряженные частицы НКЦ (дзета-потенциал –46,4 мВ, размер 130–200 × 10–20 нм) в дозе 0,1 мг/мл вызывали разрыв клеточных мембран в отличие от НКЦ с положительным зарядом.

Наблюдала также цитотоксическое воздействие НКЦ на клетки бронхиального эпителия (BEAS 2B) [23], клетки аденокарциномы и фибробласты человека [24], фибробласты млекопитающих [25]. Общими для этих исследований явились чрезвычайно высокие концентрации НЦ (0,25–5 мг/мл), которые вряд ли могли возникать *in vivo*. Например, при действии на фибробласты мыши линии L929 [26] длинных запутанных фибрилл НВЦ размером 33 мкм × 10 нм в концентрации (0,25–1 мг/мл) отмечали нарушения метаболической активности и снижение пролиферации клеток. При наибольшей из концентраций волокна почти полностью закрывали монослой клеток, что могло элементарным образом нарушить поступление к ним кислорода и питательных веществ.

**Индукция окислительного стресса.** Как известно, одним из главных механизмов цитотоксичности волокнистых материалов является развитие окислительного стресса. Оценка способности НЦ индуцировать эти процессы *in vitro* привела к неоднозначным результатам. При действии двух видов НКЦ (из хлопка и панцирей асцидий) с различными соотношениями сторон, дзета-потенциалом, жесткостью волокон в тестах на клетках карциномы лёгкого А549 признаки окислительного стресса отсутствовали [23, 27]. При действии на мышечные фибробласты НВЦ из древесины ели признаков окислительного стресса также не наблюдали в концентрации вплоть до 1 мг/мл [26]. Однако в другой работе, выполненной на клетках А549, несколько видов НКЦ и НВЦ с различными длиной, структурой, степенью полидисперсности вызывали развитие окислительного стресса через 72 ч, что выражалось в снижении уровня восстановленного глутатиона (GSH) [28].

**Моделирование воспалительной реакции *in vitro*.** В ряде исследований была предпринята попытка воспроизведения воспалительной реакции в клеточных культурах под действием НЦ. На трёхмерной многоклеточной модели эпителиального барьера дыхательных путей человека на границе раздела «воздух – жидкость» не наблюдали каких-либо признаков воспалительного ответа при воздействии двух видов НКЦ [17]. Аналогичный результат был получен для НКЦ из хлопка на макрофагах, происходящих из моноцитов че-

ловека [23]. С использованием альвеолярных макрофагов человека А549 не наблюдали воспалительной реакции при введении ТЕМРО-карбоксилированных НВЦ [29]. В исследовании, посвящённом безопасности фрикционного измельчения и распылительной сушки НЦ, не выявлено каких-либо воспалительных эффектов на мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) и мышечных макрофагах RAW 264.7 [30]. Однако в исследовании [28] НКЦ вызвала выраженный воспалительный ответ в клетках А549, который был значительно большим, нежели в случае двух видов НВЦ. При исследовании образцов НВЦ, предлагаемых для медицинского применения, на трёхмерной модели сокультивирования нескольких линий клеток лёгких человека наблюдалась дозозависимая индукция воспалительного ответа, хотя и более слабая, чем в случае использования многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) и асбестовых волокон [31].

Причины расхождений в оценке провоспалительного потенциала различных форм НЦ могут заключаться, во-первых, в различии их поверхностных свойств, особенно заряда, определяемого наличием химической модификации. Так, если при действии немодифицированной НВЦ на макрофаги человека наблюдали воспалительный ответ, то для карбоксиметилированной и обработанной хлоридом 2,3-эпоксипропилтриметиламмония форм этой же НВЦ он отсутствовал [32]. Аналогично на моноцитарных клетках человека ТНР-НВЦ без модификации демонстрировали больший воспалительный потенциал по сравнению с карбоксиметилированным и карбоксилированным производными [33]. Во-вторых, большую роль при интерпретации результатов тестов *in vitro* играет контроль в изучаемых образцах примесей бактериального эндотоксина (ЭТ), обладающего мощным провоспалительным действием и поэтому способного исказить или замаскировать искомые эффекты наноматериалов. В особенности это актуально для НЦ, выделяемой из потенциально контаминированных ЭТ природных биологических объектов. К сожалению, данный фактор учитывался не во всех проведённых исследованиях. Примерами работ, в которых отсутствие примесей ЭТ контролировали, могут служить исследование [33], а также тщательно выполненное исследование [34]. В последнем был проведён анализ продукции про- и противовоспалительных цитокинов моноцитарными клетками ТНР-1 под воздействием нескольких видов НЦ наряду с другими искусственными наноматериалами, включая наночастицы ZnO, Ag, SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>, BaSO<sub>4</sub>, одностенные и многостенные углеродные нанотрубки. В этих условиях НЦ не вызвала гибели клеток, хотя и демонстрировала усиление ответа провоспалительных цитокинов, активируемых по PPAR сигнальному пути.

**Генотоксичность.** При оценке неблагоприятного действия наноматериалов на организм большое значение имеет анализ генотоксичности, которая проявляется в разрыве цепей ДНК, образовании микроядер и повышении частоты соматических мутаций клеток. Генотоксическое влияние НЦ в настоящее время изучено недостаточно. Хотя типичные размеры частиц и волокон нанощеллюлозы делают маловероятной её ядерную транслокацию, полностью исключить её нельзя [7]. В исследовании на клетках BEAS 2B не наблюдалось никаких эффектов НЦ из хлопка с размером 135 × 7,3 нм в отношении образования микроядер в дозах 2,5–100 мкг/мл и времени наблюдения более 48 ч [23]. Сообщалось об отсутствии изменений в структуре ДНК в первичных гепатоцитах радужной форели после воздействия НКЦ (200 × 5–10 нм) из крафт-целлюлозы в дозах до 2 мг/мл [35]. Аналогичные результаты были получены при использовании НКЦ, выделенной из БНЦ (50–1500 × 3–5 нм), в комет-тесте и тесте Эймса на сальмонеллах в концентрации 0,1–1 мг/мл через 48 ч [19]. Пять видов НВЦ (нативная, карбоксиметилированная, фосфорилированная, сульфэтилированная и замещённая гидроксипропил-триметиламмонием) не вызывали генотоксических эффектов в тестах комет и микроядер с бло-

кировкой цитокинеза в клетках BEAS-2B [36]. При этом нативная и карбоксиметилированная НВЦ были способны увеличивать образование внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), но без повреждений ДНК или хромосом.

Вместе с тем в экспериментах на клетках лука (*Allium cepa*) четыре вида нановолокна целлюлозы из хлопка и один из курауа (южноамериканское растение) в концентрации 0,01–1% вызывали изменения в митотическом индексе и хромосомные aberrации. Волокна коричневого хлопка и курауа вызывали также разрывы цепей ДНК в животных клетках (лимфоциты человека, фибробласты мыши 3Т3) [37]. Для этих же волокон был выявлен генотоксический эффект в комет-тесте в клетках эпителия бронхов BEAS 2B NFC в дозе 0,95 мг/см<sup>2</sup> поверхности клеточного слоя [38].

Полученные противоречивые результаты тестов на генотоксичность трудно сравнивать ввиду значительных различий в условиях проведения эксперимента, гетерогенности применявшихся экспериментальных моделей и недостаточной охарактеризованности препаратов НЦ, в которых не проверяли наличие токсических примесей, в частности ЭТ.

**Роль волоконности в проявлении цитотоксичности нановолокна.** Из-за высокого соотношения «длина – диаметр» (аспектного соотношения) многих видов НЦ ведутся дискуссии о возможности использования при оценке их токсичности так называемой «парадигмы волокна» [7], согласно которой более длинные, жёсткие и устойчивые к биодеградации волокна при прочих равных условиях являются более патогенными. Считается, что фагоцитоз макрофагами и инкапсуляция в фаголизомы волокон невозможны, если они длиннее 10 мкм и обладают при этом относительно высокой жёсткостью, то есть не способны скручиваться в компактные клубки [39]. Способность НЦ к биоперсистенции всё ещё не выяснена в полном объёме, но вполне вероятно, что НЦ может длительно находиться в биологическом окружении [40]. По данным ряда исследований, волокна НЦ могут сохраняться в лёгких животных через несколько недель или даже месяцев после ротоглоточной аспирации и интратрахеальной инстиляции [33, 41, 42].

Подводя итоги представленным данным оценки токсичности НЦ *in vitro*, следует отметить, что противоречивые результаты о наличии или отсутствии цитотоксического действия часто были получены на одних и тех же клеточных моделях и сходных объектах исследования. Из числа имеющихся тенденций в определённой степени прослеживаемыми являются более высокая цитотоксичность у НКЦ в сравнении с НВЦ и особенно с БНЦ и то, что нативные (химически не модифицированные) кристаллы НКЦ, возможно, наиболее цитотоксичны.

Причиной расхождений в данных литературы может быть недостаточная охарактеризованность используемых в исследованиях препаратов НЦ. В большинстве работ применяли извлечённую из древесной массы или хлопка НЦ, в которой могут присутствовать остаточные количества использованных при варке целлюлозы химикатов, а также других токсичных примесей, включая ЭТ. Наличие эндотоксиновой контаминации является одной из фундаментальных трудностей при проведении нанотоксикологических исследований [43, 44], и содержание этого загрязнителя должно в обязательном порядке контролироваться с использованием стандартизованного метода (LAL-тест) при проведении всех испытаний наноматериалов в системах *in vitro*, а также в ряде случаев *in vivo*, например, при ингаляционном и парентеральном путях поступления. Такой контроль особенно важен применительно к наноматериалам, полученным из природных биологических объектов, в том числе для НЦ. Необходимость контроля эндотоксиновой контаминации признается на международном уровне [45] и закреплена для проводимых в России исследований действующим ГОСТ Р ИСО 29701–2015 Нанотехнологии. Наноматериалы для испытаний в тест-системах. Метод определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амёбоцитов (ЛАЛ-тест).

## Токсичность *in vivo*

**Ингаляционная токсичность.** В процессе производства и переработки НЦ в конечную потребительскую продукцию потенциальным источником рисков для работников предприятий и населения прилегающей территории может быть ингаляционное поступление взвешенных в воздухе целлюлозных волокон. Ввиду этого значительный интерес представляет изучение ингаляционной токсичности НЦ, которой можно ожидать по аналогии с другими природными и искусственными волокнистыми наноматериалами, включая хризотилловый асбест, МУНТ и другие углеродные нановолокна.

Как известно, ПДК пыли традиционной целлюлозы в воздухе рабочей зоны составляет 10 мг/м<sup>3</sup> (IV класс опасности)<sup>1</sup>, а ОБУВ<sup>2</sup> для целлюлозы в атмосферном воздухе городских и сельских поселений – 5 мг/м<sup>3</sup>. Близкий норматив был установлен US NIOSH в размере 5 мг/м<sup>3</sup> [5], однако неясно, в какой мере эти безопасные уровни могут быть распространены на НЦ [29, 38].

В настоящее время можно считать доказанным, что воздействие нановолокон асбеста связано с развитием эпидемических заболеваний лёгких, таких как фиброз, асбестоз, рак лёгких, мезотелиома и плевральные бляшки [46]. Эти волокна характеризуются большой длиной, высокой жёсткостью и значительной стойкостью к биодеградации. Поэтому гипотеза об ингаляционной токсичности НЦ, обладающей принципиально иным составом и физико-химическими свойствами, подлежит экспериментальной проверке [12].

У рабочих хлопковой промышленности, подвергающихся воздействию целлюлозной пыли, часто развивается биссиноз, называемый также коричневой болезнью лёгких, но вопрос, в какой степени дисперсность волокон влияет на риск формирования биссиноза, не исследован [12]. При микроскопии цитоплазмы многоядерных гигантских клеток, полученных от экспериментальных животных, которым вводили НЦ через дыхательные пути, наблюдали двулучепреломляющие фиброзные структуры, содержащие, по всей видимости, гранулы целлюлозы, что указывает на способность НЦ к биоперсистенции в ткани лёгких [12].

Ингаляционная токсичность НЦ в виде аэрозоля в настоящее время практически не изучена. В подавляющем большинстве исследований НЦ вводили животным методом интратрахеальной инстиляции (ИТ) или глоточной аспирации.

Сразу после ИТ немодифицированной и карбоксиметилированной НВЦ в дозе 6,4 мг/кг самкам мышей C57BL/6J у них наблюдали сильную одышку. При введении 0,3 или 0,9 мг/кг немедленно после ИТ дозозависимо повышалось количество лейкоцитов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и увеличивались уровни маркера острого воспаления (SAA3) в крови. Из двух видов НВЦ немодифицированная форма вызывала более сильный ответ. Через 28 дней после введения выявленные патологические изменения исчезали, и животные практически полностью выздоравливали [41].

В лёгких самок мышей C57BL/6J после глоточной аспирации ТЕМРО-окислённой НВЦ в дозе 4 мг/кг или выше увеличивалось количество интерлейкинов и экспрессия TNF-α. При этом некоторые результаты не были дозозависимыми, вероятно, из-за того, что образцы с высокой концентрацией НЦ агломерировали и быстро удалялись из дыхательных путей [47]. Глоточная аспирация НКЦ и НВЦ у мышей BALB/c в дозе 4 мг/кг привела к изменениям уровня экспрессии цитокинов в БАЛ через 14 дней. Наблюдались различия в экспрессии CD-антигенов лейкоцитов и интерлейкинов между группами животных, получавшими два вида НЦ [42].

<sup>1</sup> Санитарные правила и нормы СанПиН 1.2.3685–21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания», раздел II.

<sup>2</sup> Там же, раздел I.

Повышенная цитотоксичность *ex vivo* (в тесте активности лактатдегидрогеназы) после глоточной аспирации у мышей НКЦ, полученной из древесной пульпы, проявлялась в дозах 50; 100 и 200 мкг/мышь. Интенсивность этих реакций была сравнима с наблюдавшейся при аспирации асбеста в дозе 50 мкг/мышь [48]. Уровни цитокинов в БАЛ различались у мышей, получавших НКЦ в виде сухого порошка и гидратированного геля, причём соотношение различных показателей, характеризующих про- и противовоспалительную направленность ответа, не демонстрировало однозначной связи с длиной нановолокон.

В исследованиях А.А. Шведовой и соавт. было показано, что после воздействия НКЦ на лёгкие мышшей C57BL/6J в течение длительного периода самцы были более подвержены проявлениям токсичности по показателям реакции воспалительного и окислительного стресса, продукции цитокинов и транскриптомных изменений в клетках лёгочной ткани по сравнению с самками. Это сопровождалось эффектами генотоксичности, состоявшими в появлении гигантских многоядерных клеток [49]. В дальнейшем теми же авторами показано, что подобные генотоксические эффекты вредны для мужской репродуктивной системы [50]. Развитие повреждений генетического аппарата клеток исследователи объясняют эффектами окислительного стресса, вызванного активными формами кислорода, которые выделяются макрофагами в процессе фагоцитоза целлюлозных нановолокон.

Данное исследование было подвергнуто критике со стороны J.A. Shatkin и G. Oberdorster [51], которые отметили применение в нём чрезмерно высоких доз и неравномерность их поступления (что определяется как «эффекты бөллуса»). Кроме того, животным обоего пола вводили одинаковое количество НКЦ, хотя у мышей данной линии масса тела самцов в возрасте 8–11 нед по сравнению с самками больше примерно на 20%, что может привести к различиям в фактически полученных дозах в расчёте на массу тела.

Влияние химической модификации НВЦ и НКЦ на её токсичность при глоточной аспирации у самок мышшей C57BL/6J проявилось в том, что более короткие и немодифицированные волокна обладали большей способностью к индукции воспалительного ответа, включая экспрессию генов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , привлечение нейтрофилов и эозинофилов в очаг воспаления, образование гигантских многоядерных клеток, по сравнению с более длинными и карбоксилированными (отрицательно заряженными). Это качественно совпадает с результатами исследований *in vitro*, рассмотренными выше [33]. В работе было отмечено, что по величине ингаляционной токсичности *in vivo* отдельные виды НКЦ сопоставимы с МУНТ. Вместе с тем, по другим данным [52], минимальная действующая доза НКЦ при ИТ-введении составляет не менее 2–4 мг/кг, тогда как для МУНТ – приблизительно 0,5–1 мг/кг. При введении животным асбеста или МУНТ в дозах, сопоставимых с НКЦ, ни один из числа изученных маркёров патологического процесса не проявлял более сильного ответа на НКЦ, чем на асбест или МУНТ [34, 43].

Сравнительно немногочисленны работы, в которых использовали подострое (многочисленное) введение НКЦ в дыхательные пути. В исследовании [53] БНЦ и карбоксилированная БНЦ при ИТ-введении самкам мышшей C57BL/6J в дозе 4 мг/кг один раз в неделю в течение 4 нед вызывали незначительную диффузную дегенерацию терминальных бронхиол и инфильтрацию воспалительных клеток. Реакция в группе модифицированной БНЦ была несколько сильнее по сравнению с нативной. Оценка окислительного стресса и клеточного профиля БАЛ через 3 мес после последнего введения показала отсутствие значительных изменений маркёров по сравнению с контрольной группой животных. Причиной различий в увеличении количества В- и Т-клеток в БАЛ между группами карбоксилированной и нативной БНЦ авторы объясняли различиями в форме частиц тестируемых веществ, однако тестирование на остаточные количества реактивов, применявшихся при модификации, не были проведены.

Многочисленные исследования ингаляционной токсичности НКЦ, обобщённые в метаанализе (52 источника), показывают, что её однократное введение в дыхательные пути действительно приводит к транзиторному воспалению, которое сходно с наблюдаемым при поступлении других малорастворимых малотоксичных видов пыли, включая обычную целлюлозу, но заметно отличается от действия нановолокон с известной токсичностью, таких как определённые типы МУНТ или асбест, отсутствием долговременных последствий. Однако для оценки сценариев длительного воздействия пыли НКЦ на рабочем месте необходимы более продолжительные исследования, число которых в настоящее время недостаточно [54].

Анализируя имеющиеся данные о действии на организм НКЦ при поступлении в дыхательные пути, можно сформулировать три проблемы, не получившие должного изучения [55]:

1. Многие исследования проводились с использованием только одной дозы, и зависимость от дозы, необходимая для характеристики опасности, не была установлена.
2. Период наблюдения был коротким, оценивалась только острая реакция.
3. Токсикологическое значение наблюдаемых изменений не было в достаточной мере подтверждено, поскольку в большинстве работ проводились в основном исследования крови и экспрессии генов без оценки клинических признаков и гистопатологической картины органов-мишеней (в первую очередь лёгких).

**Пероральная токсичность.** НКЦ может экспонировать человека через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) в результате потребления пищевой продукции, где этот наноматериал используется в роли пищевой добавки или функционального ингредиента. Нельзя исключить также попадания НКЦ в пищевую продукцию из упаковочных материалов вследствие их механической деструкции. Наконец, ингалируемые длинные волокна НКЦ могут быть нереспираторными. В этом случае они не проникают в нижние дыхательные пути, а выделяются из носоглотки, гортани и трахеи со слюной, которая может заглатываться.

Эффекты влияния НКЦ на органы ЖКТ сравнительно мало изучены. В качестве модельной системы были использованы монослой энтероцитов линии Caco-2 и культуры репрезентативных бактерий микробиоты. Результаты показали отсутствие токсичности для клеток макроорганизма после воздействия немодифицированной НВЦ и поверхности функционализированной НВЦ. Наблюдалось бактериостатическое действие различных НКЦ на *E. coli*, но не на *L. reuteri* [56].

Переваривание НВЦ и НКЦ в концентрации 0,75 и 1,5% по массе изучали *in vitro* с помощью симулятора ЖКТ, имитирующего ферментный и электролитный состав слюны, желудочного сока и кишечного содержимого, в условиях, воспроизводящих состояние голода (фосфатный буфер), или в присутствии модельной пищевой смеси, соответствующей типичному американскому рациону питания и состоящей из казеината, крахмала, сахара, жира и NaCl [57]. После такой обработки изучаемые образцы добавляли к тройной культуральной модели эпителия тонкой кишки на клетках Caco-2, HT-29MTX и Raji и изучали целостность клеточного слоя, цитотоксичность и уровень окислительного стресса. За исключением увеличения на 10% по сравнению с контролем продукции АФК с 1,5%-й НКЦ при этом не наблюдалось никаких значительных изменений в состоянии клеточного монослоя. В этой же работе токсичность НВЦ *in vivo* оценивали на крысах, которым вводили её через желудочный зонд дважды в неделю в течение пяти недель в виде 1%-й суспензии в воде или сливках. При исследовании крови, сыворотки, лёгких, печени, почек и тонкой кишки этих животных значительные различия в гематологии, маркёрах сыворотки или гистологии между контрольной группой и крысами, получавшими НВЦ, отсутствовали [57]. Вместе с тем авторы работы подчёркивают необходимость

хронических исследований для оценки долгосрочных эффектов и потенциального вредного действия НЦ на микробиом кишечника и всасывание микроэлементов.

В работе [58] не выявлено острой и многократной пероральной токсичности НКЦ, а также сенсибилизации ею кожи у мышей. Оценённая величина максимальной недействующей дозы (NOAEL) составила более 2000 мг/кг массы тела/сут для многократного перорального введения дозы, а в остром эксперименте LD<sub>50</sub> также была заведомо выше 2000 мг/кг массы тела. Аналогично после острого воздействия НКЦ и НВЦ с лигниновым покрытием острая пероральная токсичность для крыс не наблюдалась, отсутствовало кожно-слизистое и глазное раздражающее действия, тестируемые в соответствии со стандартизованными *in vitro* моделями OECD 437 и OECD 439 [59].

Представляет интерес изучение влияния химической модификации НЦ на её пероральную токсичность. Так, при введении в ЖКТ крысам Wistar в течение 14 дней сульфированной НЦ в дозе 0; 50; 75 и 100 мг/кг наблюдалась генерализованная гипернатриемия, указывающая на возможное нарушение фильтрующей функции почек. В низких дозах НЦ повышала в почках активность оксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, содержание глутатиона и иммуногистохимическую экспрессию iNOS и COX-2, а в высоких, напротив, вызывала истощение запасов глутатиона [60].

При пероральном введении на протяжении семи дней химически модифицированной (сшитой) хлорангидом щавелевой кислоты НЦ крысам в дозе 100 мг/кг массы тела отмечали повышение активности аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и миелопероксидазы, а также усиление экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота и Vcl-2-ассоциированного X-белка в печени. Гистологические наблюдения показали некроз и тяжёлую клеточную инфильтрацию при введении высоких доз НЦ [61].

Суммируя имеющиеся данные о пероральной токсичности различных форм НЦ, можно заключить, что при их однократном введении в ЖКТ в остром опыте, а также при кратковременном контакте с кишечным эпителием в системе *in vitro* токсичность незначительна. Однако при подостром введении сроком не более одного месяца (сведения о более длительных экспериментах в литературе не обнаружены) полученные результаты были неоднозначными. Часть предполагаемых эффектов НЦ в ЖКТ животных может быть связана не с влиянием её на слизистую оболочку кишки и с крайне маловероятной системной транслокацией, а с воздействием на видовой состав и активность представителей кишечного микробиоценоза и влиянием на абсорбцию нутриентов. Кроме того, при длительной экспозиции нельзя исключить влияния НЦ на функцию иммунных клеток ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани (GALT). Некоторые данные в пользу этого предположения будут обсуждены ниже.

**Канцерогенность.** В исследовании *in vivo* не было получено данных о том, что вдыхаемая НЦ вызывает опухоли [47] в отличие от волокнистых наноматериалов, таких как МУНТ и асбест, которые вызывают повреждение мезотелия и онкогенез [62]. Однако данных для того, чтобы оценить индукцию опухоли при различных путях воздействия НЦ, пока недостаточно [55].

Гипотезы о возможной канцерогенности НЦ базируются почти исключительно на данных о её генотоксическом и мутагенном потенциале *in vitro*, в частности полученных в тесте Эймса на сальмонеллах. При этом есть мнение о неприменимости теста Эймса к волокнистым наноматериалам [63]. Поэтому более надёжными следует считать результаты исследований генотоксичности по количеству комет-положительных клеток и микроядер клеток млекопитающих [29, 47]. Существует предположение, что ввиду способности НЦ вызывать окислительный стресс в клетках нельзя исключать появления под её влиянием хромосомных аномалий, вызванных аддуктами ДНК [55].

Сведений о способности НЦ вызывать опухоли при длительном (на протяжении всей жизни животного) воздействии на организм в литературе в настоящее время не имеется. Следовательно, вопрос о канцерогенности НЦ и различных её производных остаётся открытым.

## Взаимодействие наноцеллюлозы с клетками иммунной системы

Выяснение способности волокон НЦ проявлять иммуноотоксическое, провоспалительное действие либо подавлять воспаление и индуцировать состояние иммунологической толерантности представляет большой интерес с позиций использования изделий из НЦ в качестве имплантов, материалов для реконструктивной хирургии, способных обладать функцией каркасов для регенерирующих клеток, при этом постепенно подвергаясь биодеградации и замещаясь собственными тканями организма.

Имуноотоксичность НЦ была изучена в экспериментах по её влиянию на различные клетки иммунной системы, включая макрофаги, лимфоциты и дендритные клетки [64].

Сведения о взаимодействии НЦ с макрофагами противоречивы. Имеются данные о том, что НВЦ ведёт себя как инертный материал при контакте с макрофагами [30, 65]. Вместе с тем в исследовании [47] отмечена инфильтрация воспалительных клеток в лёгких мышей в ответ на введение НВЦ с дозозависимым увеличением экспрессии мРНК для TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и CCL5 (RANTES). С использованием макрофагальных клеток человека линии THP-1 показано, что НВЦ в форме геля запускает продукцию цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  [32]. Аналогичные результаты были получены при культивировании клеток THP-1 на плёнках нативной НВЦ [66].

Модификация поверхности НЦ существенна для модуляции провоспалительного ответа макрофагов. Например, на анионных плёнках НВЦ макрофаги активировались в направлении провоспалительного фенотипа, о чём можно судить по повышенной экспрессии TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , тогда как в присутствии модифицирующих катионных групп на НВЦ этого не наблюдалось [66]. Однако в исследовании [32], выполненном на клетках THP-1, НВЦ, модифицированные как анионами, так и катионами, подавляли провоспалительный ответ. Карбоксилирование НВЦ подавляло *in vivo* инфильтрацию нейтрофилов и системный ответ острой фазы по снижению уровней SAA3 в плазме [41]. Пористый карбоксилированный аэрогель НВЦ, предназначенный для использования в качестве перевязочного материала, активировал экспрессию CD11b на лейкоцитах, увеличивал продукцию хемоаттрактантного белка моноцитов-1 (MCP-1/CCL2), снижал хемотаксические маркеры эозинофилов (eotaxin/CCL11) и тромбоцитарный фактор роста ВВ (PDGF-BB), тогда как экспрессия 24 других изученных цитокинов и хемокинов существенно не изменялась [67].

У двух пористых каркасов НВЦ, полученных путём ТЕМПО-окисления и карбоксиметилирования, показаны противовоспалительные свойства *in vivo* после подкожной имплантации крысам. В пределах каркаса НВЦ наблюдали значительно более высокую экспрессию противовоспалительного гена *IL1Ra* по сравнению с желатиновым каркасом, тогда как продукция IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , CXCL-1 и M-CSF была снижена. Через 30 дней каркас НВЦ стимулировал выработку противовоспалительного IL-10. Однако эти данные не были подтверждены *in vitro* с использованием линии макрофагальных клеток U937 [68].

Биоразлагаемые высокосульфированные гидрогели НВЦ усиливали инфильтрацию клеток и васкуляризацию при имплантации крысам с последующей поляризацией макрофагов в направлении фенотипа M2, что рассматривается как полезный эффект при ремоделировании тканей [69]. НКЦ проявляет, по-видимому, более сильное провоспалительное действие *in vitro* и *in vivo* по сравнению с НВЦ. Так, однократное альвеолярное введение мышам C57/BL-6 двух



различных форм НКЦ (гелевая суспензия и порошок) вызывало воспалительную реакцию в лёгких, судя по повышенной инфильтрации фагоцитарных клеток, преимущественно нейтрофилов и макрофагов. Этот ответ стимулировался высвобождением медиаторов воспаления и хемокинов, включая TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  и RANTES в БАЛ [48]. Кристаллы НКЦ большой длины (200–300 нм) вызывали лизосомные повреждения, активацию воспаления NLRP3 и продукцию IL-1 $\beta$  сильнее, чем НВЦ. При этом провоспалительные эффекты НКЦ коррелировали с их более высоким индексом кристалличности, более высокой поверхностной плотностью гидроксила и способностью индуцировать генерацию ROS [70].

Если НКЦ действовала на макрофаги вместе с цитокинами, индуцирующими их поляризацию (IFN- $\gamma$  или IL-4/IL-13), то дифференцировка в направлении фенотипа M1 и провоспалительного ответа значительно усиливалась, судя по секреции IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , CSF-3 и CXCL1 в этой системе, в то время как маркеры клеток M2 фенотипа снижались. Катионно-модифицированная НКЦ индуцировала NLRP3-зависимую от инфламмосомы секрецию IL-1 $\beta$  клеточной линией макрофагов мыши J774A.1 и клетками PBMNC человека. Этот эффект опосредовался увеличением продукции АФК и высвобождением АТФ в этих клетках [71]. Когда клетки J774A.1 обрабатывали катионной НКЦ одновременно с куркумином, секреция IL-1 $\beta$  снижалась. Этот эффект зависел от S-глутатионилирования инфламмосомы NLRP3 [72].

БНЦ является, по-видимому, наиболее биосовместимой среди всех видов НЦ [64]. По данным [73], трёхмерный гель БНЦ, используемый в качестве имплантата мягких тканей, вызывает лёгкую острую воспалительную реакцию, однако хронической воспалительной реакции обнаружено не было. Гидрогели БНЦ, применяемые в повязках на раны, улучшали адгезию дермальных фибробластов человека, сохраняли их жизнеспособность и морфологию и ограничивали миграцию клеток [74]. БНЦ не оказывала значительного влияния на клетки HUVEC в отношении продукции IL-4 и IFN- $\gamma$  [75]. Только высокие дозы БНЦ, имплантированные мышам, показали стимулирующее действие на продукцию этих двух цитокинов, но их эффекты были значительно ниже по сравнению с эффектами липополисахарида.

В иммунной реакции организма на внедрённые материалы из НЦ большую роль играют антигенпрезентирующие дендритные клетки (ДК). Получены данные о том, что НВЦ способствует миграции и дифференцировке ДК, обладающих фенотипом CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>, в лёгких мышей [42]. На модели ДК человека, генерируемых *in vitro* путём обработки системой цитокинов GM-CSF+IL-4, показано, что НВЦ и НКЦ модулируют дифференцировку моноцитов в незрелые ДК (нДК), но эффекты зависят от размера, кристалличности и поверхностных групп образцов [76, 77]. Поглощение обломков волокон НКЦ и НВЦ дендритными клетками опосредуется гетеродимером толл-подобного рецептора TLR2 и хитин-связывающего белка (СВР) [78]. Этот процесс запускает в клетке каскад реакций, опосредуемых NOD-подобными рецепторами (NLR), геном *RIG-I*, индуцируемым ретиноевой кислотой, и AIM2-подобными рецепторами (ALR). Молекула CD209 (DC-SIGN), распознающая разветвлённые гликаны [79], накапливается в местах контакта ДК с клубками НВЦ [78, 79]. Рецептор CR3 на ДК при взаимодействии с БНЦ вызывает накопление агентов альтернативного пути комплемента C3b и C5b-9 при использовании материалов из такой целлюлозы в качестве основы сосудистых трансплантатов в модельной системе *in vitro* [80].

Таким образом, имеются данные о способности различных НЦ активировать ДК и накапливаться в них. Последнее делает НКЦ привлекательным объектом для разработки систем доставки лекарств в ДК при различных видах иммунотерапии.

## Индукция иммунологической толерантности

При использовании НЦ в медицине большой интерес представляет выявленная у некоторых её видов способность индуцировать иммунологическую толерантность путём взаимодействия с ДК. Устойчивость нДК, обработанных НВЦ, к созреванию после стимуляции и их выраженная способность продуцировать вызывающие иммуносупрессию цитокины, такие как IL-10, являются отличительными признаками толерогенного действия [64]. ДК, обработанные различными видами НВЦ – нативной, ТЕМРО-окисленной и модифицированной 3-аминопропилфосфатом (АРАС), – продуцировали повышенные уровни регуляторных цитокинов (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-27) и сниженные – Th1-поляризирующего IL-12 и Th17-поляризирующего IL-23. Одновременно НВЦ индуцировали экспрессию различных толерогенных маркеров на нДК, включая HLA-G, лиганды запрограммированной смерти PD-L1 и PD-L2, индоламиндиоксигеназу (IDO-1), иммуноглобулин-подобные транскрипты (ILT-3 и ILT-4), что сопровождалось усилением активности толерогенных Treg-лимфоцитов. В определённой степени эти эффекты зависели от модификации поверхности НВЦ, а именно АРАС-НВЦ обладала наибольшей способностью к подавлению созревания ДК, что приводило к супрессии иммунного ответа по Th1- и Th17-типам по сравнению с ТЕМРО-окисленной и особенно нативной НВЦ [77].

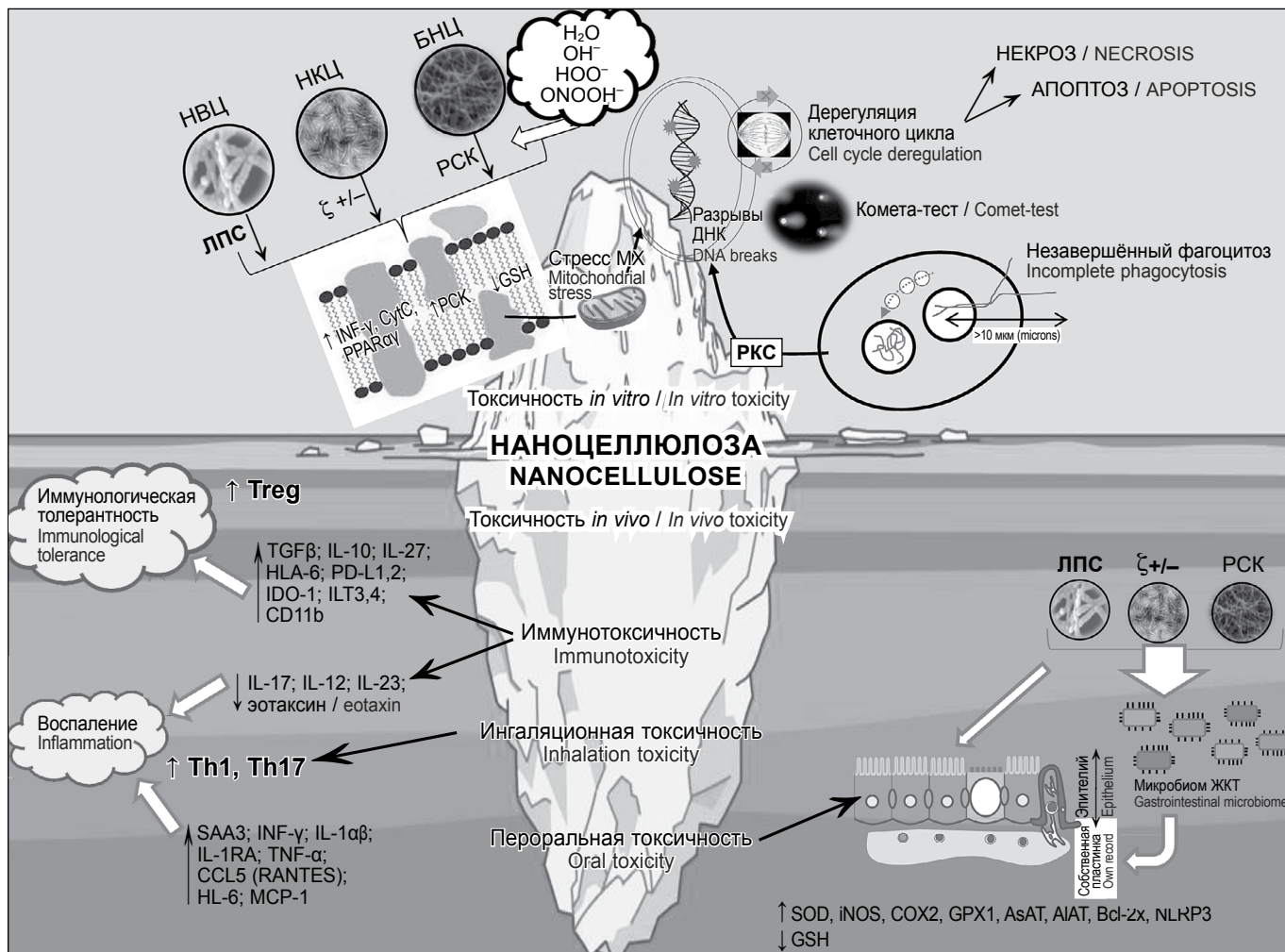
Наличие вышеперечисленных иммуномодулирующих свойств модифицированной НВЦ указывает на её иммунотерпевтический потенциал не только в качестве биосовместимых и биодеградируемых каркасов в тканевой инженерии, но и в разработке систем для ДК-опосредованной индукции иммунологической толерантности при трансплантации органов и аутоиммунных заболеваниях.

## Заключение

Литературные данные свидетельствуют о том, что эксперименты по выявлению характеристик НЦ как источника опасности при воздействии на организм дали частично противоречивые результаты. В системах *in vitro* с использованием ряда клеточных линий установлено, что НЦ в «реалистических» дозах, соответствующих действию *in vivo*, не приводят к гибели клеток и существенно не влияют на их жизнеспособность. При более высоких концентрациях НЦ в культуре порядка 1 мг/мл и выше возможно отложение на поверхности клеток плёнок НЦ, неспецифически блокирующих их дыхание и питание.

Вместе с тем при контакте НВЦ и, в большей степени, НКЦ с эпителиальными клетками, макрофагами, фибробластами, дендритными клетками и клетками других типов наблюдаются изменения в продукции большого числа цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, в метаболизме и транскриптоме клеток, что в ряде случаев может быть интерпретировано как проявление НЦ провоспалительного или иммунотоксического действия. При этом не прослеживается однозначной зависимости провоспалительного действия от состава наноматериала, за исключением, возможно, более выраженного ответа на нативные НЦ в сравнении с химически модифицированными (кроме сульфированной НЦ). Одна из причин расхождений в данных экспериментов *in vitro* может состоять в не учитываемой большинством исследователей возможности контаминации НЦ бактериальным эндотоксином (липпополисахаридом), обладающим мощным провоспалительным действием. С другой стороны, характер воздействия ряда химически модифицированных форм НЦ с макрофагами и дендритными клетками указывает на способность этих наноматериалов в определённых условиях индуцировать состояние иммунологической толерантности, что может найти полезное применение в ряде разделов реконструктивной хирургии, иммунотерапии и трансплантологии.

Оценка токсичности НЦ в системах *in vivo* показала, что при введении в дыхательные пути путём интратрахеальной



НВЦ – нановолокнистая целлюлоза / nanofiber cellulose  
 НКЦ – нанокристаллическая целлюлоза / nanocrystalline cellulose  
 БНЦ – бактериальная наноцеллюлоза / bacterial nanocellulose  
 ЛПС – липополисахарид (эндотоксин) / lipopolysaccharide (endotoxin)  
 РКС – реакционноспособные формы кислорода / reactive oxygen species  
 АИАТ – аланинаминотрансфераза / alanine aminotransferase  
 АсАТ – аспаратаминотрансфераза / aspartate aminotransferase  
 Bcl-2 – регулятор апоптоза 2-го типа / regulator of type 2 apoptosis  
 CCL5 (RANTES) – хемокиновый лиганд 5-го типа / type 5 chemokine ligand  
 COX2 – циклооксигеназа-2 / cyclooxygenase-2  
 CytC – цитохром C / cytochrome C;  
 GPX1 – глутатионпероксидаза-1 (селензависимая) / glutathione peroxidase-1 (selenium-dependent)  
 GSH – восстановленный глутатион / reduced glutathione

IL – интерлейкины / interleukins  
 INF – интерфероны / interferons  
 iNOS – индуцируемая синтаза NO / inducible NO synthase  
 MCP-1 – фактор хемотаксиса моноцитов 1-го типа / type 1 monocyte chemotaxis factor  
 NLRP3 – компонент инфламмосомы 3-го типа / type 3 inflammasome component  
 PPARαβ – рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором / peroxisome proliferator-activated receptors  
 SAA3 – сывороточный амилоид 3-го типа / serum amyloid type 3  
 SOD – супероксиддисмутаза / superoxide dismutase  
 Th – Т-лимфоциты-хелперы / T-lymphocytes helpers  
 Treg – регуляторные Т-лимфоциты / regulatory T-lymphocytes  
 ζ – дзета-потенциал, величина поверхностного заряда (+/-) / zeta potential – surface charge value (+/-).

Явные (*in vitro*) и потенциально скрытые (*in vivo*) биологические эффекты НЦ и участвующие в них патохимические механизмы и эндогенные регуляторные молекулы.

Explicit (*in vitro*) and potentially hidden (*in vivo*) biological effects of NC, the pathochemical mechanisms and endogenous regulatory molecules involved in them.

инстиляции или глоточной аспирации НКЦ и, в меньшей степени, НВЦ и БНЦ вызывают развитие воспаления, мониторируемого по уровням провоспалительных молекул, иммунных клеток и белка в БАЛ. В основном изучалось однократное (острое) введение НЦ, а многократное (повторное) исследовано недостаточно. Воспалительная реакция описана в большом количестве работ как транзиторная, то есть в течение 1–3 мес после введения наноматериала наблюдалось спонтанное выздоровление животных. Характер воспалительной реакции указывал на участие окислительного стресса в её развитии. Воспалительный ответ на НЦ мог несколько по-разному развиваться у самок и самцов животных. Общая закономерность, относящаяся к ингаляционной токсичности, состоит в том, что воздействие НЦ оказывает-

ся гораздо более слабым, чем у хорошо охарактеризованных по этим показателям волокнистых наноматериалов, таких как МУНТ и волокна асбеста. Для НЦ на данный момент не получено убедительных доказательств её мутагенного и канцерогенного действия *in vivo*.

В подавляющем большинстве исследований было показано практически полное отсутствие у НЦ острой пероральной токсичности и очень слабое воздействие на клетки кишечного эпителия при экспозиции *in vitro*. Вместе с тем до настоящего времени практически не было работ, в которых пероральная токсичность НЦ характеризовалась бы в достаточно длительных подострых (продолжительностью 3–6 мес) и хронических экспериментах. Проведение таких исследований представляется особенно важным, поскольку



они в наибольшей степени отражают сценарий реального воздействия на человека НЦ, используемой в составе пищевых добавок и ингредиентов, а также при профессиональной экспозиции. Отсутствуют работы, в которых было бы изучено *in vivo* влияние НЦ на кишечный микробиом и биодоступность микронутриентов.

В заключение необходимо отметить, что детальные характеристики потенциальной опасности НЦ, необходимые при оценке рисков для здоровья человека, в современной литературе представлены недостаточно. Имеется определённое несоответствие между явными (преимущественно в системах *in vitro*) и потенциально скрытыми (в организме *in vivo*) биологически значимыми воздействиями НЦ и участвующими в них эффекторными молекулами, что схематически представлено на рисунке.

Особенно это относится к исследованиям *in vivo* подострой и хронической токсичности, обусловленной длительным поступлением НЦ в организм. Представляется целесообразным широкое изучение таких свойств НЦ, как способность влиять на кишечную микробиоту, усвояемость

макро- и микроэлементов, витаминов и других пищевых веществ. Это актуально с учётом планируемого применения НВЦ и БНЦ в качестве пищевых ингредиентов и добавок, компонентов специализированных и функциональных пищевых продуктов. Открытым остаётся и вопрос о биологических последствиях взаимодействия НЦ *in vivo* с иммунными клетками лимфоидной ткани ЖКТ. Значительный интерес представляет дальнейшее изучение оптимальных методов технологической обработки НЦ, включая её химическую модификацию, с целью производства эффективных биосовместимых материалов медицинского назначения. Детальное исследование заслуживает безопасность НВЦ, получаемой с использованием ферментных препаратов из генетически модифицированных источников, и БНЦ, синтезируемой мутантными или генетически модифицированными штаммами микроорганизмов. Исследования биологических эффектов НЦ должны быть продолжены с использованием современных стандартизованных, надёжно охарактеризованных систем *in vitro* и *in vivo* и с привлечением высокоинформативных методов постгеномного анализа.

## Литература

(п.п. 1–10, 12–80 см. References)

11. Гмошинский И.В., Шипелин В.А., Хотимченко С.А. Наноматериалы в пищевой продукции и ее упаковке: сравнительный анализ

рисков и преимуществ. *Анализ риска здоровью*. 2018; (4): 134–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2018.4.16>

## References

- Dhali K., Ghasemlou M., Daver F., Cass P., Adhikari B. A review of nanocellulose as a new material towards environmental sustainability. *Sci. Total Environ.* 2021; 775: 145871. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145871>
- Fastmarkets. Nanocellulose: Packaging Applications and Markets. Available at: [https://www.fastmarkets.com/forest-products/special-studies/nanocellulose?utm\\_ss=nanocellulose+applications+and+markets](https://www.fastmarkets.com/forest-products/special-studies/nanocellulose?utm_ss=nanocellulose+applications+and+markets)
- Sharma A., Thakur M., Bhattacharya M., Mandal T., Goswami S. Commercial application of cellulose nano-composites – a review. *Biotechnol. Rep. (Amst.)*. 2019; 21: e00316. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>
- De Amorim J.D.P., de Souza K.C., Duarte C.R., da Silva Duarte I., de Assis Sales F.R., Silva G.S., et al. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. *Environ. Chem. Lett.* 2020; 18(3): 851–69. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00989-9>
- Thomas P., Duolikun T., Rumjit N.P., Moosavi S., Lai C.W., Bin Johan M.R., et al. Comprehensive review on nanocellulose: Recent developments, challenges and future prospects. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020; 110: 103884. <https://doi.org/10.1016/j.jmbm.2020.103884>
- Vasconcelos V.M., Farinas C.S., Ximenes E., Slininger P., Ladisch M. Adaptive laboratory evolution of nanocellulose-producing bacterium. *Biotechnol. Bioeng.* 2019; 116(8): 1923–33. <https://doi.org/10.1002/bit.26997>
- Stoudmann N., Schmutz M., Hirsch C., Nowack B., Som C. Human hazard potential of nanocellulose: quantitative insights from the literature. *Nanotoxicology*. 2020; 14(9): 1241–57. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1814440>
- Bonwick G., Bradley E., Lock I., Romero R. Bio-based materials for use in food contact applications. In: *Report to the Food Standards Agency*. York, UK: Fera Science Ltd.; 2019.
- Michelin M., Gomes D.G., Romani A., Polizeli M.L.T.M., Teixeira J.A. Nanocellulose production: exploring the enzymatic route and residues of pulp and paper industry. *Molecules*. 2020; 25(15): 3411. <https://doi.org/10.3390/molecules25153411>
- Karim Z., Afrin S., Husain Q., Danish R. Necessity of enzymatic hydrolysis for production and functionalization of nanocelluloses. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017; 37(3): 355–70. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1163322>
- Gmshinskiy I.V., Shipelin V.A., Khotimchenko S.A. Nanomaterials in food products and their package: Comparative analysis of risks and advantages. *Анализ риска здоровью*. 2018; (4): 133–41. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2018.4.16.eng>
- Endes C., Camarero-Espinosa S., Mueller S., Foster E.J., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B., et al. A critical review of the current knowledge regarding the biological impact of nanocellulose. *J. Nanobiotechnology*. 2016; 14(1): 78. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0230-9>
- Male K.B., Leung A.C.W., Montes J., Kamen A., Luong J.H.T. Probing inhibitory effects of nanocrystalline cellulose: inhibition versus surface charge. *Nanoscale*. 2012; 4(4): 1373–9. <https://doi.org/10.1039/c2nr11886f>
- Sunasee R., Carson M., Despres H.W., Pacherille A., Nunez K.D., Ckless K. Analysis of the immune and antioxidant response of cellulose nanocrystals grafted with  $\beta$ -cyclodextrin in myeloid cell lines. *J. Nanomater.* 2019; 2019: 4751827. <https://doi.org/10.1155/2019/4751827>
- Sultan S., Mathew A.P. 3D printed scaffolds with gradient porosity based on a cellulose nanocrystal hydrogel. *Nanoscale*. 2018; 10(9): 4421–31. <https://doi.org/10.1039/c7nr08966j>
- Leppiniemi J.P., Lahtinen A., Paajanen R., Mahlberg S., Metsa-Kortelainen T., Pinomaa H., et al. 3D-printable bioactivated nanocellulosealginate hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017; 9(26): 21959–70. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02756>
- Endes C., Mueller S., Kinnear C., Vanhecke D., Foster E.J., Petri-Fink A., et al. Fate of cellulose nanocrystal aerosols deposited on the lung cell surface *in vitro*. *Biomacromolecules*. 2015; 16(4): 1267–75. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00055>
- Jeong S.I., Lee S.E., Yang H., Jin Y.H., Park C.S., Park Y.S. Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. *Mol. Cell Oxidol.* 2010; 6(4): 373–80. <https://doi.org/10.1007/s13273-010-0049-7>
- Moreira S., Silva N.B., Almeida-Lima J., Rocha H.A., Medeiros S.R., Alves C. Jr., et al. BC nanofibres: *in vitro* study of genotoxicity and cell proliferation. *Toxicol. Lett.* 2009; 189(3): 235–41. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.849>
- De Lima A., Cândido P., Fregonezi N.F., José A., Carvalho F., Trovati E. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers *in vitro* cyto-genotoxicity studies. *BioNanoScience*. 2020; 10: 766–72. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00763-9>
- Dong S., Hirani A.A., Colacino K.R., Lee Y.W., Roman M. Cytotoxicity and cellular uptake of cellulose nanocrystals. *Nano LIFE*. 2012; 02(03): 1241006. <https://doi.org/10.1142/S1793984412410061>
- Mahmoud K.A., Mena J.A., Male K.B., Hrapovic S., Kamen A., Luong J.H.T. Effect of surface charge on the cellular uptake and cytotoxicity of fluorescent labeled cellulose nanocrystals. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2010; 2(10): 2924–32. <https://doi.org/10.1021/am1006222>
- Catalan J., Ilves M., Jarventausta H., Hannukainen K.S., Kontturi E., Vanhala E., et al. Genotoxic and immunotoxic effects of cellulose nanocrystals *in vitro*. *Environ. Mol. Mutagen.* 2015; 56(2): 171–82. <https://doi.org/10.1002/em.21913>
- Hanif Z., Ahmed F.R., Shin S.W., Kim Y.K., Um S.H. Size- and dose-dependent toxicity of cellulose nanocrystals (CNC) on human fibroblasts and colon adenocarcinoma. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2014; 119: 162–5. <https://doi.org/10.1016/j.colsurf.2014.04.018>
- Pereira M.M., Raposo N.R.B., Brayner R., Teixeira E.M., Oliveira V., Quintao C.C.R., et al. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*. 2013; 24(7): 075103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>
- Čolić M., Mihajlović D., Mathew A., Naseri N., Kokol V. Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose*. 2015; 22(1): 763–78. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0524-8>
- Endes C., Schmid O., Kinnear C., Mueller S., Camarero-Espinosa S., Vanhecke D., et al. An *in vitro* testing strategy towards mimicking the inhalation of high aspect ratio nanoparticulates. *Part. Fibre Toxicol.* 2014; 11: 40. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0040-x>
- Menas A.L., Yanamala N., Farcas M.T., Russo M., Friend S., Fournier P.M., et al. Fibrillar vs crystalline nanocellulose pulmonary epithelial cell responses: cytotoxicity or inflammation? *Chemosphere*. 2017; 171: 671–80. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.105>
- Ventura C., Lourenco A.F., Sousa-Uva A., Ferreira P.J.T., Silva M.J. Evaluating the genotoxicity of cellulose nanofibers in a co-culture of human lung epithelial cells and monocyte-derived macrophages. *Toxicol. Lett.* 2018; 291: 173–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.013>
- Vartiainen J., Pöhler T., Sirola K., Pylkkänen L., Alenius H., Hokkinen J., et al. Health and environmental safety aspects of friction grinding and spray drying of microfibrillated cellulose. *Cellulose*. 2011; 18(3): 775–86. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9501-7>

31. Clift M.J.D., Foster E.J., Vanhecke D., Studer D., Wick P., Gehr P., et al. Investigating the interaction of cellulose nanofibers derived from cotton with a sophisticated 3D human lung cell coculture. *Biomacromolecules*. 2011; 12(10): 3666–73. <https://doi.org/10.1021/bm200865j>
32. Lopes V.R., Sanchez-Martinez C., Strømme M., Ferraz N. *In vitro* biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: surface chemistry aspect. *Part. Fibre Toxicol.* 2017; 14(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0182-0>
33. Ilves M., Vilske S., Aimonen K., Lindberg H.K., Pesonen S., Wedin I., et al. Nanofibrillated cellulose causes acute pulmonary inflammation that subsides within a month. *Nanotoxicology*. 2018; 12(7): 729–46. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1472312>
34. Bhattacharya K., Kiliç G., Costa P.M., Fadeel B. Cytotoxicity screening and cytokine profiling of nineteen nanomaterials enables hazard ranking and grouping based on inflammatory potential. *Nanotoxicology*. 2017; 11(6): 809–26. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1363309>
35. Kovacs T., Naish V., O'Connor B., Blaise C., Gagne F., Hall L., et al. An ecotoxicological characterization of nanocrystalline cellulose (NCC). *Nanotoxicology*. 2010; 4(3): 255–70. <https://doi.org/10.3109/17435391003628713>
36. Aimonen K., Suhonen S., Hartikainen M., Lopes V.R., Norppa H., Ferraz N., et al. Role of surface chemistry in the *in vitro* lung response to nanofibrillated cellulose. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; 11(2): 389. <https://doi.org/10.3390/nano11020389>
37. De Lima R., Feitosa L.O., Maruyama C.R., Barga M.A., Yamawaki P.C., Vieira I.J., et al. Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. *Int. J. Nanomedicine*. 2012; 7: 3555–65. <https://doi.org/10.2147/ijn.s30596>
38. Hannukainen K.S., Suhonen S., Savolainen K., Norppa H. Genotoxicity of nanofibrillated cellulose *in vitro* as measured by enzyme comet assay. *Toxicol. Lett.* 2012; 211: S71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.276>
39. Donaldson K., Murphy F.A., Duffin R., Poland C.A. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.* 2010; 7: 5. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-5>
40. Shatkin J.A., Kim B. Cellulose nanomaterials: life cycle risk assessment, and environmental health and safety roadmap. *Environ. Sci. Nano*. 2015; (2): 477–99. <https://doi.org/10.1039/C5EN00059A>
41. Hadrup N., Bram K., Berthing T., Wol H., Bengtson S., Kofoed C., et al. Pulmonary effects of nano fibrillated celluloses in mice suggest that carboxylation lowers the inflammatory and acute phase responses. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2019; 66: 116–25. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.003>
42. Park E.J., Khaliullin T.O., Shurin M.R., Kisin E.R., Yanamala N., Fadeel B., et al. Fibrous nanocellulose, crystalline nanocellulose, carbon nanotubes, and crocidolite asbestos elicit disparate immune responses upon pharyngeal aspiration in mice. *J. Immunotoxicol.* 2018; 15(1): 12–23. <https://doi.org/10.1080/1547691x.2017.1414339>
43. Dobrowskaia M.A., Shurin M., Shvedova A.A. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016; 299: 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.022>
44. Li Y., Fujita M., Boraschi D. Endotoxin contamination in nanomaterials leads to the misinterpretation of immunotoxicity results. *Front. Immunol.* 2017; 8: 472–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00472>
45. ISO 29701:2010. Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for *in vitro* systems — Limulus amoebocyte lysate (LAL) test. Available at <https://www.iso.org/standard/45640.html>
46. Becklake M.R. Asbestos-related diseases of lung and other organs — their epidemiology and implications for clinical practice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976; 114(1): 187–227. <https://doi.org/10.1164/arrd.1976.114.1.187>
47. Catalán J., Rydman E., Aimonen K., Hannukainen K.S., Suhonen S., Vanhala E., et al. Genotoxic and inflammatory effects of nanofibrillated cellulose in murine lungs. *Mutagenesis*. 2017; 32(1): 23–31. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew035>
48. Yanamala N., Farcas M.T., Hatfield M.K., Kisin E.R., Kagan V.E., Geraci C.L., et al. *In vivo* evaluation of the pulmonary toxicity of cellulose nanocrystals: a renewable and sustainable nanomaterial of the future. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014; 2(7): 1691–8. <https://doi.org/10.1021/sc500153k>
49. Shvedova A.A., Kisin E.R., Yanamala N., Farcas M.T., Menas A.L., Williams A., et al. Gender differences in murine pulmonary responses elicited by cellulose nanocrystals. *Part. Fibre Toxicol.* 2016; 13(1): 28. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0140-x>
50. Farcas M.T., Kisin E.R., Menas A.L., Gutkin D.W., Star A., Reiner R.S., et al. Pulmonary exposure to cellulose nanocrystals caused deleterious effects to reproductive system in male mice. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2016; 79(21): 984–97. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1211045>
51. Shatkin J.A., Oberdorster G. Comment on Shvedova et al. Gender differences in murine pulmonary responses elicited by cellulose nanocrystals. *Part. Fibre Toxicol.* 2016; 13(1): 59. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0170-4>
52. Kobayashi N., Izumi H., Morimoto Y. Review of toxicity studies of carbon nanotubes. *J. Occup. Health*. 2017; 59(5): 394–407. <https://doi.org/10.1539/joh.17-0089-ra>
53. Silva-Carvalho R., Silva J.P., Ferreira P., Leitão A.F., Andrade F.K., Gil da Costa R.M., et al. Inhalation of bacterial cellulose nanofibrils triggers an inflammatory response and changes lung tissue morphology of mice. *Toxicol. Res.* 2019; 35(1): 45–63. <https://doi.org/10.5487/tr.2019.35.1.045>
54. Ede J.D., Ong K.J., Goergen M., Rudie A., Pomeroy-Carter C.A., Shatkin J.A. Risk analysis of cellulose nanomaterials by inhalation: current state of science. *Nanomaterials (Basel)*. 201; 9(3): 337. <https://doi.org/10.3390/nano9030337>
55. Sai T., Fujita K. A review of pulmonary toxicity studies of nanocellulose. *Inhal. Toxicol.* 2020; 32(6): 231–9. <https://doi.org/10.1080/08958378.2020.1770901>
56. Lopes V.R., Strømme M., Ferraz N. *In vitro* biological impact of nanocellulose fibers on human gut bacteria and gastrointestinal cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2020; 10(6): 1159. <https://doi.org/10.3390/nano10061159>
57. DeLoid G.M., Cao X., Molina R.M., Silva D.I., Bhattacharya K., Ng K.W., et al. Toxicological effects of ingested nanocellulose in *in vitro* intestinal epithelium and *in vivo* rat models. *Environ. Sci. Nano*. 2019; 6(7): 2105–15. <https://doi.org/10.1039/c9en00184k>
58. O'Connor B., Berry R., Goguen R. Commercialization of cellulose nanocrystal (NCCTM) production: a business case focusing on the importance of proactive ehs management. In: *Nanotechnology Environmental Health and Safety: Risks, Regulation, and Management*. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2014.
59. Ong K.J., Shatkin J.A., Nelson K., Ede J.D., Retsina T. Establishing the safety of novel bio-based cellulose nanomaterials for commercialization. *NanoImpact*. 2017; 6: 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.03.002>
60. Adewuyi A., Otuechere C.A., Adebayo O.L., Anazodo C., Pereira F.V. Renal toxicological evaluations of sulphonated nanocellulose from *Khaya senegalensis* seed in Wistar rats. *Chem. Biol. Interact.* 2018; 284: 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.015>
61. Otuechere C.A., Adewuyi A., Adebayo O.L., Ebigwei I.A. *In vivo* hepatotoxicity of chemically modified nanocellulose in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2020; 39(2): 212–23. <https://doi.org/10.1177/0960327119881672>
62. Toyokuni S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65(15): 2098–110. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.011>
63. Pitkanen M., Kangas H., Laitinen O., Sneek A., Lahtinen P., Peresin M.S., et al. Characteristics and safety of nano-sized cellulose fibrils. *Cellulose*. 2014; 21: 3871–86. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0397-x>
64. Čolić M., Tomić S., Bekić M. Immunological aspects of nanocellulose. *Immunol. Lett.* 2020; 222: 80–9. <https://doi.org/10.1016/j.imllet.2020.04.004>
65. Kollar P., Zavalova V., Hosek J., Havelka P., Sopuch T., Karpisek M., et al. Cytotoxicity and effects on inflammatory response of modified types of cellulose in macrophage-like THP-1 cells. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11(8): 997–1001. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.02.016>
66. Hua K., Ålander E., Lindström T., Mühranyan A., Strømme M., Ferraz N. Surface chemistry of nanocellulose fibers directs monocyte/macrophage response. *Biomacromolecules*. 2015; 16(9): 2787–95. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00727>
67. Nordli H.R., Pukstad B., Chinga-Carrasco G., Rokstad A.M. Ultrapure wood nanocellulose—assessments of coagulation and initial inflammation potential. *ACS Appl. Bio Mater.* 2019; 2(3): 1107–18. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00711>
68. Rashad A., Suliman S., Mustafa M., Pedersen T.O., Campodoni E., Sandri M., et al. Inflammatory responses and tissue reactions to wood-based nanocellulose scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019; 97: 208–21. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.068>
69. Nishiguchi T., Taguchi A. Thixotropic, cell-infiltrative nanocellulose hydrogel that promotes *in vivo* tissue remodeling. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020; 6(2): 946–58. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.9b01549>
70. Wang X., Chang C.H., Jiang J., Liu Q., Liao Y.P., Lu J., et al. The crystallinity and aspect ratio of cellulose nanomaterials determine their pro-inflammatory and immune adjuvant effects *in vitro* and *in vivo*. *Small*. 2019; 15(42): e1901642. <https://doi.org/10.1002/smll.201901642>
71. Sunasee R., Araoye E., Pyram D., Hemraz U.D., Boluk Y., Ckless K. Cellulose nanocrystal cationic derivative induces NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion associated with mitochondrial ROS production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 4: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.008>
72. Guglielmo A., Sabra A., Elbery M., Cerveira M.M., Ghenov F., Sunasee R., et al. A mechanistic insight into curcumin modulation of the IL-1 $\beta$  secretion and NLRP3 S-glutathionylation induced by needle-like cationic cellulose nanocrystals in myeloid cells. *Chem. Biol. Interact.* 2017; 274: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.028>
73. Osorio M., Cañas A., Puerta J., Díaz L., Naranjo T., Ortiz I., et al. *Ex vivo* and *in vivo* biocompatibility assessment (blood and tissue) of three-dimensional bacterial nanocellulose biomaterials for soft tissue implants. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 10553. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46918-x>
74. Xi Loh E.Y., Fauzi M.B., Ng M.H., Ng P.Y., Ng S.F., Ariffin H., et al. Cellular and molecular interaction of human dermal fibroblasts with bacterial nanocellulose composite hydrogel for tissue regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018; 10(46): 39532–43. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16645>
75. Kim G.D., Yang H., Park H.R., Park C.S., Park Y.S., Lee S.E. Evaluation of immunoreactivity of *in vitro* and *in vivo* models against bacterial synthesized cellulose to be used as a prosthetic biomaterial. *BioChip J.* 2013; 7: 201–9. <https://doi.org/10.1007/s13206-013-7302-9>
76. Tomić S., Kokol V., Mihajlović D., Mirčić A., Čolić M. Native cellulose nanofibrils induce immune tolerance *in vitro* by acting on dendritic cells. *Sci. Rep.* 2016; 6: 31618. <https://doi.org/10.1038/srep31618>
77. Tomić S., Ilić N., Kokol V., Gruden-Movsesijan A., Mihajlović D., Bekić M., et al. Functionalization-dependent effects of cellulose nanofibrils on tolerogenic mechanisms of human dendritic cells. *Int. J. Nanomedicine*. 2018; 13: 6941–60. <https://doi.org/10.2147/ijn.s183510>
78. Erdem J.S., Alswady-Hoff M., Ervik T.K., Skare Ø., Ellingsen D.G., Zienolddiny S. Cellulose nanocrystals modulate alveolar macrophage phenotype and phagocytic function. *Biomaterials*. 2019; 203: 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.025>
79. Ferrer A., Pal L., Hubbe M. Nanocellulose in packaging: advances in barrier layer technologies. *Ind. Crops Prod.* 2017; 95: 574–82. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.012>
80. Fink H., Hong J., Drotz K., Risberg B., Sanchez J., Sellborn A. An *in vitro* study of blood compatibility of vascular grafts made of bacterial cellulose in comparison with conventionally used graft materials. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2011; 97A(1): 52–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33031>