

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Масютин Александр Георгиевич

**Биодеградация промышленных многостенных углеродных
нанотрубок под действием активных веществ клеток
млекопитающих**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2022

Работа выполнена на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель	– Ерохина Мария Владиславовна доктор биологических наук
Официальные оппоненты	– Голохваст Кирилл Сергеевич, доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАО, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий» Российской академии наук
	Соловченко Алексей Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор кафедры бактериологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
	Золотова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

Защита диссертации состоится «17» мая 2022г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.09 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: _г. Москва, Ленинские горы д.1 стр.12, ауд. М-1.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/441860481/>

Автореферат разослан «___» _____ 2022г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.Н.Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Развитие нанотехнологий, создание искусственных наночастиц и их широкое применение остро поставили вопрос не только об их безопасности для окружающей среды, но и способности клеток живых организмов, в том числе млекопитающих и человека, осуществлять разрушение подобных частиц. В настоящее время, многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) являются одним из наиболее востребованных наноматериалов в разных областях промышленности [nanowerk.com], вследствие чего возрастают риски их попадания в организм человека. Уже известно, что МУНТ могут накапливаться в тканях растений и животных [Chen и др., 2015; Jackson и др., 2013], что создает угрозу контаминации ими пищевых цепей.

На сегодняшний день имеются данные, согласно которым введение углеродных наночастиц лабораторным животным через органы дыхания, кожу или желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) вызывает в клетках и тканях патологические изменения [Madannejad и др., 2019]. При этом, сведений об элиминации МУНТ в условиях организма недостаточно и знания в этой области являются фрагментарными, что ставит вопрос о дальнейшей разработке данной темы и оценке возможности выведения и разрушения МУНТ разными системами организма млекопитающих и человека.

Одной из важных характеристик МУНТ является их устойчивость к высоким температурам и химическим воздействиям [Lin и др., 2012]. 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 париетальные клетки желудка, способные выделять соляную кислоту и создавать среду с низкими значениями pH [Engevik, Kajii, Goldenring, 2020], а также специализированные клетки-фагоциты – нейтрофилы и макрофаги, генерирующие активные формы кислорода (АФК) [Herb, Schramm, 2021].

Одним из уже изученных путей элиминации МУНТ в организме млекопитающих является их внутриклеточное разрушение нейтрофилами или макрофагами в фаголизосомах [Yang, Zhang, 2019]. Этот механизм элиминации продемонстрирован для лабораторно-синтезированных МУНТ (л-МУНТ), которые отличаются от применяемых в промышленном производстве МУНТ (п-МУНТ) по своим физико-химическим характеристикам [Dubey и др., 2021]. При этом, именно п-МУНТ являются наиболее широко распространенным наноматериалом, с которым возможен контакт живых организмов, но биодеградация таких МУНТ не изучена. Мы предполагаем, что вследствие структурных особенностей п-МУНТ, пути и механизмы их разрушения фагоцитами будут отличаться от продемонстрированных для л-МУНТ. Для нейтрофилов и макрофагов показано, что эти клетки могут секретировать активные вещества в окружающую среду и таким образом уничтожать внеклеточные патогены. Мы предполагаем, что контакт макрофагов со

скоплениями наноматериала может вызвать запуск аналогичного механизма – продукции внеклеточных АФК, что в итоге приведёт к инициации процесса биодеградации МУНТ. Внеклеточная деградация МУНТ, в отличие от внутриклеточной, ранее не изучалась.

Таким образом, помимо уже выявленного пути деградации МУНТ в фаголизосомах макрофагов, могут существовать и другие пути разрушения МУНТ – внеклеточный, при генерации АФК фагоцитами, а также биодеградация под действием агрессивной среды желудка.

Это делает поиск и изучение таких путей актуальной и важной задачей, и будет свидетельствовать о возможности защитных систем организма осуществлять элиминацию искусственных наночастиц через активацию разных внутри- и внеклеточных вариантов воздействия.

Цель работы: проанализировать варианты деградации промышленных многостенных углеродных нанотрубок под действием активных веществ клеток млекопитающих в моделях *in vivo* и *in vitro*.

Задачи:

- 1) Охарактеризовать морфометрические, структурные и кристаллические свойства двух вариантов промышленных МУНТ («Таунит» и «Деалтом»).
- 2) Выбрать критерии оценки деградации МУНТ.
- 3) Оценить специфичность метода дифракции электронов для идентификации продуктов биодеградации МУНТ в биологических образцах;
- 4) Выявить МУНТ в ЖКТ мыши после их длительного (30 суток) перорального приема.
- 5) Проанализировать деградацию МУНТ под действием активных веществ пищеварительного тракта мыши в моделях *in vitro* и *in vivo*.
- 6) Сравнить деградацию МУНТ под действием вне- и внутриклеточных окислителей макрофагов;
- 7) Сравнить деградацию двух видов промышленных МУНТ под действием гипохлорита натрия.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования диссертационной работы являлись макрофагальные клетки линии THP-1, лабораторные мыши линии C57Bl/6×DBA/2 и промышленные наноматериалы на основе МУНТ - «Таунит» и «Деалтом». Предметом исследований являлось изучение способности макрофагов человека, а также органов ЖКТ мыши вызывать вне- и внутриклеточную биодеградацию промышленных МУНТ.

Научная новизна работы

Для данной работы ключевой является гипотеза, согласно которой, помимо уже известных путей биодеградации МУНТ внутри фаголизосом макрофагов, существуют другие механизмы их разрушения в организме. К таковым могут относиться как макрофагальное окислительное действие без интернализации наночастиц в клетке, так и повреждающее воздействие активных веществ ЖКТ. Особенности структуры п-МУНТ предположительно могут приводить к механизмам деградации, отличающимся от уже показанных для л-МУНТ.

Теоретическая и практическая значимость

Выявленные особенности деградации п-МУНТ расширяют фундаментальные представления о возможностях клеток и органов осуществлять элиминацию углеродных нанотрубок при их попадании в организм. В работе также установили факторы, способствующие более эффективному разрушению МУНТ биологическими окислителями. Результаты работы могут быть использованы для создания МУНТ со специфическими параметрами, облегчающими или затрудняющими их деградацию в организме, что дает дополнительные перспективы для их применения в медицине для адресной доставки лекарств, или в строительной отрасли для создания более безопасных нанокомпозитов.

Методология и методы исследования

Проведенные в ходе работы исследования основываются на современных методологических подходах. Набор применяемых методов обоснован предварительным анализом данных литературы, степенью разработанности данной темы и постановкой цели и задач исследования. Работа выполнена с применением методов клеточной биологии и гистологии, современных методов стандартной и аналитической трансмиссионной электронной микроскопии и химического анализа. Анализ полученных данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки.

Достоверность

Полученные в рамках диссертационной работы научные результаты обладают высокой степенью достоверности. Для того, чтобы сформировать первоначальные гипотезы, автором работы был проведён анализ научной литературы. Были проведены серии независимых экспериментов с повторами экспериментальных точек, а также использовано необходимое количество экспериментальных животных. Полученные в ходе работы данные подвергались статистическому анализу с использованием адекватных критериев, что позволило получить статистически значимые результаты.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Проведение комплексной характеристики физико-химических свойств промышленных МУНТ является необходимым условием для определения критериев их деградации.
- 2) Метод дифракции электронов позволяет идентифицировать МУНТ и продукты их биодеградации в биологических образцах.
- 3) МУНТ выявляются в ЖКТ мыши после длительного перорального приема.
- 4) МУНТ подвергаются деградации под действием активных веществ пищеварительной системы мыши.
- 5) Макрофаги способны осуществлять две стратегии разрушения МУНТ – внутриклеточную и внеклеточную.
- 6) Деградация двух видов промышленных МУНТ под действием гипохлорита натрия происходит сходными путями.

Публикации

По материалам работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 6 статей (из них 5 - в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в докторской совет МГУ имени М.В. Ломоносова) и 6 публикаций в сборниках тезисов.

Личный вклад автора в проведение исследования

Автору докторской диссертации принадлежит основная роль в формулировке целей и задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, а также подготовке публикаций и тезисов. Со степенью личного вклада соискателя в опубликованные работы можно ознакомиться в разделе «Список опубликованных работ по теме докторской диссертации; Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в докторской совет МГУ имени М.В. Ломоносова», стр. 22.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на 6 научных международных и всероссийских конференциях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

1. Используемые в работе углеродные наночастицы

В работе использовали два образца МУНТ - «Таунит» (ООО «НаноТехЦентр», Тамбов, Россия) и «Деалтом» (ООО «НПП «Центр нанотехнологий», Москва, Россия), а также другие углеродные наночастицы (УНЧ) - фуллерен C₆₀ (ЗАО «Фуллерен-центр», Нижний Новгород, Россия), алмаз (НП ЗАО “Синта”, Минск, Беларусь) и одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ) (ООО «Углерод-ЧГ», Черноголовка, Россия).

2. Гистологическое исследование органов ЖКТ мыши

Для гистологического исследования образцы тканей желудка, тонкого и толстого кишечника и печени фиксировали в смеси Буэна и заключали в парафин. С парафиновых блоков получали срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Для полутонких срезов использовали материал, подготовленный для электронной микроскопии. Срезы толщиной 1 мкм окрашивали 1% водным раствором метилового синего и 1% водным раствором тетраборнокислого натрия. Гистологические препараты анализировали на световом микроскопе Leica DM1000 (Leica, Германия).

3. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Пробоподготовку проводили по стандартной методике. Срезы с полученных блоков получали на ультрамикротоме LEICA UCT 4 (Leica, Германия) и окрашивали по Рейнольдсу [Reynolds, 1963]. Полученные препараты анализировали на микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония).

4. Аналитическая ТЭМ

Дифракция электронов

Полученные срезы клеток и тканей, а также выделенных наночастиц, исследовали с помощью аналитического электронного микроскопа «JEM 2100» (Jeol, Япония) (200 kV, non-corrected, LaB₆ cathode). Использовали камеру Gatan FT1000 2k (Gatan, Pleasanton, CA, USA). Глубина камеры составляла 20 см.

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС)

ЭДС выполняли с помощью детектора (Oxford Instruments Inca X-Max 8 mm²; Абингдон, Оксфордшир, Великобритания), соединенного с вакуумной камерой трансмиссионного электронного микроскопа (JEM 2100, JEOL, Токио, Япония) с программным обеспечением Inca (Oxford Instruments, Абингдон, Оксфордшир, Великобритания).

5. Рамановская спектроскопия

Исследования образцов МУНТ после инкубации с гипохлоритом натрия (NaClO), проводили на конфокальном рамановском микроскопе NTEGRA Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия). Регистрируемые спектры охватывали диапазон от 600 до 3000 см⁻¹ (дифракционная решетка с 600 линиями на мм). Для измерений использовался лазер с длиной волны 532 нм; интенсивность была доведена до 2 мВт. Для других экспериментов использовали конфокальный рамановский микроскоп inVia InSpect (Renishaw, Великобритания). Регистрируемые спектры охватывали диапазон от 0 до 3000 см⁻¹ (дифракционная решетка с 1200 линиями на мм), лазер с длиной волны 532 нм; интенсивность 0,7 мВт.

6. Морфометрический анализ МУНТ

С помощью аналитических ресурсов программы ImageProPlus (Media Cybernetics, США) на фотографиях контрольных и экспериментальных МУНТ производили замеры внешнего и внутреннего диаметров по максимально возможной длине каждой нанотрубки (n=200), после чего использовали средние значения. Расчёты производили в программе STATISTICA 10, для оценки статистической значимости использовали t-критерий Стьюдента.

7. Культивирование клеток линии THP-1

THP-1 – моноцитоподобная клеточная линия, полученная из периферической крови человека с острой моноцитарной лейкемией человека (Российская коллекция клеточных культур, Санкт-Петербург, НИИ Цитологии). Макрофагальную дифференцировку клеток культуры THP-1 ($0,5 \times 10^6$ кл/мл) индуцировали добавлением форболового эфира (PMA) (Sigma, США) в концентрации 1×10^{-7} М.

8. Апробация методов детекции МУНТ в биологических образцах

Навески наночастиц фуллерена C₆₀ (50 мкг/мл), наночастиц алмаза (50 мкг/мл) и МУНТ «Таунит» (250 мкг/мл) вносили к клеткам на 3-и сутки после индукции макрофагальной дифференцировки. После инкубации образцы подвергали пробоподготовке для ТЭМ. Для детекции МУНТ «Таунит» в тканях животных, наночастицы вводили мышам линии C57Bl/6×DBA/2 (получены из

виварно-экспериментального комплекса ООО «НИИ Митоинженерии МГУ») внутрибрюшинно. Через 4 часа после инъекции, животных эвтаназировали, кусочки брыжейки фиксировали для электронной микроскопии.

Срезы исследовали на аналитическом электронном микроскопе JEM-2100. Полученные для УНЧ электронограммы сравнивали, совмещая их изображения с полученной для МУНТ эталонной электронограммой в графическом редакторе Adobe Photoshop (Adobe, Inc., США). На совмещенных изображениях оценивали совпадение дифракционных колец или отдельных рефлексов с кольцами эталонной электронограммы.

9. Эксперименты по исследованию биодеградации МУНТ в органах ЖКТ мыши

Пероральное введение суспензии МУНТ мышам

Работу по детекции МУНТ в органах ЖКТ проводили на самцах мышей ($n=32$) линии C57Bl/6 \times DBA/2 (ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»). Животные были разделены на две равные группы случайным образом: контрольная группа животных получала стандартный рацион, экспериментальную группу составили животные, получавшие МУНТ «Таунит» ежедневно с питьевой водой (30 мг/кг) в течение 30 дней. Затем животных эвтаназировали, кусочки желудка, тонкой и толстой кишки, а также печени, фиксировали для световой и электронной микроскопии.

Детекция МУНТ в органах ЖКТ

Для поиска крупных скоплений наночастиц, исследовали гистологический материал фундального отдела желудка, а также дистальных отделов подвздошной и ободочной кишки, и печени. Детекцию наночастиц проводили на ультратонких срезах. Исследование включало в себя поиск электронно-плотных включений, получение их электронограмм и сравнение с эталонной для МУНТ.

Анализ изменений МУНТ под действием активных веществ ЖКТ мыши

Для оценки изменений МУНТ под действием активных веществ ЖКТ мыши, исследовали нанотрубки, выделенные из экскрементов мыши, а также МУНТ, проинкубированные в микропробирках с 0,1 М HCl, и выделенным желудочным соком мыши при 38°C в течение 24 часов. Полученные образцы исследовали с помощью аналитической электронной микроскопии и рамановской спектроскопии.

10. Эксперименты по исследованию биодеградации МУНТ макрофагами

Световая микроскопия

Для получения изображений клеточной культуры использовали DIC микроскоп Leica, объектив x40, апертура 0,5 HI plan.

Оценка выживаемости клеток

На третий сутки после индукции макрофагальной дифференцировки производили замену культуральной среды и добавляли суспензию МУНТ (250 мкг/мл). Оценку выживаемости производили на 1, 3, 5, 7 и 10 сутки инкубации. 10 мкл окрашенной трипановым синим суспензии помещали в камеру для подсчёта клеток в автоматическом счётчике TC20 (Biorad, США). На каждой точке было произведено 8 измерений.

Исследование вне- и внутриклеточной деградации МУНТ

Для выявления морфометрических и химических изменений МУНТ после их инкубации с макрофагами были проанализированы: 1) ультраструктура клеток с поглощёнными МУНТ; 2) МУНТ, выделенные из клеточного лизата и в внеклеточной среды; 3) МУНТ после инкубации с перекисью водорода и гипохлоритом натрия.

Инкубация МУНТ «Таунит» с перекисью водорода и гипохлоритом натрия

К суспензии МУНТ «Таунит» (500 мкг/мл) в дистиллированной воде добавляли микроаликвоты реагентов один раз в день в течение 10 суток. Концентрации реагентов: 1 mM H₂O₂ и 20 мкМ Fe²⁺ (Merck, Германия), 1 mM NaOCl (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Инкубация МУНТ «Таунит» и «Деалтом» с гипохлоритом натрия (100 мМ)

К суспензиям МУНТ «Таунит» и «Деалтом» (500 мкг/мл) в дистиллированной воде добавляли микроаликвоты NaOCl (100 мМ) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) один раз в день в течение 10 суток.

11. Статистический анализ

Экспериментальные данные отображены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD). Т-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни, а также дисперсионный анализ ANOVA с использованием критерия Тьюки-Крамера были выполнены в программе STATISTICA 10 (TIBCO Software Inc, США).

Результаты и обсуждение

1. Характеристика морфометрических, структурных и кристаллических свойств промышленных МУНТ «Таунит»

Используемый в работе наноматериал «Таунит» представляет собой черный порошок, в котором выявляются кластеры различного размера. Изображения, полученные с помощью ТЭМ, показали, что МУНТ имеют различную толщину. Внутри нанотрубок отчетливо просматривается узкий внутренний канал (Рис. 1).

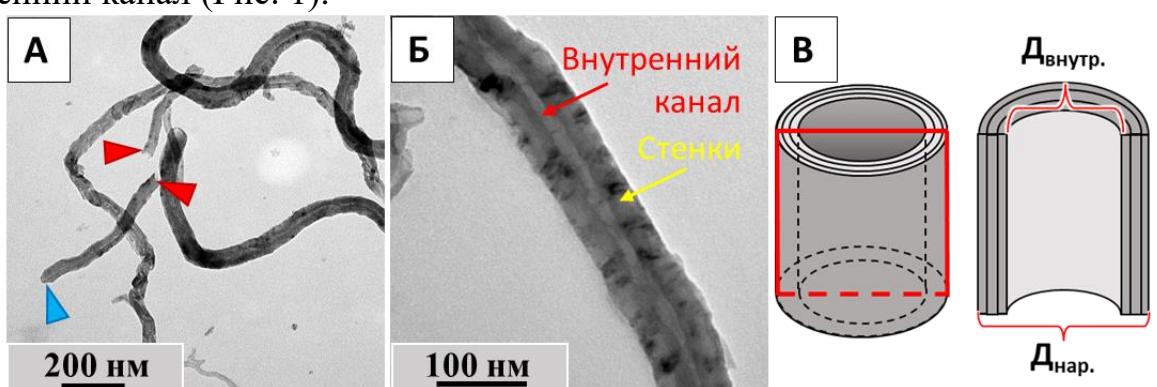


Рисунок. 1. Строение МУНТ «Таунит». А – одиночные МУНТ. Красными стрелками показаны обломанные открытые концы, синей стрелкой – закругленный кэп. Б – увеличенный фрагмент нанотрубки. ТЭМ, В – схема строения МУНТ.

Морфометрический анализ показал, что для контрольных МУНТ наружный диаметр ($D_{нар.}$) равен 46 ± 15 нм, а внутренний ($D_{внутр.}$) – 9 ± 4 нм.

В целях дальнейшей идентификации наноматериала в клетках и органах, методом дифракции электронов для МУНТ «Таунит» была получена эталонная электронограмма. Последняя содержит набор светящихся точек (рефлексов), формирующих четыре чётких кольца (Рис. 2).

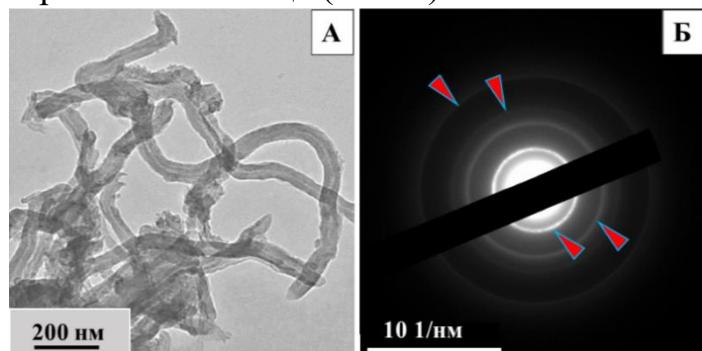


Рисунок 2. Эталонная электронограмма МУНТ. А - кластер МУНТ. ТЭМ; Б – электронограмма кластера МУНТ. Дифракционные кольца показаны стрелками.

Для подтверждения специфичности и чувствительности метода дифракции электронов, электронограммы одиночных МУНТ «Таунит» сравнивали с электронограммами других углеродных наноматериалов – фуллерена C_{60} , наночастиц алмаза и ОУНТ. Было показано, что количество и расположение дифракционных колец МУНТ отличаются от таковых для фуллерена и алмаза. Электронограммы ОУНТ и МУНТ схожи между собой, поскольку качественно эти наночастицы отличаются лишь количеством слоев графена (Рис. 3).

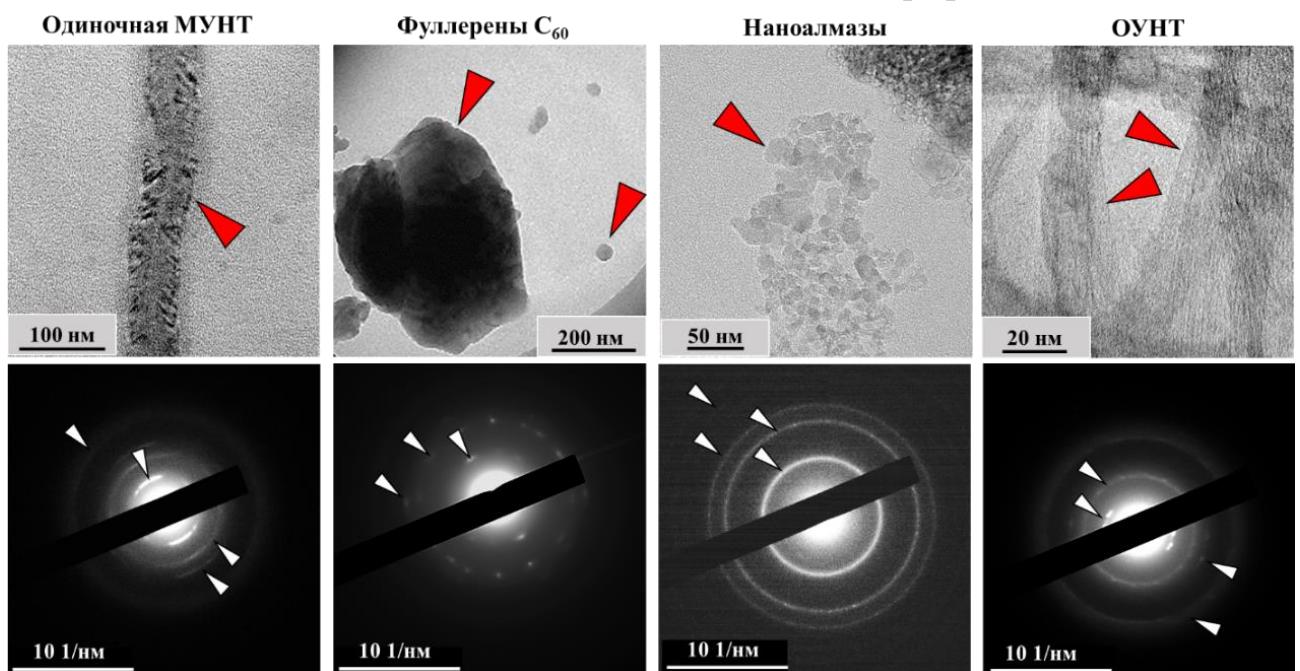


Рисунок 3. Сравнение электронограмм разных типов УНЧ. Верхний ряд – ТЭМ; нижний ряд – дифракция электронов; красными стрелками показаны наночастицы, белыми – дифракционные кольца.

Таким образом, метод дифракции электронов позволяет эффективно отличить МУНТ от других видов углеродных наночастиц, исключая ОУНТ.

Далее проводили исследование химического состава наноматериала. Методом ЭДС было показано, что помимо углерода наноматериал «Таунит» содержит кислород (1,4%), что указывает на наличие кислородсодержащих функциональных групп, а также примесь никеля, который используется в качестве катализатора при синтезе МУНТ.

Исследование МУНТ «Таунит» методом Рамановской спектроскопии показало наличие двух пиков - G-пика при $\sim 1580 \text{ см}^{-1}$ и D-пика при $\sim 1350 \text{ см}^{-1}$. G-пик типичен для графита (sp^2 -гибридизованный углерод), в то время как D-пик отражает содержание углерода в sp^3 -гибридизации и возникает в МУНТ из-за дефектов (включая структурные, наличие функциональных групп на поверхности и т.д.). Было получено отношение высоты D-пика к G-пiku (I_D/I_G), что в дальнейшем будет использовано для оценки химических изменений, происходящих в образце.

В результате проведенного анализа морфометрических, структурных и кристаллических свойств МУНТ «Таунит» были выбраны следующие критерии оценки степени и направления деградации МУНТ:

- 1) уменьшение толщины стенок (увеличение $D_{\text{внутр.}}$ или уменьшения $D_{\text{нар.}}$);
- 2) нарушение целостности стенок - появление в них брешей или распад на фрагменты;
- 3) изменение содержания кислорода в образцах;
- 4) изменение отношения D- и G-пиков комбинационного рассеяния.

5.2. Определение критериев детекции МУНТ «Таунит» в биологических образцах

Для ответа на вопрос о возможности проведения анализа морфологических и физико-химических характеристик МУНТ и выявления их деградации в биологических образцах, были проведены краткосрочные эксперименты по детекции нанотрубок в макрофагах THP-1 на ультратонких срезах.

Электронограммы крупных МУНТ и их кластеров имеют четкие дифракционные кольца (Рис. 4 А), в то время как электронограммы, отснятые с одиночных МУНТ длиной менее 200 нм, представлены неполными кольцами или отдельными рефлексами (Рис. 4 Б). На ультратонких срезах были выявлены и другие электронно-плотные наночастицы, которые могут быть артефактами пробоподготовки, либо попадать на срезы из воздуха. Среди них встречаются как некристаллические частицы - их электронограммы представляют собой равномерное гало без дифракционных колец или отдельных рефлексов (Рис. 4 В), так и кристаллические, но не являющиеся МУНТ (рефлексы не совпадают с дифракционными кольцами эталонного образца) (Рис. 4 Г).

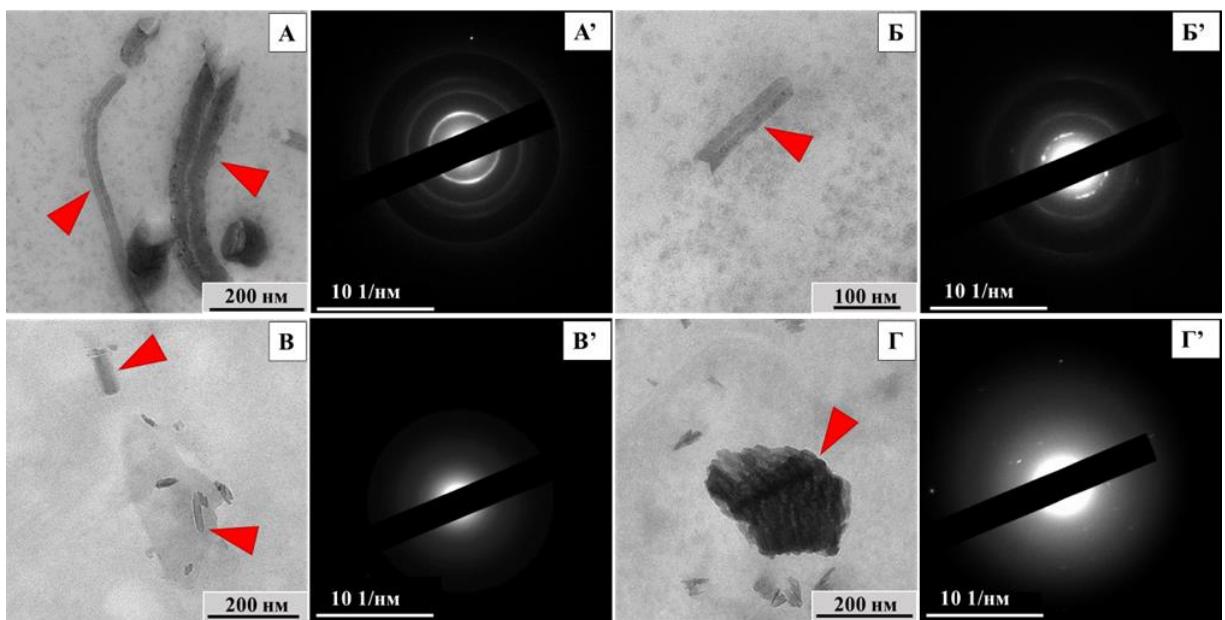


Рисунок. 4. Идентификация выявленных на ультратонких срезах макрофагов ТНР-1 электронно-плотных частиц методом дифракции электронов. Наночастицы показаны стрелками.

Применяемый в работе метод дифракции электронов дает возможность детектировать в биологических образцах как крупные скопления нанотрубок, так и одиночные МУНТ (50 нм и более), и позволяет отличать их от других наночастиц. Метод является необходимым и достаточным для осуществления детекции МУНТ на ультратонких срезах. Критерием идентификации МУНТ выбрано совпадение электронограмм выявленных наночастиц с эталонной электронограммой.

5.3. Детекция МУНТ и анализ их накопления и деградации в клетках органов ЖКТ мыши после длительного перорального введения

После длительного (30 суток) перорального введения МУНТ мышам с питьевой водой, было проведено гистологическое и ультраструктурное исследование слизистой оболочки желудка, дистальных отделов тонкой и толстой кишки (подвздошная и ободочная, соответственно) и печени для выявления скоплений наночастиц или продуктов их деградации. Для первичного поиска скоплений наночастиц, использовали парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином. Поиск МУНТ в клетках, межклеточном пространстве и просветах желез осуществляли методом ТЭМ.

Были выявлены электронно-плотные частицы трубчатой формы в просвете желудка, зоне некрозов энteroцитов тонкого кишечника, в области микроворсинок нормальных энteroцитов толстого кишечника, а также в гепатоцитах. Методом дифракции электронов было показано, что данные частицы не имели кристаллической структуры, что не позволяет отнести их к углеродным нанотрубкам (Рис. 5).

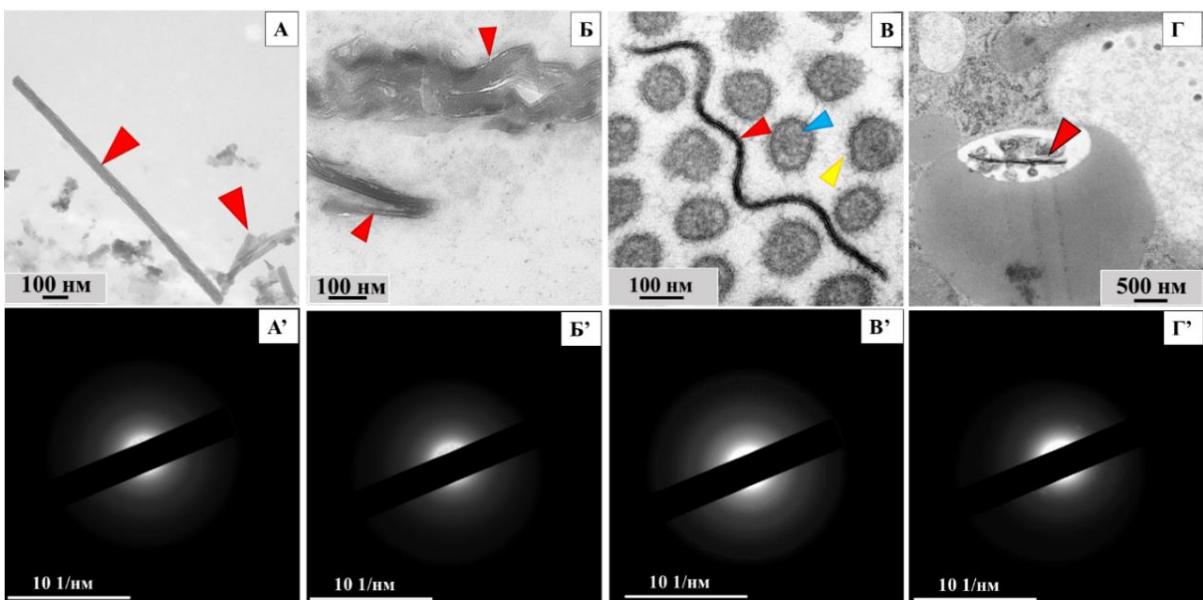


Рисунок 5. Электронно-плотные частицы в органах ЖКТ мыши: А – в желудке (показано стрелками), Б – в тонком кишечнике, В – в толстом кишечнике, Г – в печени. Красными стрелками показаны наночастицы, синей – микроворсинка, желтой – гликокаликс. ТЭМ. А'-Г' – электронограммы, полученные для А-Г, соответственно. Дифракция электронов.

Таким образом, нами не было выявлено скоплений нанотрубок в клетках органов ЖКТ экспериментальных животных после длительного перорального приема суспензии МУНТ.

5.4. Биодеградация МУНТ под действием активных веществ ЖКТ мыши

Для оценки возможной деградации МУНТ в желудочно-кишечном тракте мы изучили влияние биологически активных веществ ЖКТ мыши на характеристики наноматериала «Таунит». Для исследования деградации МУНТ в ЖКТ *in vivo*, наночастицы были выделены из экскрементов мышей, получавших МУНТ с питьевой водой. Также МУНТ проинкубировали в микропробирках с желудочным соком мыши и соляной кислотой (0,1 М) в течение 24ч.

В ходе исследования выделенных из экскрементов наночастиц, были выявлены кластеры, состоящие из мелких (<10 нм в толщину) наночастиц со слоистой структурой (Рис. 6А). После инкубации с желудочным соком в течение 24 часов, большинство МУНТ имели значительно измененную структуру, нехарактерную для контрольных МУНТ. Такие нанотрубки имели неоднородную электронную плотность по всей длине, что свидетельствует об образовании брешей в стенках (Рис. 6Б). Ультраструктурный анализ МУНТ после инкубации с HCl показал, что для основной массы нанотрубок соляная кислота вызывала структурные изменения, схожие с воздействием желудочного сока (Рис. 6В).

Полученные образцы МУНТ исследовали методом рамановской спектроскопии. Было выявлено достоверное снижение I_D/I_G (плотности дефектов) в образцах экспериментальных МУНТ по сравнению с контролем. Наименее интенсивное снижение I_D/I_G вызвала HCl, более выраженным были

эффекты от воздействия желудочного сока и полного прохождения МУНТ через ЖКТ (Рис. 6Г).

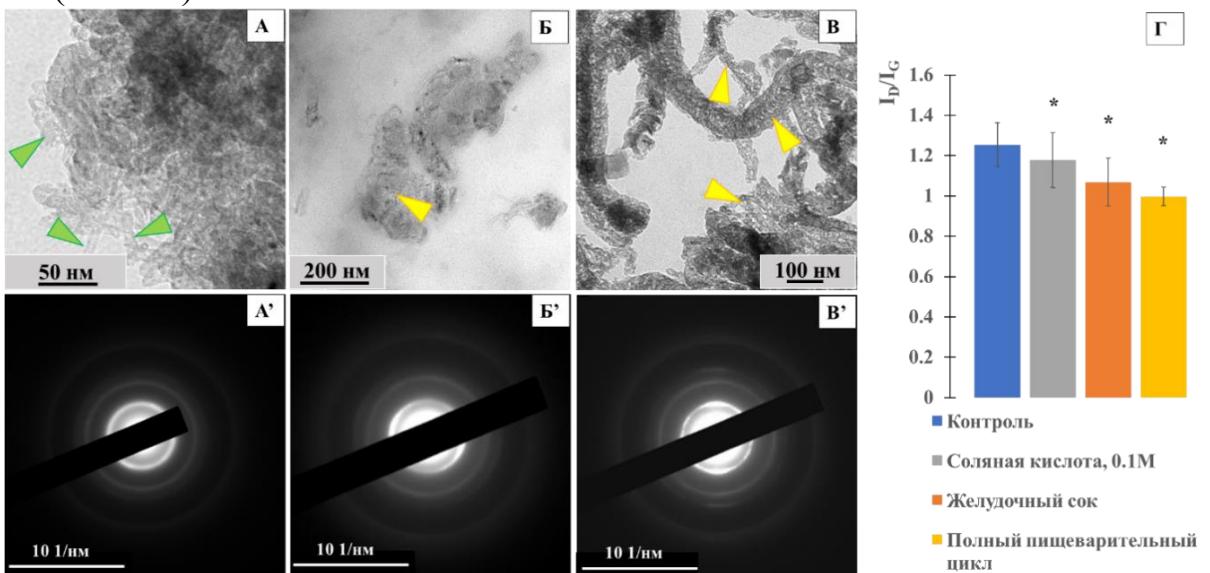


Рисунок 6. Деградация МУНТ под действием активных веществ ЖКТ мыши. А - МУНТ после прохождения через ЖКТ мыши, Б – МУНТ после инкубации с желудочным соком мыши, В – МУНТ после инкубации с 0,1 М HCl. Зелеными стрелками показаны мелкие фрагменты МУНТ, желтыми – МУНТ с неоднородной электронной плотностью. ТЭМ. А'-В' – электронограммы для А-В; Г - отношение I_D/I_G для образцов МУНТ. Данные показаны как средние значения \pm стандартное отклонение. Звездочками показана статистически значимая разница между образцами (t-критерий Стьюдента), $p < 0,05$.

Таким образом, прохождение через ЖКТ мыши вызывает распад МУНТ на фрагменты, инкубация МУНТ с соляной кислотой и желудочным соком индуцирует образование брешей в стенках. При этом плотность дефектов для образцов снижается, что может свидетельствовать о разрушении наиболее дефектных участков МУНТ. Анализ образцов методом дифракции электронов показал, что независимо от степени повреждений МУНТ, их электронограммы не отличаются от эталонной.

5.5. Деградация МУНТ «Таунит» под действием вне- и внутриклеточных окислителей макрофагов

Для выбора длительности эксперимента, была проведена оценка выживаемости клеток при добавлении МУНТ в ростовую среду на 1, 3, 5, 7, 10 суток. Добавление МУНТ (250 мкг/мл) к клеткам достоверно не влияло на их жизнеспособность относительно контроля в течение всех сроков инкубации.

При исследовании ультраструктуры макрофагов было показано, что МУНТ захватывались клетками с помощью фагоцитоза либо попадали внутрь через инвагинации плазматической мембранны. В фагосомах были обнаружены как нанотрубки без выраженных изменений (Рис. 7), так и скопления электронноплотных частиц с морфологией, отличающейся от интактных МУНТ. Среди таких частиц можно выделить МУНТ с истончёнными стенками (Рис. 7Б), крупные (1-5 мкм) скопления МУНТ, в которых отдельные нанотрубки

невозможно идентифицировать (Рис. 7В); и рыхлые кластеры наночастиц без морфологических признаков МУНТ (Рис. 7Г, Д). Предположительно, подобные включения являются продуктами биодеградации МУНТ под действием агрессивной внутренней среды фаголизосом и представляют собой отдельные фрагменты графеновых цилиндров (далее по тексту – «графеновые хлопья»). Для всех вышеперечисленных вариантов характерно сохранение характерных для МУНТ электронограмм (Рис.7 показано на врезках).

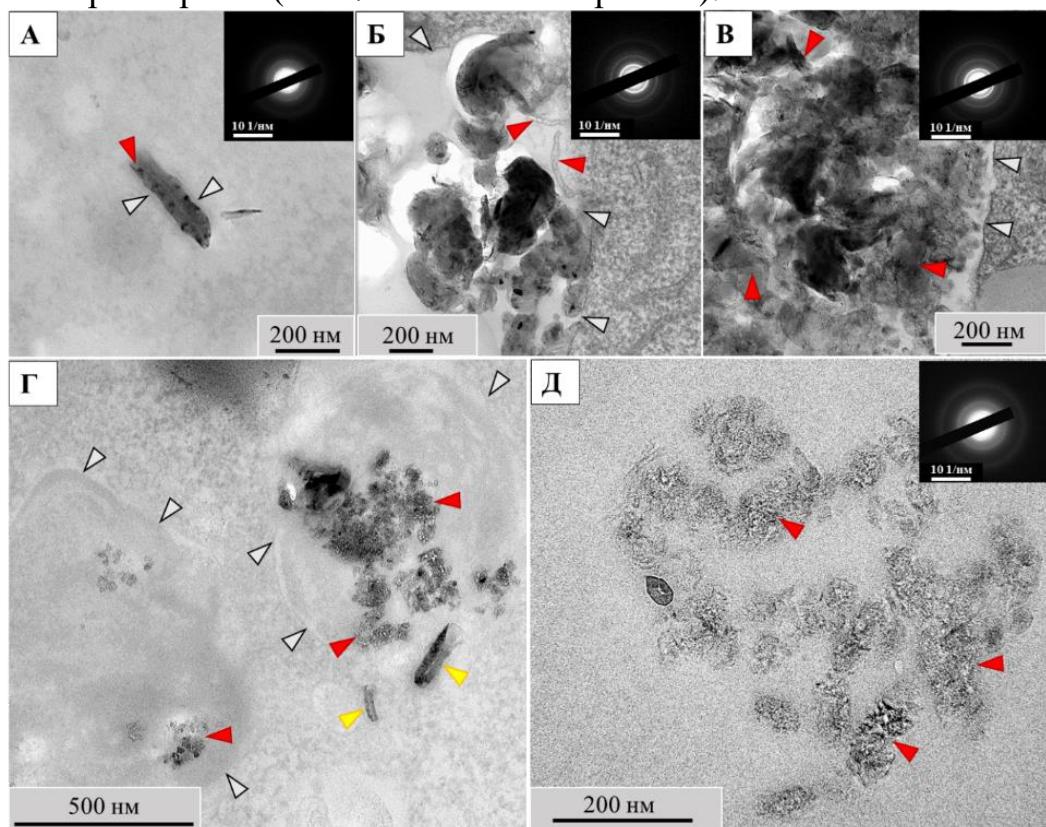


Рисунок 7. Морфология МУНТ в макрофагах THP-1 после 240 часов (10 суток) инкубации.

А – МУНТ без выраженных изменений в эндосоме (показано красной стрелкой); Б – истонченные МУНТ в фагосоме (показаны красными стрелками); В – крупный кластер МУНТ с плохо различимой структурой (показаны красными стрелками); Белыми стрелками показаны границы фагосом и эндосом; Г – МУНТ, сохранившие свою морфологию (показано желтыми стрелками) и «графеновые хлопья» (показано красными стрелками), Д – увеличенный фрагмент кластера «графеновых хлопьев» (показан красными стрелками). ТЭМ. На врезках представлены электронограммы электронно-плотных включений.

Среди выделенных из клеточного лизата МУНТ выявлялись как нанотрубки без значительных изменений (Рис. 8 А), так и сильно измененные. Подобные МУНТ имели извилистую форму, а внутренний канал в них не выявлялся (рис. 8 Б). Такие МУНТ были морфологически схожи с МУНТ, локализованными в фагосомах. Исследование этих наночастиц методом дифракции электронов показало характерные для МУНТ электронограммы (показано врезками), что говорит о сохранении их кристаллической структуры

при морфологических изменениях. Среди МУНТ, выделенных из ростовой среды после инкубации с макрофагами, встречались как нанотрубки без видимых изменений (Рис. 8 В), так и с расширенным внутренним каналом (Рис. 8 Г).

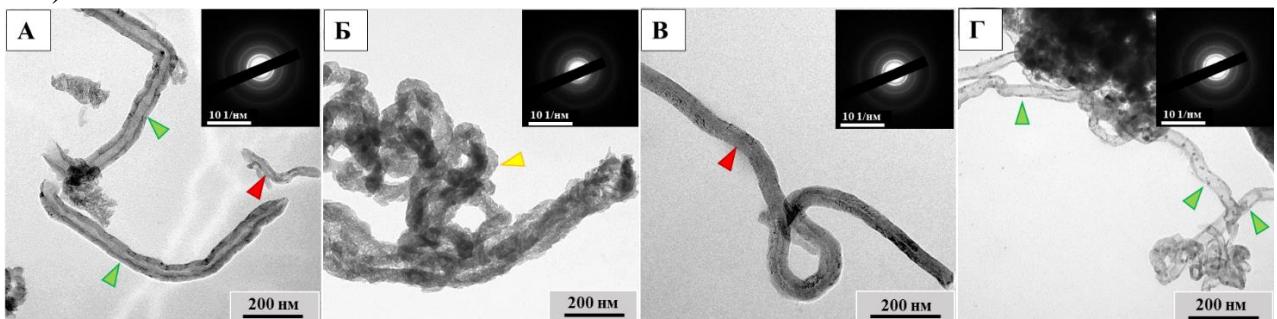


Рисунок 8. МУНТ, выделенные после инкубации с макрофагами ТНР-1.

А, Б – МУНТ, полученные из клеточного лизата, А – МУНТ без видимых изменений (показано красной стрелкой) или с расширенным внутренним каналом (показано зеленой стрелкой); Б – МУНТ с неоднородной электронной плотностью и без признаков внутреннего канала (показано желтой стрелкой); В, Г – МУНТ, выделенные из внеклеточной среды. В – одиночная МУНТ без видимых изменений (показано красной стрелкой), Г – МУНТ с истонченными стенками (показано зеленой стрелкой). ТЭМ.

Морфометрический анализ выделенных из внеклеточной среды МУНТ показал значительное (до 50%) истончение стенок, как с внешней стороны (уменьшение $D_{\text{нар.}}$), так и с внутренней (увеличение $D_{\text{внутр.}}$) (Таблица 1).

Таблица 1. Морфометрический анализ МУНТ после 240 ч (10 суток) инкубации с макрофагами ТНР-1

Диаметр (D)	Контроль	МУНТ из внеклет. среды	МУНТ из клеточного лизата (сохранившие свою морфологию)
$D_{\text{нар.}}, \text{нм}$	45±16	33±14*	41±17
$D_{\text{внутр.}}, \text{нм}$	9±4	15±8*	9±4
Средн. толщина стенок, нм (%)	18±7 (100%)	9±5* (50%)	16±7

Данные показаны как средние значения \pm стандартное отклонение. Статистически значимая разница по сравнению с контролем: * - $p=0,00000$. t-критерий Стьюдента.

С помощью ЭДС были получены данные об элементном составе МУНТ из (1) контрольных образцов, а также (2) выделенных из внеклеточной среды и (3) клеточного лизата. Исходное содержание кислорода в (1) составило 1,4%. Было показано, что в образцах нанотрубок (2) содержание кислорода снижено в 2,04 раза (0,7%) по сравнению с контролем. В (3) содержание кислорода было снижено в 2,23 раза (0,64%) (Рис. 9 А). Это означает, что снижается количество кислородсодержащих функциональных групп на поверхности МУНТ. Методом

рамановской спектроскопии было показано достоверное уменьшение отношения интенсивностей I_G/I_D в 1,13 раз для МУНТ, выделенных из клеточного лизата, и в 1,17 раз для непоглощённых МУНТ (Рис. 9 Б).

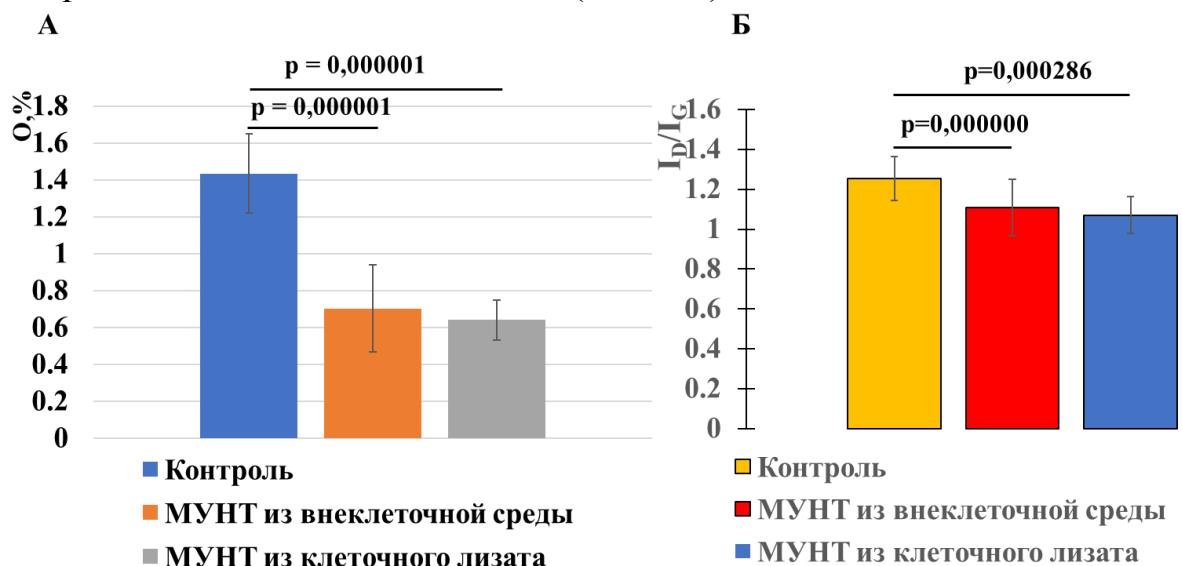


Рисунок 9. Химические изменения п-МУНТ после инкубации с макрофагами THP-1. А - процентное содержание кислорода в образцах, Б - отношение I_D/I_G . Данные показаны как средние значения \pm стандартное отклонение. Линиями показана статистически значимая разница между образцами (*t*-критерий Стьюдента).

Это свидетельствует о снижении количества дефектов МУНТ. Принимая во внимание, что количество кислорода в этих образцах также падает, можно говорить о том, что количество дефектов в кристаллической решётке МУНТ снижается прежде всего за счёт дефектов, включающих в себя атомы кислорода.

Для подтверждения роли АФК в разрушении п-МУНТ макрофагами, был поставлен эксперимент с инкубацией МУНТ с гипохлоритом натрия (1 мМ) и перекисью водорода (1 мМ) с добавлением Fe^{2+} (20 мкМ) *in vitro* (в микропробирках) в течение 10 суток. Эти реагенты часто применяются как модель клеточного окислительного воздействия [Prousek, 2007].

Результатом инкубации с гипохлоритом натрия стало истончение стенок МУНТ (Рис. 10 А). Средние значения внутреннего диаметра статистически значимо увеличились (до 12 ± 6 нм, $p < 0,01$) по сравнению с контролем. После инкубации МУНТ с перекисью водорода в присутствии ионов железа Fe^{2+} , нами не было выявлено статистически значимого увеличения внутреннего диаметра МУНТ (10 ± 5 нм, $p = 0,08$), однако выявлялись МУНТ с локальными расширениями внутреннего канала (Рис. 10 Б), а среди нанотрубок детектировались скопления наночастиц в форме чешуек шириной до 5 нм и длиной до 50 нм. Такие скопления «чешуек» часто были локализованы вдоль МУНТ, прилегая к ним по всей длине как с внешней стороны, так и со стороны внутреннего канала, а также формировали отдельные кластеры размером до 200 нм (Рис. 10 В). Полученные с этих частиц электронограммы совпадали с эталонной электронограммой МУНТ (Рис. 10 В').

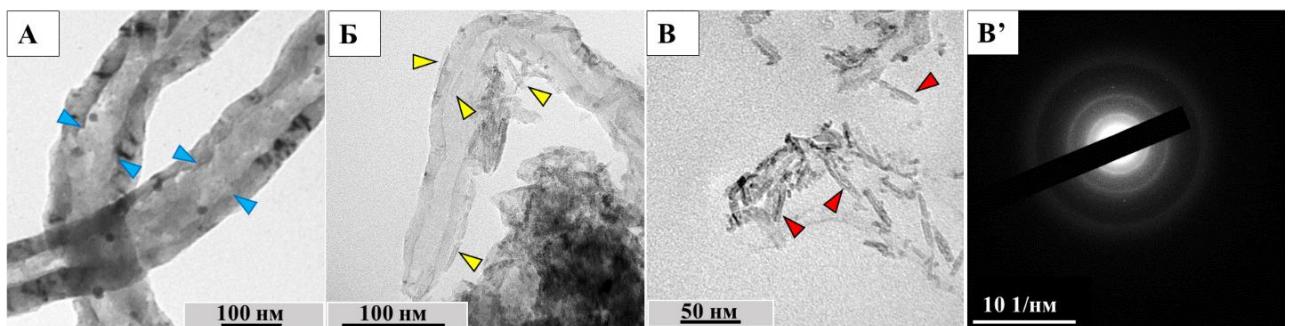


Рисунок 10. Деградация МУНТ *in vitro* под действием АФК. А – нанотрубки после инкубации с гипохлоритом натрия, синими стрелками показан расширенный внутренний канал; Б – графеновые чешуйки, слущивающиеся с внутренней и внешней (показано желтыми стрелками) поверхностей МУНТ после инкубации с H_2O_2 в присутствии Fe^{2+} ; В – ультраструктура графеновых чешуек (показано красными стрелками); ТЭМ. В’ – электронограмма, полученная для В. Дифракция электронов.

Таким образом, нами показано, что в ходе внутриклеточной деградации в фаголизосомах, в стенках МУНТ образуются бреши и нанотрубки распадаются на «графеновые хлопья». Внеклеточная деградация МУНТ выражается в истончении стенок нанотрубок, при этом схожий эффект наблюдали после инкубации наноматериала с гипохлоритом натрия. При воздействии $\text{H}_2\text{O}_2+\text{Fe}^{2+}$, с внутренней и наружной поверхности МУНТ отслаиваются фрагменты графеновых цилиндров.

5.6. Сравнение деградации наноматериалов на основе МУНТ, «Таунит» и «Деалтом», под действием гипохлорита натрия

Для получения ответа на вопрос является ли деградация под действием АФК универсальной для разных вариантов п-МУНТ или только особенностью наноматериала «Таунит», было проведено сравнение АФК-опосредованной деградации МУНТ «Таунит» и другого промышленного наноматериала - МУНТ «Деалтом». Последний, по данным производителя, отличался от «Таунит» большей толщиной стенок. В качестве АФК использовали гипохлорит натрия (100 мМ). При анализе ультраструктуры двух п-МУНТ после их инкубации с гипохлоритом натрия, по сравнению с контролем выявлено увеличение их внутреннего диаметра (Рис. 11).

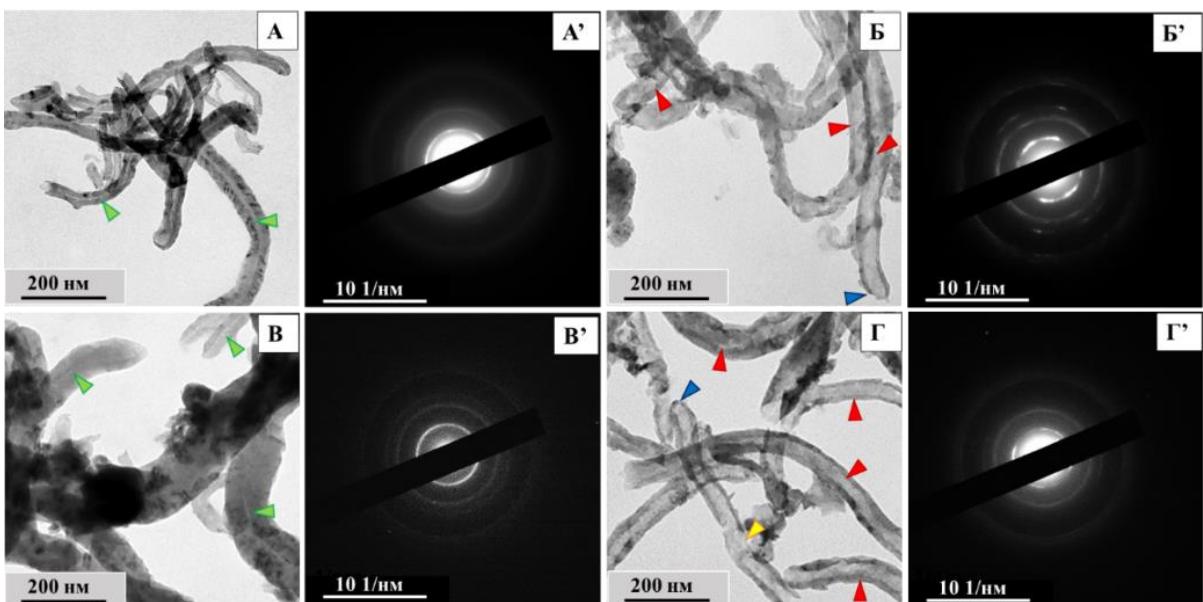


Рисунок 11. Деградация МУНТ под действием гипохлорита натрия (100 мМ). А, Б – МУНТ «Таунит», В, Г – МУНТ «Деалтом». А, В – контроль, зелеными стрелками показан узкий внутренний канал; Б, Г – МУНТ после инкубации с 100 мМ NaOCl. Красными стрелками показаны истонченные стенки МУНТ, синей – закругленный кэп, желтой – сквозное истончение стенки МУНТ. ТЭМ. А'-Г' – соответствующие А-Г электронограммы. Дифракция электронов.

Морфометрический анализ показал истончение стенок МУНТ после обработки гипохлоритом натрия, по сравнению с контролем (таблица 2). При воздействии NaOCl, п-МУНТ «Деалтом» подвергались разрушению как изнутри, так и снаружи, тогда как истончение МУНТ «Таунит» происходило статистически значимо только со стороны внутреннего канала.

Таблица 2. Морфометрические параметры интактных МУНТ и МУНТ после обработки NaOCl

Диаметр (Д)	Контроль	NaOCl, 100 мМ
«Таунит»		
Д _{нар.} , нм	44±16	42±10
Д _{внутр.} , нм	8±5*	15±6*
Средн. толщина стенок, нм (%)	18±11 (100%)	14±8 (78%)
«Деалтом»		
Д _{нар.} , нм	77±27	63±17\$
Д _{внутр.} , ТМ	8±3#	28±1#
Средн. толщина стенок, нм (%)	35±12 (100%)	18±9 (51%)

Данные показаны как средние значения ± стандартное отклонение. Статистически значимая разница: *, \$, # $p < 0,01$.

Элементный анализ показал, что оба углеродных наноматериала качественно схожи по химическому составу, и, помимо углерода, содержат кислород и никель. Однако, в отличие от «Таунит», наноматериал «Деалтом» содержал также примесь алюминия (1±0,3%). После инкубации с гипохлоритом

натрия, уровень оксигенации наноматериала «Таунит» статистически значимо не отличался от контрольного образца. Для «Деалтом», обработка гипохлоритом натрия вызвала статистически значимое увеличение содержания кислорода относительно контроля (Рис. 12А).

Для обоих экспериментальных образцов п-МУНТ значение I_D/I_G статистически значимо снизилось. Снижение показателя I_D/I_G указывает на то, что структура МУНТ претерпела изменения и плотность дефектов относительно контроля уменьшилась (Рис. 12Б).

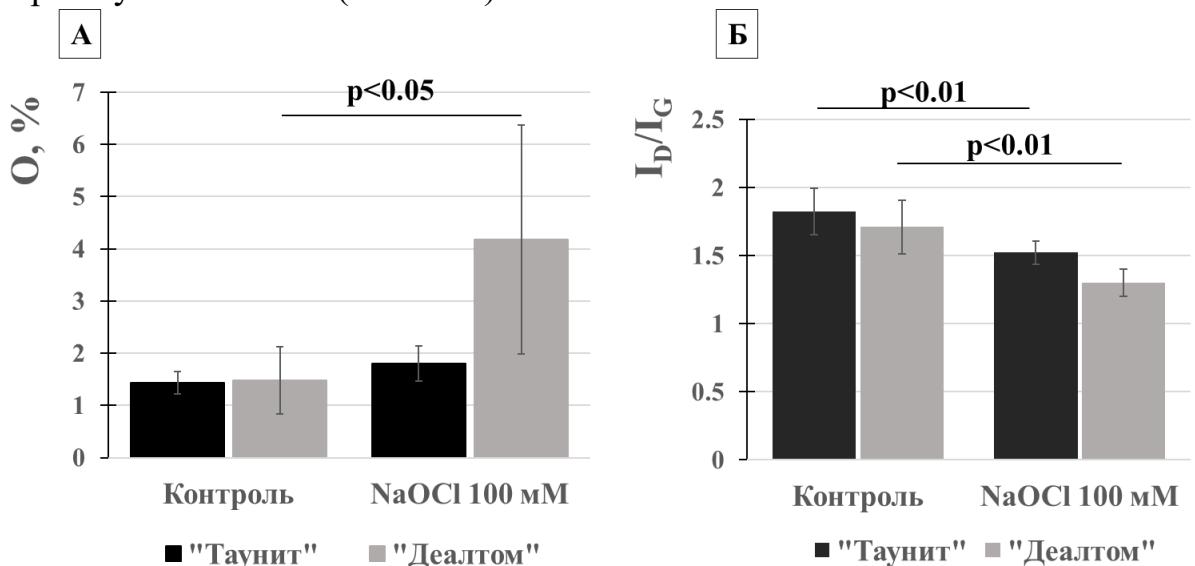


Рисунок 12. Химические изменения п-МУНТ под действием гипохлорита натрия А - ЭДС-анализ содержания кислорода в МУНТ до и после обработки $NaOCl$; Б - I_D/I_G образцов МУНТ до и после обработки $NaOCl$. Данные показаны как средние значения \pm стандартное отклонение.

Таким образом, было показано, что для обоих исследуемых наноматериалов имело место истончение стенок нанотрубок, а также снижение плотности дефектов в ходе деградации. При этом, МУНТ «Деалтом» подверглись значительно большим морфологическим изменениям, чем «Таунит», при этом разрушение нанотрубок происходило как с внутренней, так и внешней стороны, тогда как «Таунит» подвергались разрушению только изнутри. Такой эффект говорит о том, что динамика и направление деградации двух экспериментальных МУНТ не одинаковы. Еще одним отличием является повышение содержания кислорода в наноматериале «Деалтом» в сравнении с контролем, и отсутствие подобного эффекта для МУНТ «Таунит».

Заключение

Нами было впервые показано, что в ходе прохождения через ЖКТ, МУНТ подвергаются деградации. Также продемонстрировано, что макрофаги человека способны осуществлять деградацию МУНТ двумя разными способами – вне- и внутриклеточно. При этом, разные активные вещества приводят к морфологически отличающимся вариантам разрушения МУНТ. Воздействие агрессивных компонентов пищеварительной системы и внутриклеточное

разрушение МУНТ по морфологическим проявлениям схожи между собой. Подобное сходство может быть обусловлено кислой средой в желудке и фаголизосомах, и позволяет объединить эти типы деградации МУНТ в один. Внеклеточная деградация МУНТ проходит по иному пути. На основании полученных результатов, мы выделяем два основных пути биодеградации МУНТ: сайт-неспецифический, когда происходит равномерное истончение их стенок, и pH-зависимый сайт-специфический вариант, когда в стенках МУНТ появляются бреши (Рис.13).

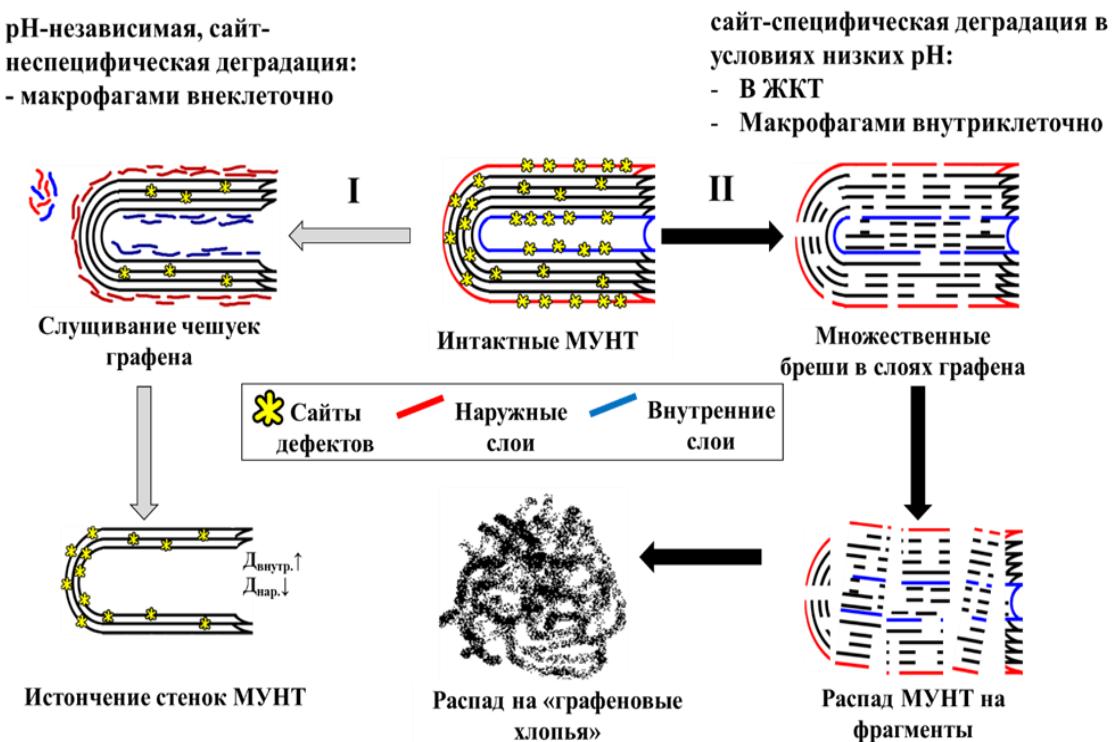


Рисунок 13. Схема двух типов биодеградации промышленных МУНТ

Выводы:

- Промышленные МУНТ «Таунит» и «Деалтом» характеризуются гетерогенностью по морфометрическим показателям, высоким уровнем структурных дефектов, содержат кислород и никель, при этом МУНТ «Деалтом» дополнительно содержат алюминий. Совокупность изменений данных характеристик позволяет оценить процесс деградации МУНТ.
- Продукты биодеградации МУНТ могут быть идентифицированы методом дифракции электронов.
- После длительного (30 суток) перорального приема МУНТ не выявляются в клетках органов ЖКТ мышей, но обнаруживаются в экскрементах.
- При прохождении МУНТ по ЖКТ происходит их деградация до мелких фрагментов. *In vitro* под действием желудочного сока мыши или соляной кислоты в стенках МУНТ возникают бреши.
- Взаимодействие макрофагов с МУНТ сопровождается внутриклеточной и внеклеточной деградацией наночастиц. Внутри клеток МУНТ распадаются до «графеновых хлопьев», вне клеток - происходит истончение стенок МУНТ.

6. Два вида промышленных МУНТ под действием гипохлорита натрия разрушаются путем истончения стенок, но динамика их деградации различается.
7. Промышленные МУНТ подвергаются биодеградации, которая может осуществляться как внутри клеток млекопитающих, так и во внеклеточном пространстве.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

- 1. Масютин А.Г.**, Ерохина М.В., Шипелин В.А., Гмошинский И.В., Онищенко Г.Е. Краткосрочное введение наночастиц фуллерена С₆₀ в тонкую кишку крысы индуцирует быстрое развитие патологии гепатоцитов// Российские нанотехнологии. – 2020. Т. 15. - № 4 - С. 96-104. IF(Scopus)=0,207 (0,5625/0,45)
2. Шипелин В.А., Шумакова А.А., Сото Х.С., Селифанов А.В., Сидорова Ю.С., **Масютин А.Г.**, Чернов А.И., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Влияние перорально вводимых одностенных углеродных нанотрубок на интегральные и биохимические показатели крыс Wistar// Гигиена и санитария. – 2019. – Т. 98. - № 3. - С. 332-338. IF(Scopus)=0,224 (0,4375/0,15)
3. Бердникова Н.Г., Донцов А.С., Ерохина М.В., Зак П.П., Лапина В.А., **Масютин А.Г.**, Меньшов В.А., Наумов В.В., Онищенко Г.Е., Павич Т.А., Першукевич П.П., Сакина Н.Л., Трофимов А.В., Трофимова Н.Н., Цаплев Ю.Б., Яблонская О.И. Комплексы наноалмазов с кумарином: спектрально-люминесцентные свойства и взаимодействие с макрофагами//Химическая физика. – 2019. – Т. 38. № 12. - С. 48-53. IF(РИНЦ)= 1.144 (0,375/0,15)
4. **Masyutin Alexander G.**, Bagrov Dmitry V., Vlasova Irina I., Nikishin Igor I., Klinov Dmitry V., Sychevskaya Ksenia A., Onishchenko Galina E., Erokhina Maria V. Wall Thickness of Industrial Multi-Walled Carbon Nanotubes is Not a Crucial Factor for Their Degradation by Sodium Hypochlorite// Nanomaterials. 2018. – Т. 8. - № 9. С. 715-715. IF(Scopus)=4,03 (0,8125/0,6)
5. **Масютин А.**, Ерохина М., Сычевская К., Гусев А., Васюкова И., Ткачёв А., Смирнова Е., Онищенко Г. Многостенные углеродные нанотрубки индуцируют патологические изменения в органах пищеварительной системы мышей// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161. - № 1. - С. 143-149. IF(РИНЦ)= 0.682 (0,375/0,3)

Другие статьи по теме диссертации

1. **Masyutin A.**, Erokhina M., Sychevskaya K., Gusev A., Vasyukova I., Smirnova E., Onishchenko G. Multi-walled carbon nanotubes: biodegradation by gastric agents in vitro and effect on murine intestinal system//IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2015. – Т.98. – С. 1-7. (0,4375/0,35)

Тезисы докладов и стендовых сообщений

1. **Масютин А.Г.**, Тарасова Е.К. Перспективы использования наночастиц алмаза для адресной доставки лекарств// Вестник ЦНИИТ Специальный выпуск. – 2021. – Т1. С. 14-17
2. Tarasova E.K., **Masyutin A.G.**, Erokhina M.V. Multi-walled carbon nanotubes and nanodiamonds degradation in human macrophages// The 2nd International school-conference for young researchers Smart Nanosystems for Life Book of Abstracts. 2019. – С. 93-95.

- 3. Masyutin A.G.**, Erokhina M.V., Tarasova E.K., Onishchenko G.E., Lapina V.A., Pavich T.A., Tsaplev Y.B., Zak P.P., Trofimov A.V. Nanodiamond-tetracarboxyphenylporphyrin complexes: characteristics, detection and visualization in human cells// The 2nd International school-conference for young researchers Smart Nanosystems for Life Book of Abstracts. 2019. - С. 89-90
4. Сычевская К.А., **Масютин А.Г.**, Ерохина М.В., Смирнова Е.А., Онищенко Г.Е. Промышленные многостенные углеродные нанотрубки вызывают патологические изменения в органах пищеварительной системы мыши// Материалы XXVII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – 2015. С. 143-143
5. Сычевская К.А., **Масютин А.Г.** Промышленные многостенные углеродные нанотрубки вызывают патологические изменения в органах пищеварительной системы мыши// Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2015». 2015. – Т.2. – С.184-185
- 6. Masyutin A.**, Erokhina M., Gusev A., Vassyukova I., Smirnova E., Onishchenko G. Prolonged supplementation of nanomaterial composed of multiwalled carbon nanotubes, to drinking water of mice induces pathological changes of the gastrointestinal tract//7 International Congress Nanotoxicology NanoTox2014. 2014. С. 145-146.