

НАНОБИОМЕДИЦИНА И НАНОФАРМАЦЕВТИКА

УДК 546.26:620.187:576.3:541.182

ПРОМЫШЛЕННЫЕ МНОГОСТЕННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ ПОДВЕРГАЮТСЯ БИОДЕГРАДАЦИИ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ МЫШИ

© 2024 г. А. Г. Масютин^{1,2,*}, К. А. Сычевская², И. В. Бочарова², М. В. Ерохина^{1,2}

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

²Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

*E-mail: squiggoth@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.02.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 25.03.2024 г.

С ростом производства и применения многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) возрастает риск их попадания в пищевые цепи, в связи с чем необходима оценка возможности выведения или разрушения МУНТ в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) животных. Выявлены варианты разрушения промышленных МУНТ после прохождения ЖКТ мыши методами спектроскопии комбинационного рассеяния, стандартной и аналитической электронной микроскопии. В МУНТ, выделенных из фекалий, обнаружены изменение плотности дефектов, перфорация стенок и распад на мелкие фрагменты. Эти изменения являются более выраженными в сравнении с деградацией МУНТ под действием только желудочного сока или соляной кислоты. Продукты биodeградации МУНТ сохраняют кристаллическую структуру, что позволяет идентифицировать их методом дифракции электронов. Наноматериал в клетках и межклеточном пространстве слизистой оболочки желудка и ободочной кишки не выявлен. Таким образом, показано, что эпителий ЖКТ является эффективным барьером для МУНТ, а биodeградация МУНТ начинается в желудке и продолжается в кишечнике, приводя к их разрушению.

DOI: 10.56304/S1992722324601435

ВВЕДЕНИЕ

Многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) являются одними из наиболее востребованных наноматериалов в разных областях промышленности — текстильной, автомобилестроении, авиационной, космической, а также в строительстве [1]. Кроме того, углеродные нанотрубки (УНТ) рассматриваются в качестве эффективного стимулятора роста сельскохозяйственных растений [2, 3]. Известно, что МУНТ могут накапливаться в тканях растений и животных [4, 5], что создает угрозу контаминации ими пищевых цепей и индукции патологических изменений. Согласно литературным данным введение углеродных наночастиц лабораторным животным через органы дыхания, кожу или желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) вызывает в клетках и тканях патологические изменения [6], индуцируя окислительный стресс, повреждение ДНК, воспаление, фиброз [7]. Даже небольшие дозы перорально вводимых МУНТ способны изменять физиологические и биохимические показатели лабораторных животных [8]. Одной из важнейших характеристик МУНТ является их устойчивость к высоким тем-

пературам и химическим воздействиям [9], что осложняет их разрушение под действием агентов окружающей среды. Тем не менее в организме позвоночных животных имеются клетки, которые могут создавать и поддерживать крайне агрессивные среды, потенциально способные повреждать структуру МУНТ. К таким клеткам относятся специализированные клетки-фагоциты — нейтрофилы и макрофаги, генерирующие активные формы кислорода (АФК) — перекись водорода, гипохлорит и другие [10]. Разрушение нанотрубок происходит в фагосомах. Имеются данные, согласно которым нейтрофилы способны генерировать АФК непосредственно в окружающую среду [11, 12].

Химически агрессивная среда поддерживается в желудке, париетальные клетки которого способны продуцировать соляную кислоту и создавать среду с низкими значениями pH [13], что способствует деградации МУНТ [14, 15]. Было показано *in vitro*, что соляная кислота и желудочный сок способны повреждать структуру промышленных МУНТ, вызывая появление брешей в их стенках [16], тогда как действие гипохлорита

натрия приводит к истончению их стенок [17]. Сведений об элиминации МУНТ именно в условиях организма недостаточно и знания в этой области фрагментарны. В частности, абсолютно не исследованы защитные функции организма при попадании МУНТ в ЖКТ и возможность их разрушения в условиях *in vivo*. На фоне роста производства и применения УНТ, а также риска их попадания в пищевые цепи необходимы дальнейшая разработка данной темы и оценка возможности выведения и разрушения МУНТ разными системами организма млекопитающих и человека. Ответы на эти вопросы являются важной составляющей проблемы нанобиобезопасности применения углеродных наночастиц в сельском хозяйстве и загрязнения почвы и воды наноматериалами. В связи с этим цель работы — выявление вариантов разрушения промышленных МУНТ после прохождения через ЖКТ мыши. Так как МУНТ состоят преимущественно из углерода, их обнаружение в биологическом материале затруднено и требует использования комбинации стандартной трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и метода дифракции электронов. Это позволяет эффективно отличить даже единичные МУНТ от окружающего электронно-плотного биоматериала и наночастиц иного химического состава [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. МУНТ “Таунит” получены методом химического осаждения из газовой фазы (“chemical vapor deposition”, CVD) (ООО “НаноТехЦентр”, Тамбов, Россия, <http://eng.nanotc.ru/products/87-cnm-taunit>) с использованием никеля в качестве катализатора.

Пероральное введение суспензии МУНТ мышам. Исследования *in vivo* проводили на базе vivария Центрального НИИ туберкулеза (ЦНИИТ) г. Москвы. Мышей линии C57Bl/6 × DBA/2 ($n = 32$) содержали в соответствии с методическими указаниями Министерства здравоохранения РФ № 755, а также NIH Office of Laboratory Animal Welfare. Все экспериментальные процедуры были одобрены Этическим комитетом ЦНИИТ по уходу за животными (протоколы IACUC № 2, 5, 6, 14). Протокол № 2 от 02 февраля 2021 г.

Средний вес животных составил 29 ± 1.7 и 31.8 ± 1.8 г в начале и конце эксперимента соответственно. Животные были разделены на две равные группы по 16 особей каждая случайным образом: контрольная группа получала стандартный рацион и питьевую воду. Экспериментальную группу составили животные, получавшие МУНТ “Таунит” с питьевой водой ежедневно в концентрации 30 мг/кг в течение 30 дней. Диспергирование МУНТ в воде проводили с помощью ультразвуковой обработки на погружном

процессоре. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира, кусочки желудка и толстой кишки фиксировали для световой и электронной микроскопии.

Гистологическое исследование органов ЖКТ мыши проводили по стандартной методике. Образцы желудка и толстого кишечника фиксировали в смеси Буэна. Далее материал проводили по спиртам восходящей концентрации и толуолам. После обезвоживания образцы заключали в парафин. С парафиновых блоков получали срезы толщиной 4 мкм, которые монтировали на предметные стекла. Депарафинизацию срезов проводили в толуоле и понижающейся концентрации спиртов до воды. Далее срезы окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам. Полученные препараты исследовали с помощью микроскопа Leica DM1000 (“Leica”, Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Структуру МУНТ анализировали методом ТЭМ. Для этого суспензию наночастиц наносили на медные сеточки, покрытые формваровой пленкой, и высушивали при комнатной температуре. Поиск наночастиц и их детекцию проводили согласно рекомендациям Роспотребнадзора [19]. Кусочки органов фиксировали раствором глutarового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере с концентрацией 2.5% (“Ted Pella, INC”, США) в течение 2 ч. Далее образцы отмывали от фиксатора и дофиксировали буферным раствором тетраоксида осмия (OsO_4) с концентрацией 1% в течение 2 ч при 4°C. Обезвоживание образцов проводили в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, после чего заключали в эпоксидную смолу. Срезы с полученных блоков получали на ультрамикротоме LEICA UCT 4 (“Leica”, Германия) и окрашивали по Рейнольдсу [20]. Полученные препараты анализировали на микроскопе JEM 2100 (“Jeol”, Япония).

Для идентификации наноматериала в клетках и органах предварительно исследовали порошок МУНТ “Таунит” методом дифракции электронов для получения электронограмм нанотрубок. Последние содержат набор светящихся точек (рефлексов), в случае МУНТ формирующих четыре четких кольца. Сравнение электронограмм проводили, совмещая электронограммы исследуемых наночастиц с эталонной в программе Adobe Photoshop. Основным критерием идентификации МУНТ являлось полное совпадение дифракционных колец с эталонной электронограммой.

Детекция МУНТ в органах ЖКТ. Для выявления крупных оптически-плотных скоплений наночастиц исследовали гистологический материал фундального отдела желудка и дистальных отделов ободочной кишки. Для каждого экспериментального животного было получено шесть срезов с каждого образца (площадью 1 см²) и исследова-

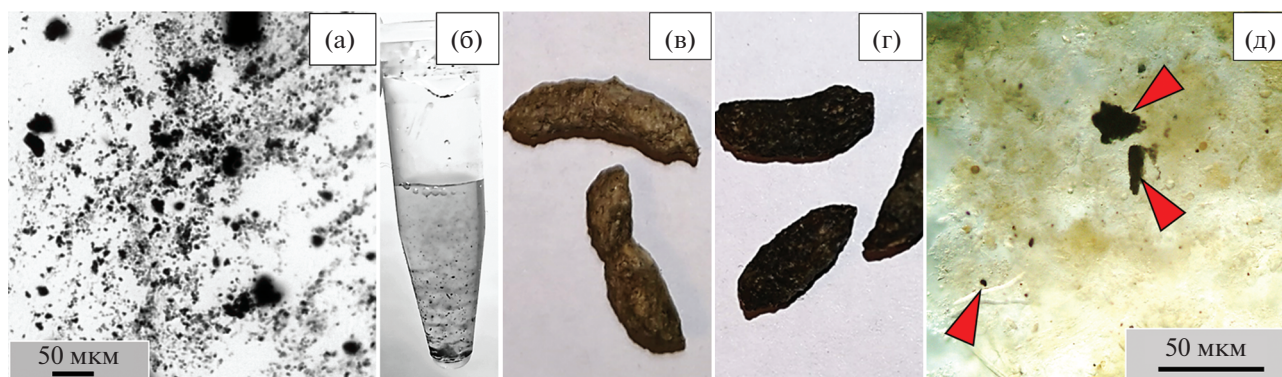


Рис. 1. МУНТ в фекалиях мыши: а — микрофотография порошка МУНТ на предметном стекле, б — водная суспензия МУНТ после обработки ультразвуком, в — фекалии контрольной группы животных, г — фекалии мышей, получавших МУНТ с питьевой водой, д — темные включения на мазках экскрементов мыши (обозначены стрелками).

но 100% площади срезов. Детекцию и идентификацию наночастиц проводили на ультратонких срезах (площадью 0.039–0.08 мм²). Делали 12 серийных срезов с двух блоков. Исследование включало в себя поиск электронно-плотных включений, получение с них электронограмм и сравнение их с эталонной электронограммой.

Анализ МУНТ из экскрементов мышей. В ходе эксперимента экскременты мышей собирали в конце каждой недели. Полученные образцы помещали в пробирку объемом 15 мл и попеременно диспергировали на вортексе в дистиллированной воде или этаноле, после чего осаждали на центрифуге (12000 об./мин) и удаляли супернатант с несевшими компонентами. Процедуру отмывки повторяли 20 раз. Далее из полученного осадка делали мазки на предметных стеклах и исследовали под световым микроскопом. Обнаруженные темные включения с помощью иглы от инсулинового шприца переносили в микропробирки с дистиллированной водой. После получения осадка образец диспергировали ультразвуком и нагревали в термостате до 85°C в течение 30 мин для разрушения органических примесей. Затем взвесь осаждали на центрифуге и удаляли супернатант. Полученный в результате очистки осадок анализировали с помощью стандартной и аналитической электронной микроскопии, а также спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР).

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Наноматериал исследовали методом СКР, используя конфокальный микроскоп inVia InSpect (“Renishaw”, Великобритания). Регистрируемые спектры охватывали диапазон от 0 до 3000 см⁻¹ (дифракционная решетка с 1200 линиями на мм). Для измерений использовали объективы с пятидесятикратным увеличением, лазер с длиной волны 532 нм; интенсивность составляла 1% от максимальной (0.7 мВт). Образцы наносили на алюминиевую фольгу. В каждом образце анализировали

20 случайных конгломератов МУНТ; время набора спектра составляло 150 с для каждой точки. Далее измеряли высоту пиков *D* и *G* и определяли соотношение I_D/I_G . Для сравнения независимых выборок использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ультраструктура МУНТ после прохождения полного пищеварительного цикла мыши. Используемый в работе наноматериал “Таунит” представляет собой черный порошок, содержащий кластеры диаметром от 0.1 до 50 мкм (рис. 1а). В питьевой воде МУНТ агрегируют, образуя конгломераты (рис. 1б). Экскременты животных контрольной группы имели светлый бежевый цвет (рис. 1в), в то время как для экспериментальных животных характерны фекалии черного цвета (рис. 1г). На мазках, полученных с фекалий, отчетливо видны темные включения, идентичные по внешнему виду кластерам МУНТ (рис. 1д).

Морфометрический анализ показал, что для контрольных МУНТ наружный диаметр равен 46 ± 15 нм, а внутренний — 9 ± 4 нм, толщина стенки составляет 18 ± 7 нм. Ультраструктурное исследование выделенных из фекалий кластеров выявило разные варианты МУНТ, отличающихся от контроля (рис. 2а):

- МУНТ с множественными перфорациями в стенках: нанотрубки имеют неоднородную электронную плотность и в них не выявляется внутренний канал (рис. 2б);

- МУНТ с истонченными стенками: имеют толщину 10–15 нм и длину до 300 нм (рис. 2в);

- кластеры, состоящие из коротких (<100 нм) и тонких (<20 нм) трубчатых фрагментов (рис. 2г).

Таким образом, прохождение полного пищеварительного цикла мыши вызывает перфорирование стенок МУНТ и их выраженное истончение. Представленная на рис. 2д электронограмма

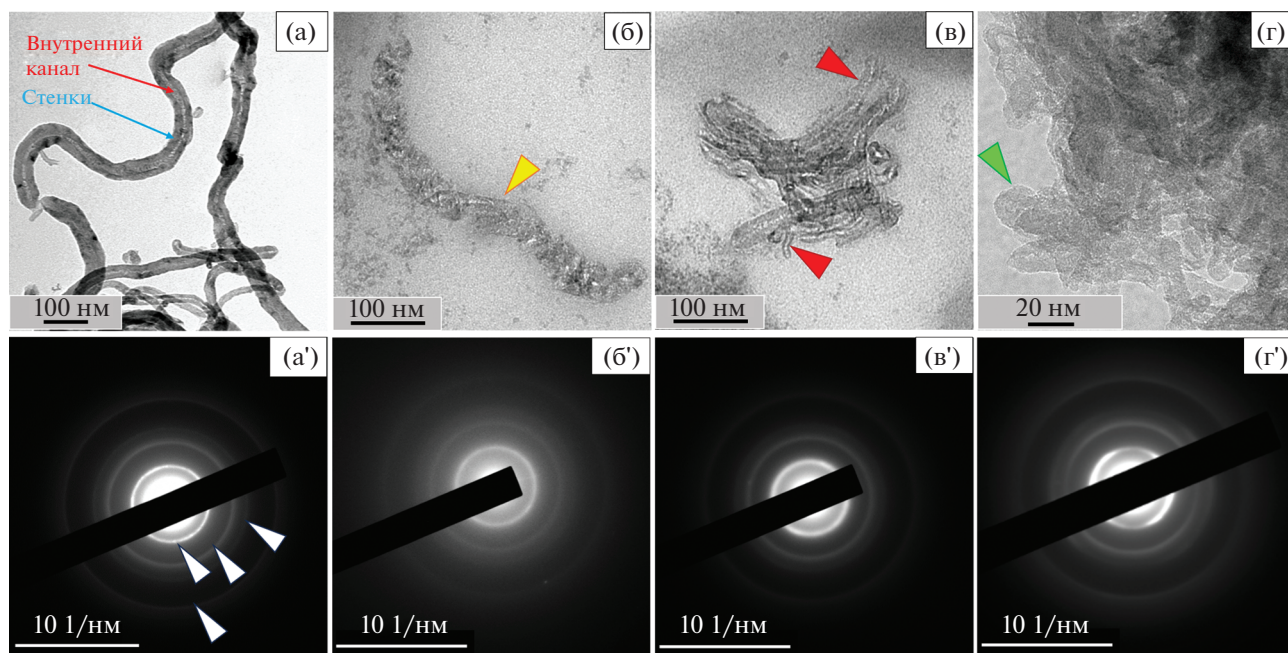


Рис. 2. Деградация МУНТ в ЖКТ мыши: ТЭМ-изображения контрольных МУНТ (а), МУНТ с множественными перфорациями стенок (обозначено стрелкой) (б), кластера истонченных МУНТ (показано стрелкой) (в), кластера (г), состоящего из мелких фрагментов МУНТ (показаны стрелками) и соответствующие электронограммы (а'–г').

является эталонной для МУНТ “Таунит”. Анализ методом дифракции электронов показал, что независимо от степени повреждений МУНТ их электронограммы не отличаются от эталонной (рис. 2е–2з). Это подтверждает, что выявляемые наночастицы являются измененными МУНТ.

Оценка изменения плотности дефектов МУНТ под действием активных веществ ЖКТ. Образцы МУНТ, полученные из экскрементов, а также нанотрубки после их инкубации с соляной кислотой или желудочным соком *in vitro* исследовали методом СКР для оценки изменения плотности дефектов. Как правило, спектр комбинационного рассеяния МУНТ имеет два основных пика: *G*-пик характерен для МУНТ и соответствует углероду в sp^2 -гибридации. *D*-пик показывает наличие атомов углерода в sp^3 -гибридации, что является структурным дефектом [21].

При разных экспериментальных условиях выявлено статистически значимое снижение соотношения интенсивностей *D*- и *G*-пиков (I_D/I_G). При обработке МУНТ соляной кислотой снижение I_D/I_G происходит в 1.06 раза, при воздействии желудочным соком — в 1.17 раза, при полном прохождении ЖКТ мыши — в 1.25 раза (рис. 3).

Полученные результаты демонстрируют снижение содержания дефектов в образцах экспериментальных МУНТ по сравнению с контролем и свидетельствуют о процессе разрушения слоев графена в МУНТ.

Анализ накопления МУНТ в разных отделах ЖКТ мыши. В [22] было показано, что длительное пероральное введение МУНТ вызывает локальные некротические изменения в тонком кишечнике мыши и приводит к смешанной паренхиматозной дистрофии печени. Выбор желудка и ободочной кишки (толстой кишки) для дальнейшего анализа обусловлен тем, что желудок является отделом ЖКТ, где твердые частицы подвергаются воздействию соляной кислоты и ферментов [23]. В ободочной кишке происходит активное всасывание различных веществ. Также этот отдел ЖКТ богат микрофлорой [23], которая может оказывать воздействие на наноматериал.

Анализ накопления МУНТ в слизистой оболочке желудка. На светооптическом уровне слизистая оболочка желудка животных экспериментальной группы представлена слоем выстилающего эпителия, фундальными железами и собственной пластинкой слизистой, в которых не выявляются темные включения и не найдены отличия от контроля (рис. 4а, 4д).

Электронно-микроскопический анализ клеток слизистой оболочки желудка экспериментальных животных показал, что клетки имеют ультраструктуру, аналогичную контрольным клеткам: микроворсинки эпителия не изменены (рис. 4б, 4е); целостность энтероцитарного слоя не нарушена, и он содержит плотные контакты, пояски адгезии и десмосомы, межклеточное пространство не расширено (рис. 4в, 4ж). Электрон-

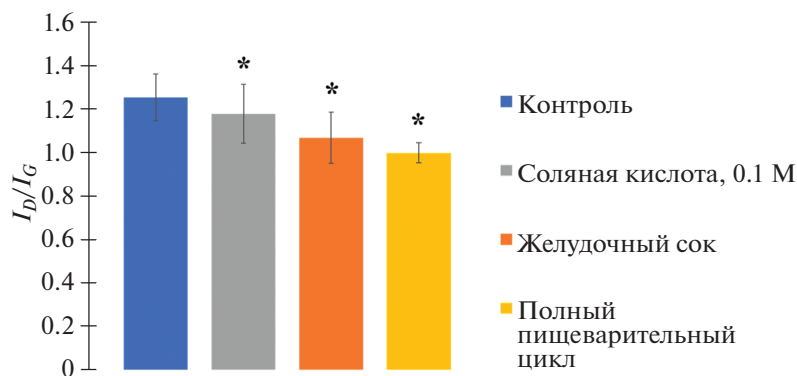


Рис. 3. Отношение I_D/I_G для контрольных МУНТ, МУНТ после инкубации с соляной кислотой, желудочным соком мыши, а также прохождения полного пищеварительного цикла. Данные показаны как средние значения со стандартным отклонением. Звездочками показана статистически значимая разница между образцами (t -критерий Стьюдента), $p < 0.05$.

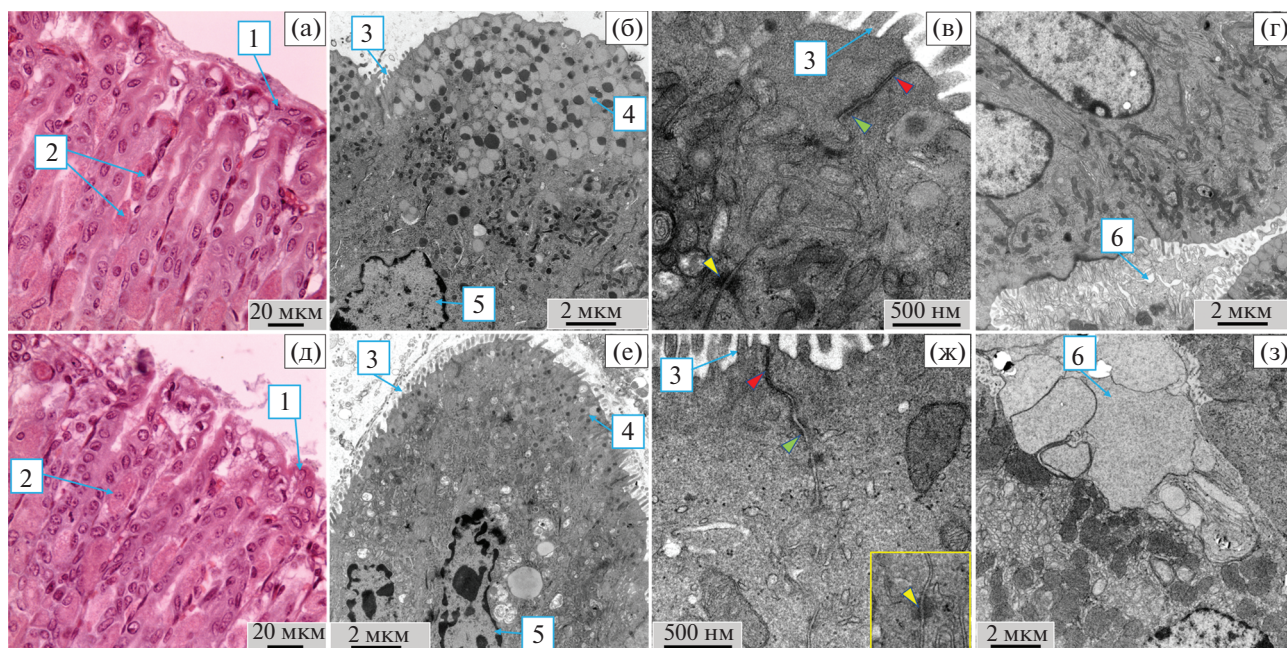


Рис. 4. Слизистая оболочка желудка. Верхний ряд – контрольный образец, нижний – клетки эпителия желудка мыши после длительного перорального введения МУНТ с питьевой водой: а, д – общий вид слизистой оболочки, полученный с помощью световой микроскопии и окрашивания гематоксилином и эозином, б, е – ТЭМ-изображения ультраструктуры эпителия желудка, в, ж – ТЭМ-изображения области клеточных контактов соседних клеток (белыми стрелками показаны плотные контакты, черными – пояски адгезии, штрихованными – десмосомы), г, з – ТЭМ-изображения дна фундальных желез; 1 – выстилающий эпителий, 2 – париетальные клетки, 3 – микроворсинки, 4 – секреторные гранулы, 5 – ядро, 6 – дно желез.

но-плотные скопления наночастиц не выявляются ни в клетках, ни в межклеточном пространстве. Протоки желез также не содержат отдельных наночастиц или их скоплений (рис. 4г, 4з).

В просвете желудка обнаружены скопления электронно-плотных частиц размером 50–100 нм, не имеющих признаков УНТ – вытянутой формы и внутреннего канала (рис. 5а). Также выявлены наночастицы, морфологически схожие с МУНТ.

Такие наночастицы имеют трубчатую форму, их диаметр составляет ~50 нм (рис. 5б). Полученные электронограммы этих наночастиц показали, что они не имеют кристаллической структуры (рис. 5в, 5г).

Анализ накопления МУНТ в слизистой оболочке толстой кишки. На светооптическом уровне слизистая оболочка ободочной кишки контрольной и экспериментальной групп животных представ-

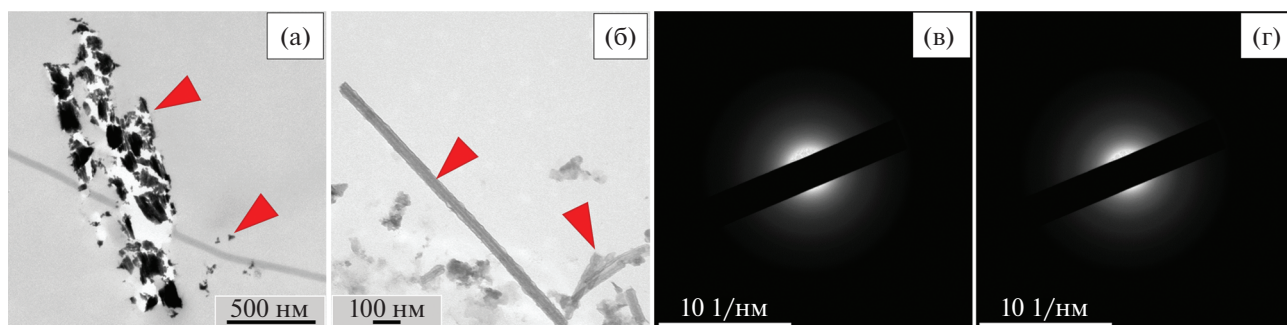


Рис. 5. ТЭМ-изображения электронно-плотных частиц в просвете желудка после длительного перорального введения МУНТ: а – крупный кластер (показано стрелками), б – наночастицы трубчатой формы (показано стрелками), в, г – соответствующие электронограммы.

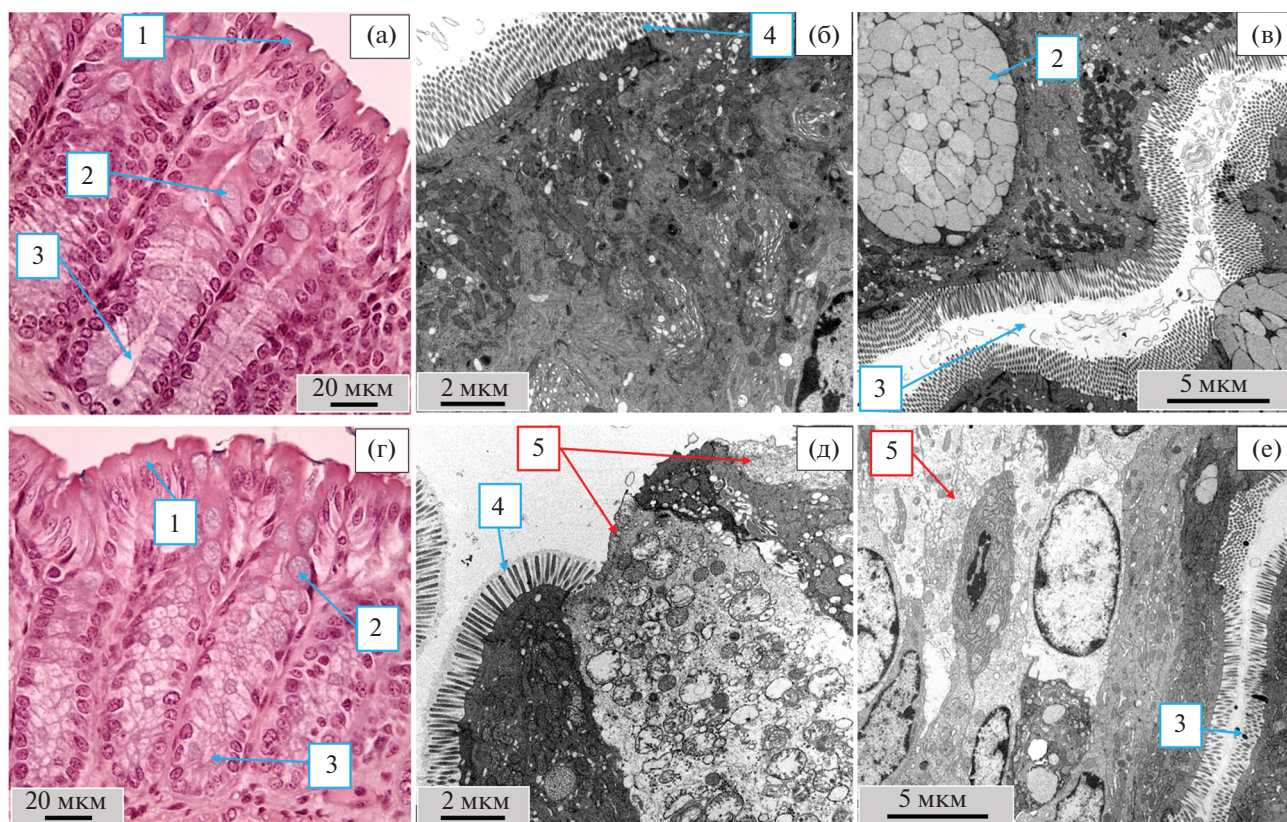


Рис. 6. Слизистая оболочка ободочной кишки мыши. Верхний ряд – контроль, нижний – клетки эпителия ободочной кишки мыши после длительного перорального введения МУНТ с питьевой водой: а, г – общий вид слизистой оболочки, полученный методом световой микроскопии с окрашиванием гематоксилином и эозином, б, в – ТЭМ-изображения ультраструктуры наружного эпителия, д, е – ТЭМ-изображения просвета крипты. Красным показаны области некрозов: 1 – выстилающий эпителий, 2 – бокаловидные клетки, 3 – просвет крипты, 4 – микроворсинки, 5 – области некрозов.

лена слоем выстилающего эпителия и криптами с большим количеством бокаловидных клеток (рис. 6а, 6г). Энтероциты покрыты микроворсинками со слоем гликокаликса, формирующими щеточную каемку. Темные включения в ткани отсутствуют.

Полученные методом ТЭМ изображения демонстрируют, что энтероциты толстого кишечника представляют собой поляризованные клетки с микроворсинками, вытянутым ядром, хорошо развитым аппаратом Гольджи и гранулярным эндоплазматическим ретикулом (рис. 6б).

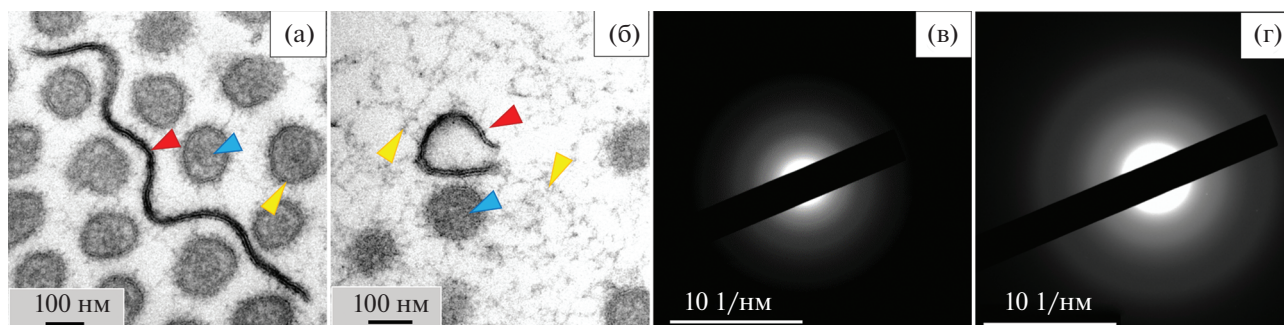


Рис. 7. ТЭМ-изображения электронно-плотных частиц в ЖКТ после длительного перорального введения МУНТ: а, б — наночастицы вытянутой формы в области ворсинок толстого кишечника, в, г — соответствующие электронограммы. Черными стрелками показаны наночастицы, штрихованными — микроворсинки, белыми — гликокаликс.

В области крипт располагаются клетки со щеточной каемкой, а также бокаловидные клетки (рис. 6в). При экспериментальном воздействии на ультраструктурном уровне были обнаружены отдельные клетки с признаками некроза — набуханием органелл, просветлением цитоплазмы и отсутствием микроворсинок (рис. 6д, 6е). Подобные изменения носили локальный характер, но встречались во всех исследованных образцах. Электронно-плотные включения МУНТ в некротических клетках выявлены не были.

В области щеточной каемки энтероцитов были детектированы отдельные электронно-плотные частицы, расположенные между микроворсинками и на гликокаликсе. Данные частицы имели извилистую форму и диаметр ~ 10 – 15 нм (рис. 7а, 7б). Электронограммы этих наночастиц показали, что они не имеют колец (кристаллическую структуру), и их нельзя отнести к УНТ (рис. 7в, 7г).

Таким образом, в работе не выявлено скопления МУНТ в клетках слизистой оболочки желудка и толстого кишечника. Несмотря на морфологическое сходство с МУНТ обнаруженных в просвете желудка электронно-плотных частиц, экспериментально доказано, что они не являются исходным наноматериалом.

ОБСУЖДЕНИЕ

ЖКТ представляет собой селективный слизистый барьер, который имеет значительную площадь поверхности для потенциального взаимодействия с попавшими в него с пищей или водой наночастицами [24]. В рамках проведенного эксперимента МУНТ после длительного перорального введения не выявляются в слизистых оболочках желудка и толстой кишки мышей. Это демонстрирует, что эпителиальные слои слизистой оболочки желудка и толстой кишки являются непроницаемыми для самих МУНТ, их агрегатов или крупных фрагментов. Вероятно, использование меньших концентраций МУНТ в питьевой

воде привело бы к сохранению большего количества не агрегированных нанотрубок и их коротких фрагментов, проникновение которых в клетки эпителия проходило более интенсивно. При этом в [25] показано, что после перорального введения МУНТ мышам в течение шести дней нанотрубки на гистологических срезах разных отделов ЖКТ (желудка и двенадцатиперстной кишки) выявляются в виде крупных конгломератов вдоль базальной мембраны под слоем эпителия. В отличие от данного исследования в [25] использовались очень высокие концентрации наноматериала (500 мг/кг).

Наночастицы золота и диоксида титана, размер которых составляет не более 10 нм, могут проходить через эпителиальные барьеры тонкой и толстой кишки [26, 27], попадать в кровь [28] и накапливаться в печени [29]. Не можем исключить, что самые мелкие фрагменты МУНТ также проходят через эпителий, попадают в кровь и далее в печень — об этом свидетельствуют данные о развитии дистрофии печени в экспериментах аналогичного дизайна [22, 30].

Выявленные локальные некротические изменения в эпителии толстой кишки, вероятно, могут быть связаны с повреждающим эффектом острых концов МУНТ: малый диаметр нефункционализированных МУНТ в сочетании с их высокой кристаллическостью приводит к образованию жестких игольчатых структур, аналогично асбесту вызывающих прямое повреждение мезотелиальных клеток и создающих риск развития мезотелиомы [31].

Полный пищеварительный цикл у мышей длится от 3 до 24 ч [32], а его желудочная фаза — от 1 до 6 ч [33]. Примечательно, что МУНТ могут способствовать увеличению активности пищеварительных процессов в желудке, запуская избыточную выработку компонентов желудочного сока, в том числе соляной кислоты [34]. В проведенном ранее эксперименте *in vitro* МУНТ подвергались частичному разрушению в присут-

ствии 0.1 М соляной кислоты или желудочного сока мыши. Эффект для обоих типов воздействия был схожим — в стенках нанотрубок появлялись многочисленные бреши (перфорации) и не выявлялся внутренний канал [16]. Исчезновение последнего может быть связано с тем, что внутреннее пространство МУНТ забивается продуктами биodeградации с эквивалентной перфорированным стенкам электронной плотностью. Аналогичные изменения видны и в МУНТ, выделенных из экскрементов.

МУНТ “Таунит”, будучи промышленным наноматериалом, является изначально высоко дефектным и гетерогенным [17]. Вероятно, появление брешей отражает один из ранних этапов деградации МУНТ: дефектные участки графена в результате агрессивного воздействия кислой среды повреждаются в первую очередь, что и приводит к появлению дыр в стенках МУНТ. Полностью разрушенные сайты дефектов перестают вносить вклад в спектр комбинационного рассеяния, что приводит к снижению I_D/I_G . При этом соляная кислота желудка не является единственным фактором, обуславливающим деградацию МУНТ в ЖКТ. Более выраженные изменения плотности дефектов наноматериала под действием желудочного сока, выявленные методом СКР, могут быть объяснены наличием пищеварительных ферментов, усиливающих действие соляной кислоты. Таким образом, уже в желудке происходят ранние этапы деградации МУНТ, которые выражаются в образовании брешей в их стенках. Дальнейшее разрушение промышленных МУНТ происходит уже в кишечнике под действием бактериальной микрофлоры: об этом свидетельствуют истончение нанотрубок и дальнейшее снижение значений I_D/I_G .

Разнообразие бактериальной микрофлоры кишечника мыши включает в себя около 100 различных штаммов, представляющих 76 различных видов из 26 семейств, принадлежащих к типам *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia* [35], но в настоящее время нет данных о непосредственном влиянии микробиоты мыши на МУНТ. Ранее была продемонстрирована способность некоторых почвенных бактерий частично разлагать МУНТ до углекислого газа, этот процесс требует кооперации нескольких типов микроорганизмов [36]. Также деградация МУНТ может идти в результате генерации бактериями АФК и запуска реакции Фентона [37]. Почвенные бактерии способны окислять графит, оксид графена и восстановленный оксид графена [38]. При этом оксид графена становится перфорированным и распадается на мелкие фрагменты, тогда как восстановленный оксид графена демонстрирует более интенсивное разрушение по сравнению с графитом за счет большего количе-

ства исходных дефектов. Из этого можно заключить, что структуры графена, приобретающие дефекты в виде кислородсодержащих функциональных групп, являются более уязвимыми к биodeградации в виде появления брешей. В 2020 г. в [39] на водных ракообразных методом СКР также были выявлены химические изменения МУНТ после нахождения их в кишечнике *Gammarus suifunensis*. Таким образом, полученные результаты и опубликованные данные позволяют предположить, что представители бактериальной микрофлоры ЖКТ мыши могут обладать ферментативной активностью, позволяющей разрушать графеновые цилиндры МУНТ и вызывать появление перфораций и истончение МУНТ.

В итоге при прохождении полного пищеварительного цикла мыши МУНТ распадается на отдельные мелкие фрагменты, сохраняя часть своей кристаллической структуры, что позволяет их идентифицировать. Таким образом, деградацию МУНТ в ЖКТ мыши можно разделить на два условных этапа: появление брешей в стенках МУНТ в ходе пищеварения в желудке на первом этапе и их дальнейшее истончение, а затем и распад нанотрубок на фрагменты, происходящие, по-видимому, под действием бактериальной микрофлоры кишечника. Ранее истончение стенок промышленных МУНТ было продемонстрировано при действии гипохлорита натрия [17]. Возможно, продукты жизнедеятельности микробиоты кишечника оказывают схожее окислительное воздействие на МУНТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При пероральном введении промышленных МУНТ в организм мыши эпителий ЖКТ играет роль эффективного барьера и препятствует попаданию МУНТ в клетки. Впервые показано, что при прохождении пищеварительного цикла МУНТ подвергаются деградации, истончаясь и распадаясь до мелких фрагментов. Таким образом, защитные функции организма млекопитающих позволяют осуществлять разрушение МУНТ под воздействием биологически-активных веществ ЖКТ. Это особенно актуально на фоне растущих объемов их производства, имеющих перспектив их использования в сельском хозяйстве и, как следствие, попадания в пищевые цепи млекопитающих, в том числе человека. Дополнительного изучения требует вопрос влияния продуктов биodeградации УНТ на живые организмы и индуцируемые ими патологические изменения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам межфедеральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за содействие в выполнении электронно-микроскопических исследова-

ний, а также О.В. Макаровой за помощь в проведении анализа гистологических препаратов.

Работа выполнена в рамках Соглашения о научном сотрудничестве № 1-2022 между МГУ им. М.В. Ломоносова и ЦНИИ туберкулеза. Исследования методом ТЭМ проведены с использованием оборудования ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nanotubes Database. <https://www.nanowerk.com/carbon-nanotubes-suppliers.php>. Accessed May 15, 2021.
2. Zhuzhukin K.V., Evtakov P.M., Grodetzskaya T.A. et al. // *Forests*. 2023. V. 14. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.3390/f14010163>
3. Hermes P.-H., Gabriela M.-P., Ileana V.-R. et al. // *Green Nanoparticles. Nanotechnology in the Life Sciences*. Eds. Patra J. Cham: Springer, 2020. P. 77.
4. Chen G., Qiu J., Liu Y. et al. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.1038/srep15682>
5. Jackson P., Jacobsen N.R., Baun A. et al. // *Chem. Cent. J.* 2013. V. 7. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-154>
6. Madannejad R., Shoaie N., Jahanpeyma F. et al. // *Chem. Biol. Interact.* 2019. V. 307. P. 206. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.04.036>
7. Donaldson K., Poland C.A., Murphy F.A. et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. V. 65. № 15. P. 2078. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.014>
8. Shipelin V.A., Shumakova A.A., Masyutin A.G. et al. // *Nanotechnologies in Russia*. 2017. V. 12. P. 559. <https://doi.org/10.1134/S199507801705010X>
9. Lin C.-P., Lin J.-Z., Shu C.-M., Tseng J.-M. // *J. Loss Prev. Process Ind.* 2012. V. 25. № 2. P. 302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jlp.2011.11.007>
10. Herb M., Schramm M. // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 2. P. 313. <https://doi.org/10.3390/antiox10020313>
11. Weiss S.J., Epstein F.H., Weiss S.J. // *N. Engl. J. Med.* 1989. V. 320. № 6. P. 365. <https://doi.org/10.1056/NEJM198902093200606>
12. Weiss S.J., Klein R., Slivka A., Wei M. // *J. Clin. Invest.* 1982. V. 70. № 3. P. 598. <https://doi.org/10.1172/JCI110652>
13. Engevik A.C., Kaji I., Goldenring J.R. // *Physiol. Rev.* 2020. V. 100. № 2. P. 573. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2019>
14. Landry M., Pinault M., Tchankouo S. et al. // *Part. Fibre Toxicol.* 2016. V. 13. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0175-z>
15. Vlasova I.I., Vakhrusheva T.V., Sokolov A.V. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012. V. 264. № 1. P. 131. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.027>
16. Masyutin A.G., Erokhina M.V., Sychevskaya K.A. et al. // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2015. V. 98. № 1. P. 012008. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012008>
17. Masyutin A.G., Bagrov D. V., Vlasova I.I. et al. // *Nanomaterials*. 2018. V. 8. № 9. P. 715. <https://doi.org/10.3390/nano8090715>
18. Masyutin A.G., Tarasova E.K., Onishchenko G.E., Erokhina M.V. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2023. V. 87. № 10. P. 1443. <https://doi.org/10.3103/S106287382370346X>
19. Кирпичников М.П., Онищенко Г.Е., Смирнова Е.А. и др. Порядок выявления и идентификации агрегатов многостенных углеродных нанотрубок в срезах тканей животных и растений методами аналитической электронной микроскопии: Методические рекомендации МР 1.2.0045-11. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. 46 с.
20. Reynolds E.S. // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. № 1. P. 208. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
21. Kuznetsov V.L., Bokova-Sirosh S.N., Moseenkov S.I. et al. // *Phys. Status Solidi*. 2014. V. 251. № 12. P. 2444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pssb.201451195>
22. Masyutin A.G., Erokhina M.V., Sychevskaya K.A. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 161. № 1. P. 125. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3361-y>
23. Hornbuckle W.E., Simpson K.W., Tennant B.C. // *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* / Eds. Kaneko J.J. et al. Amsterdam: Elsevier Science Ltd., 2008. P. 413.
24. Kararli T.T. // *Biopharm. Drug Dispos.* 1995. V. 16. № 5. P. 351. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510160502>
25. Golokhvast K.S., Chaika V.V., Kuznetsov L.V. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. V. 155. № 6. P. 788. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2253-7>
26. Onishchenko G.E., Erokhina M.V., Abramchuk S.S. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 154. № 2. P. 265. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1928-9>
27. Yao M., He L., McClements D.J., Xiao H. // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. № 36. P. 8044. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03242>
28. Coméra C., Cartier C., Gaultier E. et al. // *Part. Fibre Toxicol.* 2020. V. 17. № 1. P. 26. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00357-z>
29. Heringa M.B., Peters R.J.B., Bleys R.L.A.W. et al. // *Part. Fibre Toxicol.* 2018. V. 15. № 1. P. 15. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0251-7>
30. Беляева Н.Н., Вострикова М.В., Алексеева А.В. и др. // *Гигиена и санитария*. 2018. V. 97. № 11. P. 1108. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2018-97-11-1108-13>
31. Nagai H., Okazaki Y., Chew S.H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 49. P. E1330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110013108>

32. *Padmanabhan P., Grosse J., Asad A.B.M.A. et al.* // EJNMMI Res. 2013. V. 3. № 1. P. 60.
<https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-60>
33. *Schwarz R., Kaspar A., Seelig J., Künnecke B.* // Magn. Reson. Med. 2002. V. 48. № 2. P. 255.
<https://doi.org/10.1002/mrm.10207>
34. *Li Z., Qi W., Geng Y.X. et al.* // Nanoscale Res. Lett. 2010. V. 6. № 1. P. 63.
<https://doi.org/10.1007/s11671-010-9803-y>
35. *Lagkouravdos I., Pukall R., Abt B. et al.* // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. № 10. P. 16131.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.131>
36. *Zhang L., Petersen E.J., Habteselassie M.Y. et al.* // Environ. Pollut. 2013. V. 181. P. 335.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.058>
37. *Takahashi S., Hori K.* // Front. Microbiol. 2023. V. 14. P. 1298323.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1298323>
38. *Liu L., Zhu C., Fan M. et al.* // Nanoscale. 2015. V. 7. № 32. P. 13619.
<https://doi.org/10.1039/C5NR02502H>
39. *Chaika V., Pikula K., Vshivkova T. et al.* // Toxicol. Rep. 2020. V. 7. P. 947.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.011>