

КРАТКОСРОЧНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ В ТОНКУЮ КИШКУ КРЫСЫ ИНДУЦИРУЕТ БЫСТРОЕ РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИИ ГЕПАТОЦИТОВ

© 2020 г. А. Г. Масютин^{1,3,*}, М. В. Ерохина^{1,3}, В. А. Шипелин^{2,4},
И. В. Гмошинский², Г. Е. Онищенко¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

³ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

⁴ Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва, Россия

*E-mail: imber.acidis@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2020 г.

После доработки 31.08.2020 г.

Принята к публикации 09.09.2020 г.

Фуллерены C₆₀ применяются в различных областях промышленности, в связи с чем актуальны вопросы изучения их биобезопасности для живых организмов, биораспределения по органам и тканям лабораторных животных и индукции ими клеточных патологий. В последние годы эффективностью в выявлении углеродных наночастиц в биологических образцах показали методы аналитической и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Комбинация этих методов позволяет выявить индуцируемые наночастицами патологические изменения в клетках и детектировать в них скопления наночастиц. Целью работы было выявить клеточные патологии при прямом краткосрочном введении наночастиц фуллерена C₆₀ в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) крыс и провести детекцию наночастиц в образцах тонкой кишки и печени. Гистологический и ультраструктурный анализ не выявил патологических изменений в тонкой кишке, но были показаны дистрофические изменения гепатоцитов в виде накопления липидных включений. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и аналитической ТЭМ не выявили скоплений наночастиц фуллерена C₆₀ в исследуемых образцах. Вероятно, гепатостеатоз может являться следствием непрямого воздействия наночастиц C₆₀ на клетки печени. По-видимому, в ЖКТ происходит модификация поверхности фуллерена C₆₀ и его контакт с клетками тонкого кишечника индуцирует синтез провоспалительных цитокинов с их последующим попаданием в печень, приводя к быстрому развитию жировой дистрофии. Выявление и идентификация модифицированных наночастиц C₆₀ и их метаболитов, в свою очередь, являются сложной задачей, которая в перспективе может быть решена с использованием метода меченых атомов, масс-спектрометрии и современных метаболомных технологий.

DOI: 10.1134/S199272232004010X

ВВЕДЕНИЕ

Фуллерены и их производные находят широкое применение в различных областях промышленности в качестве компонентов лекарственных препаратов (в том числе противовирусного действия) [1], агрохимикатов [2, 3] и предлагаются для использования в качестве пищевых добавок [4, 2]. Для более широкого внедрения фуллеренов необходимо получение более точных данных об их биораспределении по органам и тканям лабораторных животных и вызываемых клеточных патологиях.

Проникновение фуллерена C₆₀ в организм зависит от целого ряда факторов, таких как размер частиц, путь их поступления и способность к пре-

одолению биологических барьеров, состав раствора, а также наличие модификаций в структуре молекулы C₆₀ [5]. Последнее обусловлено высокой реакционной способностью фуллерена C₆₀ в реакциях присоединения нуклеофилов [6].

На модели внутрибрюшинного введения было показано, что нативные фуллерены C₆₀ могут обнаруживаться в печени в клетках Купфера, клетках Ито и в гепатоцитах, но при этом не оказывают значимого токсического эффекта [6], за исключением накопления липидов в звездчатых клетках. В свою очередь, модифицированные молекулы фуллерена C₆₀ могут оказывать токсический эффект: 25 мг/кг метанофуллеренов являются летальной дозой для крыс. Также известно,

что некоторые виды модифицированных C_{60} могут оказывать влияние на иммунную систему [7].

В последние годы эффективность в выявлении наночастиц различной химической структуры в биологических образцах демонстрируют методы трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения, а также аналитической электронной микроскопии [8, 9]. Последняя включает в себя совокупность методов, дающих информацию о химических свойствах образца [10]. К ним относятся дифракция электронов, позволяющая детектировать и идентифицировать кристаллические структуры [11], и другие методы, основанные на различных типах взаимодействия пучка электронов с образцом. Комбинация этих методов может позволить одновременно выявить индуцируемые наночастицами патологические изменения в клетках и тканях и детектировать в них скопления наночастиц [12, 13]. Таким образом, целью данной работы было выявить клеточные патологии в органах крысы при прямом краткосрочном введении наночастиц фуллерена C_{60} в желудочно-кишечный тракт, а также провести детекцию фуллерена C_{60} методами аналитической высокоразрешающей электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наноматериал. В работе использовали промышленные частицы “Фуллерен C_{60} ” (чистота 99.8%, производства ЗАО “Фуллерен-центр”, Нижний Новгород), в качестве диспергирующего агента использовали 2 мас. % водного раствора пищевого кукурузного крахмала (КЗ “Гулькевичский” Россия). Концентрация фуллерена C_{60} в дисперсионной среде составила 3 мг/мл. Перед введением раствор обрабатывали в течение 3 мин на ультразвуковом процессоре Ultrasonic processor (произв. Cole-Parmer, США) с водяным охлаждением при мощности импульса 30 Вт/мл и частоте 20 кГц.

Ход эксперимента. Эксперимент проведен на 12 крысах-самцах аутбредной линии Wistar (по шесть животных в контрольной и экспериментальной группах), полученных из питомника “Столбовая” средней массой тела 194 ± 4 г ($M \pm m$), содержащихся в виварии ФГБУН “ФИЦ питания и биотехнологии” в условиях потребления стандартного сбалансированного рациона для грызунов и обратнoосмотической воды без ограничений. Исследование на животных выполняли после 16-часового голодания. 1 г гексенала растворяли в 20 мл физиологического раствора и вводили животным внутривентриально 5%-ный раствор в количестве 0.3 мл. После наступления наркоза вскрывали брюшную полость, делали разрез вдоль белой линии живота, находили под-

вздошную кишку. Далее выделяли участок подвздошной кишки длиной 5–5.5 см и изолировали его путем накладывания лигатур сперва проксимально (затягивается полностью), затем дистально (затягивается после введения раствора композиции фуллерена C_{60} , контрольного раствора крахмала или физиологического раствора). Наложение лигатур проводили осторожно, не затрагивая крупных сосудов брыжейки и нервных сплетений. Объем вводимого раствора составил 1 см³, затем брюшную полость зашивали. Через 3 ч после введения суспензии крыс под действием 1.5 мл раствора гексенала умерщвляли обескровливанием. На гистологический анализ и электронную микроскопию отбирали по фрагменту от кишки и печени. На анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения содержания фуллерена C_{60} брали остаточную часть печени. Контрольным животным вводили суспензию крахмала.

Культирование макрофагальных клеток для детекции C_{60} . Использовали ТНР-1 – клетки острой моноцитарной лейкемии человека (Российская коллекция клеточных культур, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин, 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) при 37°C и 5% CO₂. Макрофагальную дифференцировку индуцировали добавлением 100 нМ форболового эфира (Sigma, США). На третьи сутки дифференцировки добавляли суспензию C_{60} в концентрации 50 мкг/мл и фиксировали клетки через 12 ч.

Световая микроскопия. Гистологические препараты изготавливали по стандартной методике: кусочки печени и тонкой кишки фиксировали формалином на фосфатном буфере, обезживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в парафин. Парафиновые блоки нарезали на микротоме, полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам.

Срезы из эпоксидных блоков толщиной 1 мкм изготавливали на пирамитоме LKB Pyramitome 11800, оборудованном стеклянным ножом, и окрашивали 1%-ным водным раствором метиленового синего и 1%-ным водным раствором тетраборнокислого натрия. Анализ препаратов проводили под микроскопом Leica DM 1000.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Объекты фиксировали 2.5%-ным глутаровым альдегидом (Ted Pella, INC) на 0.1 М фосфатном буфере в течение 2 ч. Далее отмывали от фиксатора и дофиксировали 1%-ным раствором тетраоксида осмия (OsO₄) в течение 2 ч при +4°C. Обезживание образцов проводили в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, после чего заключали в эпоксидную смолу (Epoxy embedding

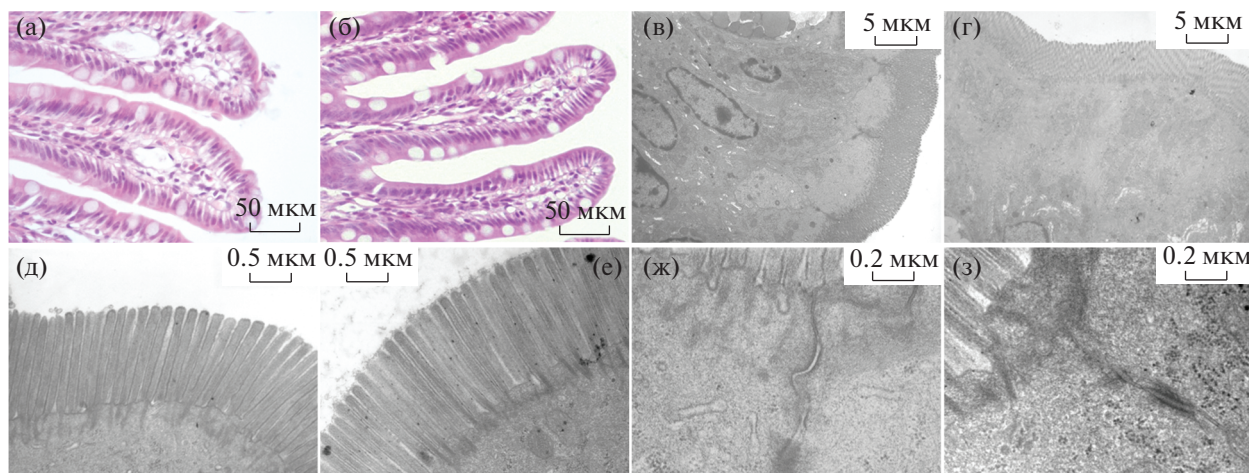


Рис. 1. Подвздошная кишка крыс после введения фуллера C₆₀. Ворсинки кишки, окраска гематоксилином и эозином: а – контроль, б – через 3 ч контакта с суспензией C₆₀; ультраструктура энтероцитов, трансмиссионная электронная микроскопия, контрастирование по Рейнольдсу: в – контрольный образец, г – энтероциты после контакта с C₆₀; д – микроворсиночная область, контроль, е – область микроворсинок после контакта с C₆₀; ж – клеточные контакты соседних энтероцитов, контроль, з – клеточные контакты энтероцитов после контакта с суспензией C₆₀.

medium for microscopy, Fluka, Швейцария). Срезы с полученных блоков получали на ультрамикротоме (Leica, Германия) и окрашивали по Рейнольдсу. Полученные препараты исследовали с помощью аналитического электронного микроскопа “JEM 2100” (Jeol, Япония).

Дифракция электронов. Детекцию наночастиц фуллеренов C₆₀ проводили с помощью аналитического электронного микроскопа JEM-2100 (Jeol, Япония). Для аналитического исследования использовали срезы толщиной 80–100 нм, помещенные на медные сеточки.

Для поиска электронно-плотных кристаллических объектов использовали режим темного поля.

Методика оценки биораспределения фуллера C₆₀ с использованием ВЭЖХ. Содержание C₆₀ исследовали в гомогенатах печени крыс, приготовленных на 0.154 М KCl в 0.05 М Трис-HCl-буфере, pH 7.4, в соотношении 1:4 (масса:объем). Методика экстракции C₆₀ из внутренних органов и его определения с использованием метода ВЭЖХ на обращенной фазе была подробно описана в [14]. Количественный анализ C₆₀ проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1200 с колонкой “ZORBAX C18” (размер 4.6 × 150 мм, заполненной C18 фазой с размером гранул 5 мкм) и программного обеспечения для обработки хроматограмм ChemStation B02.03. Для построения стандартного графика готовили растворы C₆₀ в толуоле следующих концентраций: 0.1, 0.075, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002, 0.001, 0.0005, 0.0002, 0.0001 мг/мл. Каждый образец экстракта и контроля вводили в систему ВЭЖХ в объемах 10 и 100 мкл и анализировали в двух повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ультраструктуры энтероцитов тонкой кишки крыс и гепатоцитов печени после воздействия наночастиц фуллера C₆₀. Методика введения в изолированный участок подвздошной кишки является классической при изучении процессов всасывания нативных наночастиц [15]. Анатомические и гистологические особенности этого отдела кишечника являются оптимальными для изучения проникновения именно нативных наночастиц фуллера C₆₀, так как в этом участке нет прямого сообщения с крупными желчными протоками и наночастицы не подвергаются воздействию желчи и основных кишечных ферментов. Токсины, образующиеся в кишечнике, всасываются в кровь и обезвреживаются в печени.

Гистологический анализ подвздошной кишки экспериментальных животных показал, что ворсинки кишки не деформированы и в них не выявляются патологические изменения. Основу ворсинок составляет соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки. Соединительная ткань содержит небольшое количество гладкомышечных клеток. Повышенной инфильтрации лейкоцитарными клетками не наблюдается. Бокаловидные клетки располагаются на кишечных ворсинках поодиночке среди энтероцитов, достоверных различий между контрольными и опытными образцами не выявлено (рис. 1а, 1б).

Электронно-микроскопический анализ тонкой кишки контрольных и экспериментальных животных показал, что энтероциты демонстрируют типичное для этих клеток строение: клетки поляризованные, ядра имеют вытянутую форму и

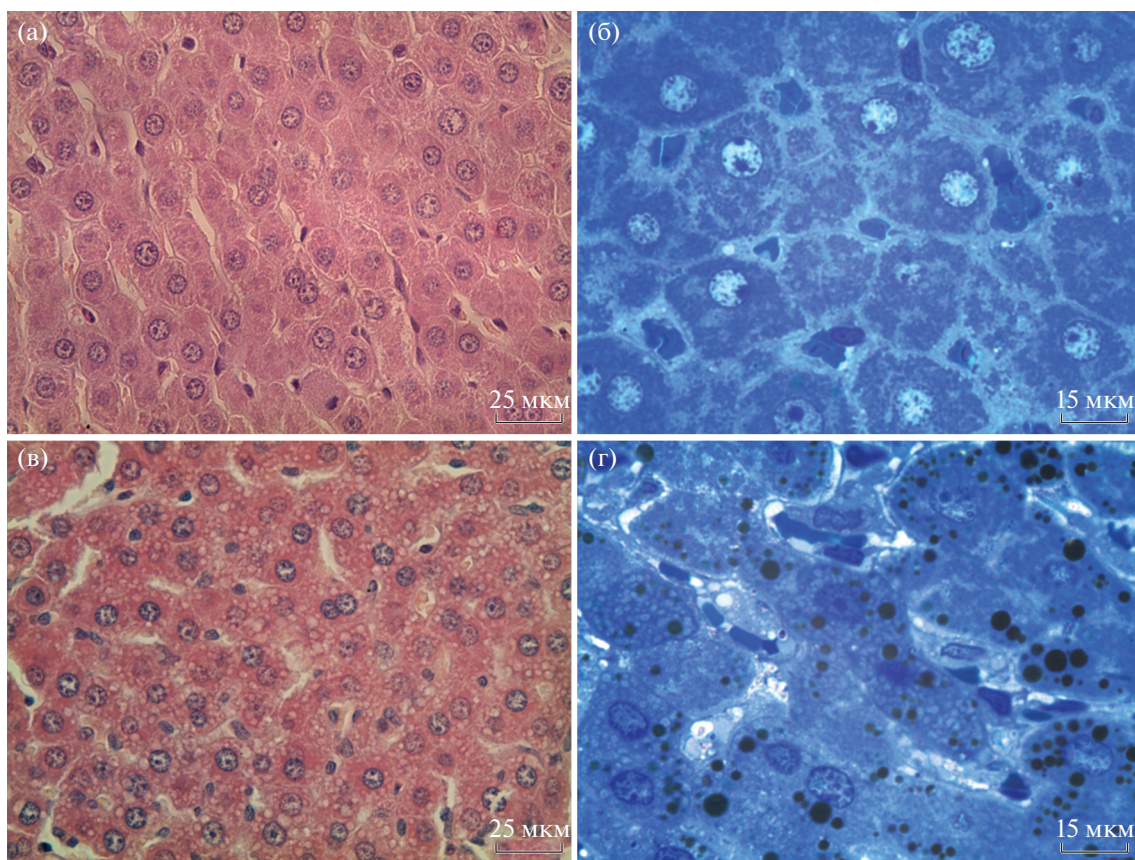


Рис. 2. Жировая дистрофия гепатоцитов после краткосрочного введения фуллера C_{60} в тонкую кишку крыс: а, в – окрашивание гематоксилином и эозином, б, г – окрашивание метиленовым синим и контрастирование OsO_4 ; а, б – контроль, в, г – печень крысы через 3 ч после инъекции C_{60} в тонкий кишечник. Световая микроскопия.

расположены в базальной области клеток, в околоядерном пространстве локализованы цистерны комплекса Гольджи (рис. 1в, 1г). На апикальной поверхности клеток расположены многочисленные микроворсинки (рис. 1д, 1е). Зона контактов представлена плотными, щелевыми контактами и десмосомами (рис. 1ж, 1з). Ультраструктурных изменений в энтероцитах при краткосрочном введении фуллера C_{60} выявлено не было.

Стандартный гистологический анализ образцов печени экспериментальных и контрольных животных показал, что паренхима печени образована печеночными дольками, основу которых образуют гепатоциты, расположенные тяжами. Все дольки соединены между собой междольковой, межсегментарной соединительной тканью (рис. 2а, 2б). При исследовании обнаружены дистрофические изменения в гепатоцитах во всех опытных образцах печени крыс в виде образования жировых капель разного размера (рис. 2в). На полутонких срезах жировые капли выявляются при контрастировании материала тетраоксидом осмия (рис. 2г).

При ультраструктурном исследовании выявлено, что в отличие от ядер округлой формы в ге-

патоцитах контрольных животных (рис. 3а) ядра гепатоцитов экспериментальных животных деформированы и имеют многочисленные выпячивания ядерной оболочки, в результате чего приобретают извилистую форму (рис. 3б). В цитоплазме гепатоцитов локализованы многочисленные жировые включения разного размера (от 500 нм до 5 мкм) (рис. 3в) и выявляются отдельные зоны с набухшими митохондриями (рис. 3г). Такие митохондрии характеризуются пониженной электронной плотностью, наблюдается набухание матрикса и разрушение крист.

Таким образом, методы световой и электронной микроскопии подтвердили появление патологических изменений в гепатоцитах печени и их отсутствие в энтероцитах подвздошной кишки.

ДЕТЕКЦИЯ АГРЕГАТОВ И СКОПЛЕНИЙ НАНОЧАСТИЦ ФУЛЛЕРЕНА C_{60} В ОРГАНАХ КРЫСЫ

Выявление наночастиц фуллера C_{60} в печени методом ВЭЖХ. Высокоэффективная жидкостная хроматография является основным методом детекции фуллера C_{60} в биологических образ-

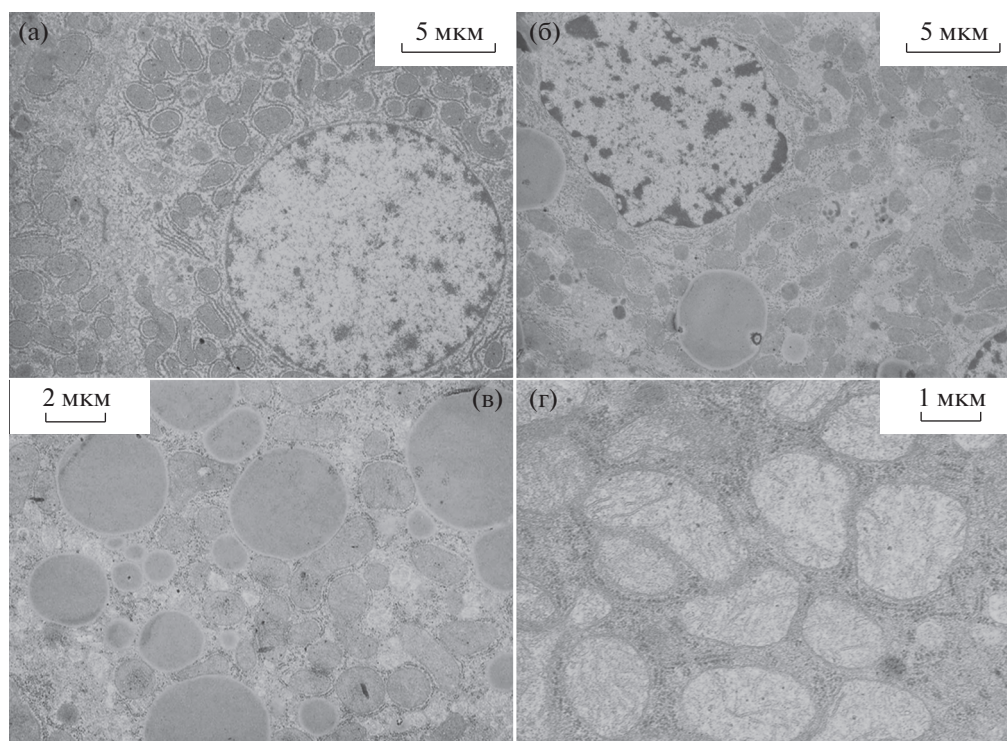


Рис. 3. Ультраструктура гепатоцитов печени, трансмиссионная электронная микроскопия, окрашивание по Рейнольдсу: а – контрольный образец через 3 ч после введения физиологического раствора, б – опытный образец, через 3 ч после введения суспензии фуллеренов C₆₀, в – скопление липидных капель в гепатоцитах экспериментальных животных, г – набухание митохондрий в гепатоцитах экспериментальных животных.

цах [16–18]. Метод основан на гидрофобных взаимодействиях молекул фуллерена с неподвижной C18-фазой в потоке более гидрофильного растворителя. Проточное детектирование фуллерена осуществляется по его оптической плотности при длине волны 340 нм. Как видно из представленных данных калибровки C₆₀ (рис. 4а, 4б), стандартный график, полученный в интервале концентраций фуллерена от 10 до 100 нг/мм³, является нелинейным с “изломом” в окрестности концентрации 50 нг/мм³. Таким образом, имеет место кажущееся отклонение от закона Ламберта–Бера, связанное, вероятно, с образованием при концентрации более 50 нг/мм³ мультимолекулярных агрегатов (мицелл) фуллерена в подвижной фазе, имеющих меньший коэффициент экстинкции при выбранной длине волны, чем истинный (молекулярный) раствор фуллерена, стабильный при меньших концентрациях. Для высоких концентраций фуллерена C₆₀ (от 20 и до 1000 нг в образце) стандартный график является линейным, т.е. закон Ламберта–Бера в точности соблюдается. Хроматограмма контрольного образца C₆₀, снимаемая после серии анализов каждого опытного образца, представлена на рис. 4в. Результаты ВЭЖХ анализа экстрактов из органов животных опытной группы показали отсутствие

C₆₀ в исследованных образцах в пределах чувствительности метода (пример – хроматограмма экстракта печени на рис. 4г).

Таким образом, исследование образцов печени животных с помощью ВЭЖХ показало отсутствие фуллерена C₆₀ во всех случаях в пределах чувствительности метода. Отметим, что у данного метода есть ограничение – он определяет только фуллерен с химической формулой C₆₀, применяемый при калибровке хроматографической колонки [19, 20]. Однако при биотрансформации фуллерена C₆₀ в биологических средах его гидрофобность и, следовательно, время удержания на колонке изменяются непредсказуемым образом, вследствие чего его детекция методом ВЭЖХ становится невозможной. Это может приводить к занижению содержания наноматериала в экспериментальных клетках и органах. Вопрос о биотрансформации фуллеренов и о возникающих модификациях исследован недостаточно. Так, на образцах цельной крови, гомогенатов и микросомальных фракций печени крыс, в которые добавляли фуллерен C₆₀ в различных концентрациях и изучали при помощи метода ВЭЖХ, было выявлено значительное снижение его концентрации в течение 24 ч, что свидетельствовало о нестабильности фуллерена C₆₀ в биологических средах [14].

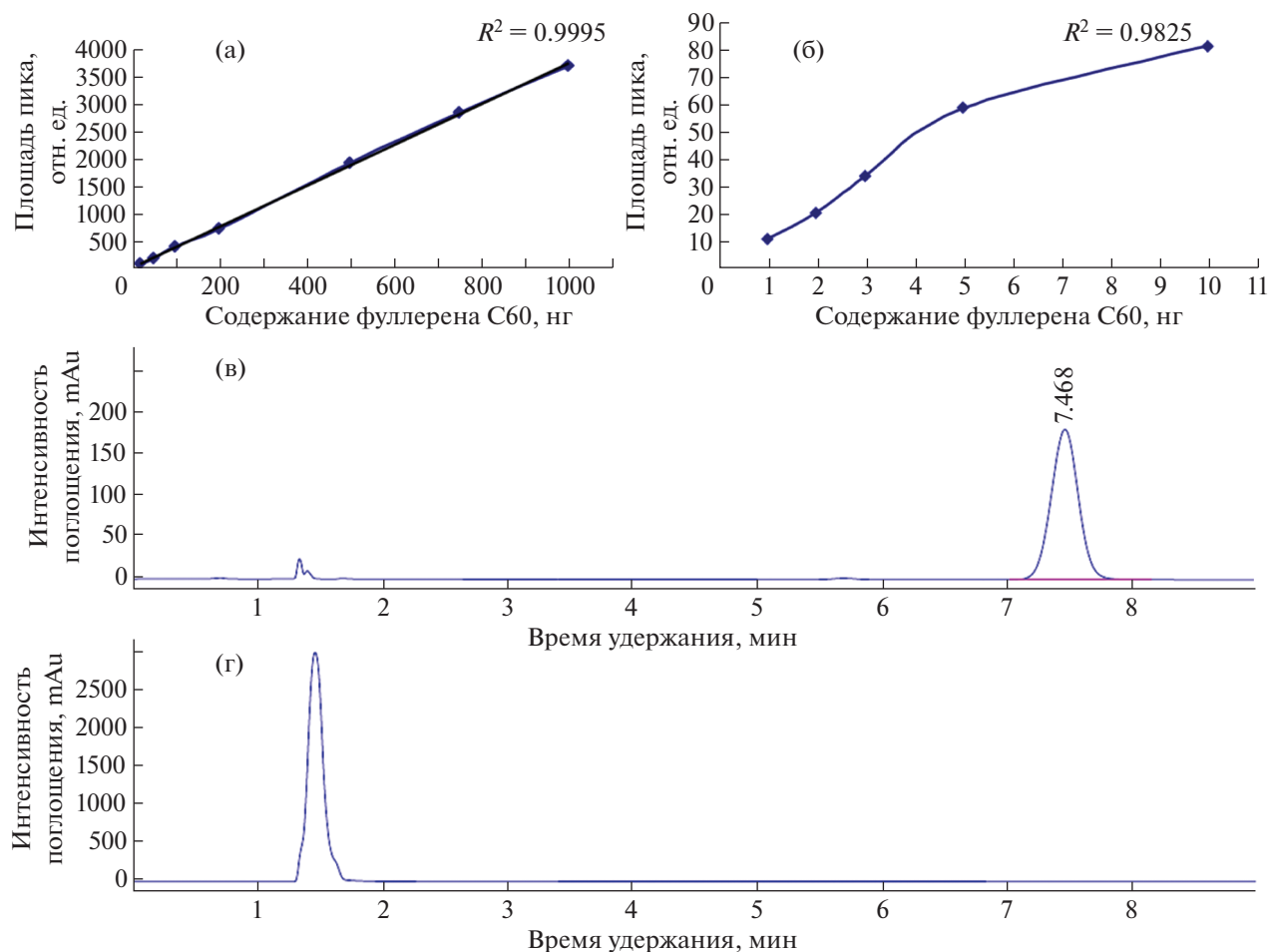


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограммы и калибровочные графики C₆₀: а – калибровочный график C₆₀ в толуоле с концентрацией фуллерена от 0.1 до 0.002 мг/мл. Построение графика методом наименьших квадратов (линейная регрессия); б – калибровочный график C₆₀ в толуоле с концентрацией фуллерена от 0.001 до 0.0001 мг/мл; в – пример отсутствия пика C₆₀ на хроматограмме экстракта из печени крысы; г – хроматограмма контрольного образца C₆₀.

ДЕТЕКЦИЯ C₆₀ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДАМИ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ (ТЭМ)

Характеристика наноматериала методами ТЭМ. Известно, что фуллерены C₆₀ представляют собой наноразмерные частицы диаметром около 1 нм, 60 атомов углерода в которых упакованы наподобие формы футбольного мяча и способны упаковываться, формируя моно- и поликристаллы разнообразных размеров и форм. На ультратонких срезах, полученных с наночастиц C₆₀ в эпоксидной смоле, детектируются отдельные агрегаты и скопления фуллерена C₆₀ размером от 10 до 400 нм (рис. 5а, 5б). Применение метода дифракции электронов к наночастицам образца показало, что агрегаты разных размеров дают электронограммы, формирующие яркие центральные кольца и подтверждающие химическую структуру, характерную для фуллерена C₆₀ (рис. 5в, 5г).

Детекции C₆₀ в биологических образцах методами ТЭМ. Для отработки метода – анализа C₆₀ в биологических образцах методом ТЭМ – была проведена детекция C₆₀ в макрофагах человека линии THP-1 после их инкубации с C₆₀. В отличие от контрольных образцов (рис. 6а) такие макрофаги характеризуются развитием жировой дистрофии – появлением в цитоплазме жировых капель размером 0.5–2 мкм (рис. 6б), выявлены как скопления электронно-плотных частиц (1–10 мкм), так и их отдельные агрегаты (100–200 нм) (рис. 6в, 6г). Методом дифракции электронов данные скопления были идентифицированы как фуллерены C₆₀ (рис. 6д, 6е). Таким образом, в биологических образцах с признаками патологических изменений методом ТЭМ возможно детектировать фуллерен C₆₀ в виде агрегатов размером не менее 100–200 нм.

В результате ультраструктурного исследования энтероцитов методом темного поля в районе

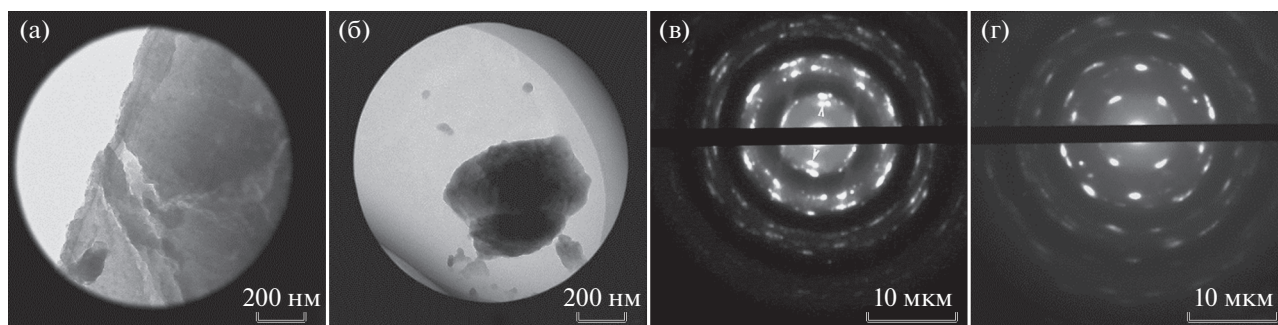


Рис. 5. Характеристика агрегатов C₆₀ методами электронной микроскопии: а – крупный агрегат C₆₀, б – агрегаты C₆₀ средних и мелких размеров; в, г – электронограммы, снятые с агрегатов C₆₀ для а и б соответственно.

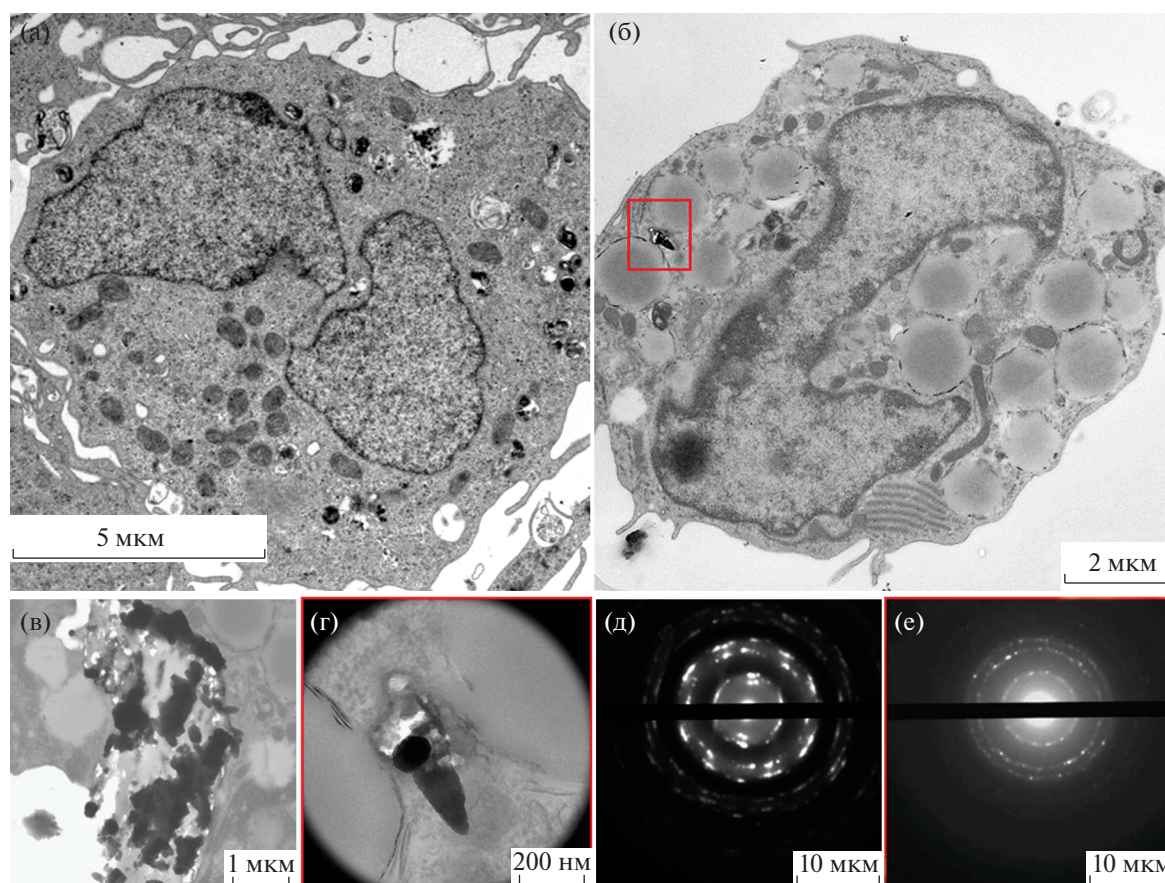


Рис. 6. Макрофаги THP-1 после инкубации с фуллеренами C₆₀ в течение 12 ч. Трансмиссионная электронная микроскопия, окрашивание по Рейнольдсу: а – контроль, б – 12 ч инкубации с C₆₀. Рамкой показано электронно-плотное включение C₆₀; в, г – агрегаты C₆₀ разного размера и их электронограммы (д, е).

микроворсинок были обнаружены только электронно-плотные частицы размером до 10 нм (рис. 7а, показано стрелкой). В цитоплазме энтероцитов электронно-плотных скоплений размером 100–200 нм, которые можно было отнести к агрегатам фуллеренов C₆₀, обнаружено не было. При ультраструктурном исследовании печени были обнаружены только электронно-плотные

включения в жировых вакуолях, которые образуются при контрастировании материала тетраоксидом осмия (рис. 7б, показано стрелкой).

Практически полное отсутствие накопления фуллерена C₆₀ во внутренних органах, несмотря на значительную липофильность этого соединения и его выраженное влияние на ряд изучаемых показателей, было подтверждено в ряде токсико-

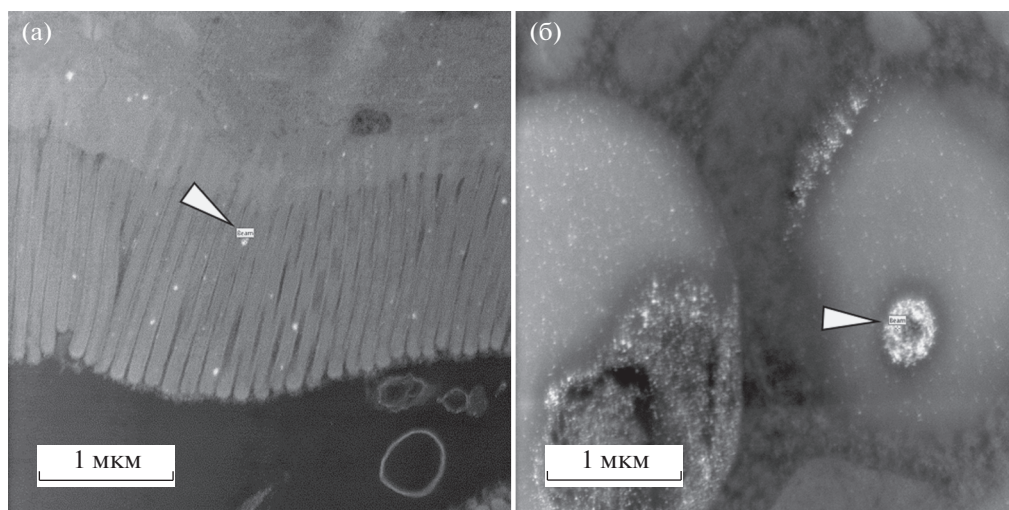


Рис. 7. Электронно-плотные включения в области микроворсинок энтероцитов (а) и жировых вакуолях гепатоцитов (б) экспериментальных животных (фиксация и проводка без контрастирования уранилацетатом).

логических работ [17, 18, 20], в том числе при ежедневном 28- и 92-дневном пероральном введении. При естественном (пероральном) пути поступления C_{60} возможна его биodeградация, или биотрансформация, что создает дополнительные сложности для точной оценки содержания C_{60} в том или ином органе живого организма. Тем не менее введение C_{60} в заведомо аггравированной дозе в изолированную петлю тонкой кишки крыс в обход воздействия ферментных систем желудка и поджелудочной железы, которые также могут служить причиной биоконверсии C_{60} , не привело к обнаружению C_{60} во внутренних органах ни при помощи ВЭЖХ, ни ТЭМ. Возможной причиной этого является переход немодифицированной формы C_{60} в его гидроксисилированные или другие производные, точный состав которых до сих пор не установлен. Данный процесс, как показали результаты проведенных модельных тестов *in vitro* по изучению биodeградации C_{60} [14], является достаточно быстрым. По этим причинам выявить присутствие C_{60} в изученных органах не удалось. При этом биотрансформированные, включая гидроксисилированные, производные фуллерена могут продолжать оказывать специфическое биологическое действие на организм, в том числе проявлять токсичность для клеток печени, несмотря на отсутствие видимых признаков наличия исходного C_{60} в ткани.

Помимо ковалентных и нековалентных модификаций поверхности фуллеренов, возможна их деградация в живых объектах. В [21] показана возможность биodeградации фуллеренов C_{60} миелопероксидазой через синтез гипохлорита натрия,

являющегося сильным биологическим окислителем. Вероятно, модификация или деградация фуллеренов и их производных в зависимости от степени измененности может затруднять их выявление в органах и тканях с помощью спектрометрических методов [22] или электронной микроскопии.

Имеющиеся данные, как правило, описывают благоприятное воздействие C_{60} на печень и связывают его с антиоксидантными свойствами фуллерена C_{60} . В [23, 24] показана роль C_{60} в качестве гепатопротектора, снижающего, в том числе, эффект ожирения. Вероятно, развитие жировой дистрофии может объясняться тем, что имеет место не прямое воздействие наночастиц. По-видимому, при высокой концентрации C_{60} в просвете кишечника клетки последнего могут запускать секрецию цитокинов, включая фактор некроза опухоли – α (TNF- α), интерлейкин-6 (IL-6) и интерлейкин-8 (IL-8). Усиленная продукция TNF- α вызывает развитие жировой дистрофии в печени [25, 26] и дальнейшую продукцию гепатоцитами провоспалительных цитокинов (IL-6, TGF- β). Кроме того, наблюдали патологию митохондрий, что может быть следствием их повреждения в результате воздействия TNF- α [27].

На основании имеющихся данных можно предположить следующую модель воздействия фуллерена C_{60} на гепатоциты: неалкогольный гепатостеатоз может быть вызван накоплением триглицеридов в печени, а также окислительным стрессом и провоспалительными цитокинами [28]. Вероятно, при взаимодействии суспензии фуллерена C_{60} с микрофлорой подвздошной

кишки молекулы фуллерена могут подвергаться модификации. Согласно данным изучения процессов ферментативного окисления фуллерена *in vitro* его поверхность может гидроксिलироваться [29]. Модифицированные в ходе пребывания в просвете кишки фуллерены, по всей видимости, могут взаимодействовать с М-клетками Пейеровых бляшек. Известно, что гидроксिलированные C₆₀ оказывают стимулирующее действие на клетки иммунной системы, усиливая выброс TNF- α [30, 31]. TNF- α относится к многофункциональным провоспалительным цитокинам, в [25] внутривенная инъекция данного цитокина приводила к развитию жировой дистрофии печени у крыс в течение 5 ч. По-видимому, контакт суспензии модифицированных C₆₀ с тканями тонкого кишечника может вызывать усиление выброса TNF- α или других провоспалительных цитокинов с их последующим попаданием в кровоток и, соответственно, в печень, приводя таким образом к развитию жировой дистрофии в течение 3 ч после введения суспензии. Ввиду низких концентраций C₆₀, достигаемых в биологических тканях, выявление и идентификация его предполагаемых метаболитов являются сложной задачей, которая в перспективе может быть решена с использованием метода меченых атомов, а также масс-спектрометрии и современных метаболомных технологий.

Авторы выражают благодарность Л.С. Василевской за помощь в проведении эксперимента на изолированной петле кишечника крыс.

Работа выполнена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема Минобрнауки России № 0529-2014-0053).

Работа выполнена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0529-2019-0057).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bakry R., Najam-ul-haq M., Huck C.W. // Int. J. Nanomedicine. 2007. V. 2. № 4. P. 639.
2. Husen A., Siddiqi K.S. // J. Nanobiotechnology. 2014. V. 12. P. 16. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-16>
3. Zaytseva O., Neumann G. // Chem. Biol. Technol. Agric. 2016. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0070-8>
4. Steffensen I., Alexander J., Binderup M. et al. // Norwegian Scientific Committee for Food Safety. 2010. P. 7.
5. Shipelin V.A., Gmshinski I.V., Tutel'yan V.A. et al. // Nanotechnol Russia. 2013. V. 8. P. 810. <https://doi.org/10.1134/S1995078013060141>
6. Moussa F., Trivin F., Céolin R. et al. // Fullerene Sci Technol. 1996. V. 4. № 1. P. 21. <https://doi.org/10.1080/10641229608001534>
7. Rajagopalan P., Wudl F., Schinazi R.F., Boudinot F.D. // Antimicrob Agents Chemother. 1996. V. 40. № 10. P. 2262.
8. Shebanova A.S., Bogdanov A.G., Ismagulova T.T. et al. // Biofizika. 2014. V. 59. № 2. P. 284.
9. Griffiths G. // Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006. P. 21.
10. Botton G., Prabhudev S. // Springer Handbooks. New York. 2019. P. 345.
11. Glaeser R.M., Thomas G. // Biophys. J. 1969. V. 9. № 9. P. 1073.
12. Onishchenko G.E., Erokhina M.V., Abramchuk S.S. et al. // Bull. Experimental Biology and Medicine. 2012. V. 154. № 2. P. 265.
13. Plascencia-Villa G., Starr C.R., Armstrong L.S. et al. // Integr. Biol. 2012. V. 4. № 11. P. 1358. <https://doi.org/10.1039/c2ib20172k>
14. Rhodes R.S., Karnovsky M.J. // Lab. Invest. United States. 1971. V. 25. № 3. P. 220.
15. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E. et al. // Chem. Biol. 1995. V. 2. № 6. P. 385. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90219-8](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90219-8)
16. Baati T., Bourasset F., Gharbi N. et al. // Biomaterials. 2012. V. 33. № 19. P. 4936. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.036>
17. Шупелин В.А., Арианова Е.А., Трушина Э.Н. и др. // Гигиена и санитария. 2012. Т. 2. С. 90.
18. Volkheimer G. // Adv. Pharmacol. Chemother. 1977. V. 14. P. 163. [https://doi.org/10.1016/s1054-3589\(08\)60188-x](https://doi.org/10.1016/s1054-3589(08)60188-x)
19. Шупелин В.А., Авреньева Л.И., Гусева Г.В. и др. // Вопросы питания. 2012. Т. 81. № 5. С. 20.
20. Litasova E.V., Iljin V.V., Sokolov A.V. et al. // Dokl. Biochem. Biophys. 2016. V. 471. № 3. P. 417. <https://doi.org/10.1134/S1607672916060119>
21. Pycke B.F., Chao T.C., Herckes P. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 404. № 9. P. 2583. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6090-8>
22. Halenova T., Raksha N., Vovk T. et al. // Int. J. Obes. 2018. V. 42. № 12. P. 1987. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0016-2>
23. Halenova T.I., Vareniuk I.M., Roslova N.M. et al. // RSC Adv. The Royal Soc. Chem. 2016. V. 6. № 102. P. 100046. <https://doi.org/10.1039/C6RA20291H>
24. Yachi R., Muto C., Ohtaka N. et al. // J. Clin. Biochem. Nutr. 2013. V. 52. № 2. P. 146. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.12-101>

25. *Wandrer F., Liebig S., Marhenke S. et al.* // Cell. Death. Dis. 2020. V. 11. № 212.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2411-6>
26. *Mariappan N., Elks C.M., Fink B., Francis J.* // Free Radic. Biol. Med. 2009. V. 46. № 4. P. 462.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.049>
27. *Day C.P., James O.F.* // Gastroenterology. 1998. V. 114. № 4. P. 842.
28. *Gitsov I., Simonyan A., Wang L. et al.* // J. Polymer Sci. A. 2012. № 50. P. 119.
<https://doi.org/10.1002/pola.24995>
29. *Liu Y., Jiao F., Qiu Y. et al.* // Nanotechnology. 2009. V. 20. № 41. P. 415102.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/41/415102>
30. *Xiang K., Dou Z., Li Y. et al.* // Nanosci Nanotechnol. 2012. V. 12. № 3. P. 2169.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5681>