

Эффективность ольфакторного транспорта аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца

А.В. Ромашченко^{1,2}✉, Д.В. Петровский¹, М.Б. Шаропова¹, Ю.М. Мошкин¹, К.Э. Купер³, К.Н. Морозова¹, Е.В. Киселева¹, М.П. Мошкин¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Известно, что наноразмерные твердые аэрозоли способны поступать из носовой полости в мозг в обход гематоэнцефалического барьера. Необходимость исследования факторов, влияющих на назальный транспорт наночастиц, обусловлена тем, что таким образом в мозг могут проникать как ксенобиотики, так и терапевтические препараты. Показано, что биодоступность твердых частиц определяет их размер и поверхностный заряд. Вместе с тем влияние структуры кристаллической решетки практически не исследовано. В данной работе, выполненной на половозрелых самцах мышей C57BL/6J, проанализирована эффективность поступления в ольфакторный эпителий (ОЭ) и обонятельные луковицы (ОЛ) интраназально апплицированных наночастиц оксидов марганца с аморфной и кристаллической структурой. Для оценки накопления магнито-контрастных наночастиц марганца в ОЛ и ОЭ использовали T1-взвешенную магнитно-резонансную томографию. Установлено, что аморфные частицы накапливаются в ОЭ и ОЛ в большей степени, чем кристаллические. Одной из причин различного поступления в головной мозг интраназально введенных нанообъектов может быть неодинаковая способность аморфных и кристаллических частиц преодолевать мукозальный слой, покрывающий ОЭ. Действительно, введение муколитика (дитиотреитол) за 20 мин до аппликации не увеличивало накопление в ОЭ и ОЛ аморфных частиц, но повышало эффективность поступления кристаллических наночастиц. Сведения о различном поступлении аморфных и кристаллических наночастиц из носовой полости в мозг, а также обоснование ключевой роли мукозального слоя в дифференцировании проникающей способности этих частиц будут полезны и при разработке подходов к оценке токсикологической опасности воздушной среды, и для оптимизации методов ингаляционной терапии.

Ключевые слова: аморфные и кристаллические наночастицы; ольфакторный транспорт; мукозальный слой; магнитно-резонансная томография.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ромашченко А.В., Петровский Д.В., Шаропова М.Б., Мошкин Ю.М., Купер К.Э., Морозова К.Н., Киселева Е.В., Мошкин М.П. Эффективность ольфакторного транспорта аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(7):848-855. DOI 10.18699/VJ17.305

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Romashchenko A.V., Petrovskii D.V., Sharapova M.B., Moshkin Y.M., Kuper K.E., Morozova K.N., Kiseleva E.V., Moshkin M.P. Olfactory transport efficiency of the amorphous and crystalline manganese oxide nanoparticles. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):848-855. DOI 10.18699/VJ17.305 (in Russian)

Received 06.10.2017
Accepted for publication 30.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: arom@bionet.nsc.ru

Olfactory transport efficiency of the amorphous and crystalline manganese oxide nanoparticles

A.V. Romashchenko^{1,2}✉, D.V. Petrovskii¹, M.B. Sharapova¹, Y.M. Moshkin¹, K.E. Kuper³, K.N. Morozova¹, E.V. Kiseleva¹, M.P. Moshkin¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² The Institute of Computational Technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The ability to deliver particulated xenobiotics and therapeutic drugs directly from the nasal cavity to the central nervous system, bypassing the hemato-encephalic barrier, determines a high importance of investigation of factors influencing this process. It was shown that the bioavailability of solid particles is influenced by their size and surface charge. At the same time, the impact of a crystal structure (crystalline/amorphous) has been poorly investigated. In this study, using sexually mature male C57BL/6J mice, we analyzed the efficiency of the nose-to-brain transport of crystalline and amorphous manganese oxide nanoparticles. T1-weighted magnetic resonance imaging (MRI) was used to evaluate the accumulation of manganese nanoparticles in olfactory bulb (OB) and olfactory epithelium (OE). So, it has been established that amorphous particles have higher accumulation rate in OE and OB in comparison with crystalline particles after their intranasal administration. The unequal ability of amorphous and crystalline particles to overcome the mucosal layer covering the OE may be one of the possible reasons for the different nose-to-brain transport efficiency of particulated matter. Indeed, the introduction of mucolytic (dithiothreitol) 20 minutes prior to intranasal particle application did not influence the accumulation of amorphous particles in OE and OB, but enhanced the efficiency of crystalline nanoparticle entry. Data on the different intake of amorphous and crystalline nanoparticles from the nasal cavity to the brain, as well as the evidence for the key role of the mucosal layer in differentiating the penetrating power of these particles will be useful in developing approaches to assessing air pollution and optimizing the methods of inhalation therapy.

Key words: amorphous and crystalline nanoparticles; olfactory transport; mucosal layer; magnetic resonance imaging.

Образование твердых наноразмерных аэрозолей происходит в результате как естественных процессов (лесные пожары, извержения вулканов и пылевые бури), так и действия антропогенных факторов (добыча полезных ископаемых, сжигание топлива в двигателях, электростанциях и т. д.) (Borm, 2002; Kittelson et al., 2004; Barman et al., 2009). Таким образом, субмикронные и наноразмерные аэрозоли присутствовали в атмосфере задолго до нанотехнологического бума и продолжают представлять серьезную проблему для здоровья людей. Основной вектор современных исследований токсических эффектов наночастиц и наноаэрозолей направлен на изучение их поражающего воздействия на респираторную и сердечно-сосудистую системы (Donaldson et al., 2002; Chen et al., 2008; Brook et al., 2010; Kampfrath et al., 2011). При этом респираторная система рассматривается в качестве одной из основных портовых систем для поступления наночастиц в организм. Однако, помимо очевидного воздействия наноаэрозолей на респираторную и сердечно-сосудистую системы, частицы могут захватываться ольфакторным эпителием носовой полости и проникать в центральную нервную систему (ЦНС) в обход гемато-энцефалического барьера, где способны ускорять развитие нейродегенеративных заболеваний (Genter et al., 2012; Heusinkveld et al., 2016; Parmalee, Aschner, 2016; Patchin et al., 2016). Нейропатологии, возникающие в результате воздействия на организм наноаэрозолей, трудно исследовать вследствие отсроченного характера их возникновения. Тем не менее при сопоставлении результатов эпидемиологических исследований на людях, а также данных экспериментов на мышах можно предположить, что наночастицы вносят значительный вклад в эти процессы (Wu et al., 2011; Sharma et al., 2012; Trickler et al., 2012; Iqbal et al., 2013). Эпидемиологические наблюдения, в том числе вошедшие в отчеты Всемирной организации здравоохранения, указывают на то, что субмикронные и наноразмерные аэрозоли являются существенными факторами риска для болезней, обусловленных нарушением центральных механизмов регуляции, в том числе и нейродегенеративных патологий. Иными словами, мозг – одна из значимых мишеней для токсического действия наночастиц, присутствующих в воздушной среде. Причем, как показывают последние исследования, накопление в мозге вдыхаемых наночастиц определяется на 80 % их поступлением из носовой полости и только на 20 % – из легких (Kreyling, 2016).

Нейрональный захват (ольфакторные нейроны, нейроны тройничного нерва) и их последующий аксональный трансинаптический транспорт в более глубокие структуры мозга – наиболее вероятный путь проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг (Elder et al., 2006; Genter et al., 2012; Patchin et al., 2016). Участие клеточного транспорта в перемещении твердых частиц из носовой полости в мозг впервые показано на примере нейротропных вирусов. Их проникновение подавляется введением ингибиторов аксонального транспорта или веществ, индуцирующих апоптоз ольфакторных нейронов (Stroop et al., 1984; Morales et al., 1988; Ryzhikov et al., 1995). Одним из важнейших факторов, определяющим эффективность захвата наноразмерных объектов ольфакторным эпителием (ОЭ) при их интраназальной

аппликации, является диффузия частиц сквозь слой слизи, в который погружены окончания обонятельных нейронов (Lai et al., 2007; Crater, Carrier, 2010). Мукозальный матрикс представляет собой вязкоупругий гель, состоящий из высокомолекулярных гликопротеинов, с одной стороны, формирующий первый химический барьер на пути проникновения в организм патогенов и ксенобиотиков, с другой, снижающий эффективность доставки лекарственных средств на основе частиц за счет пространственных и/или адгезионных взаимодействий. Поэтому исследование факторов, влияющих на процесс диффузии наноразмерных объектов сквозь мукозальный слой, имеет важное как эпидемиологическое, так и терапевтическое значение.

На эффективность проникновения наночастиц сквозь мукозальный слой влияют такие их свойства, как размер, гидрофильность и, в меньшей степени, дзета-потенциал (Lai et al., 2009). Влияние структуры кристаллической решетки на этот процесс практически не исследовано. При этом для ряда слаборастворимых фармпрепаратов показана большая биодоступность аморфных форм по сравнению с кристаллическими (Yang et al., 2010).

В решении этой задачи большое значение имеет подбор модельных нанообъектов, обладающих различными структурными характеристиками (кристаллические или аморфные), в том числе размерами и дзета-потенциалом, а также доступными для прижизненной визуализации методами биоимиджинга. Всем этим требованиям отвечают нерастворимые магнито-контрастные частицы оксидов марганца. Марганец способен значительно сокращать время спин-решетчатой релаксации протонов, что позволяет довольно точно определить места его локализации при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ). Ранее нами было показано, что через 12 ч после однократного интраназального введения мышам наночастиц оксида марганца ($MnO-NЧ$) наблюдалось значительное увеличение уровня МРТ-сигнала в ОЭ и обонятельных луковицах (ОЛ) животных, обусловленное накоплением Mn. Причем интенсивность МРТ-сигнала высокодостоверно коррелировала с содержанием марганца в тканях мозга, которое было измерено методом атомно-эмиссионной спектроскопии (Moshkin et al., 2014). В данном исследовании, используя T1-взвешенную МРТ *in vivo*, мы сравнили проникновение аморфных наночастиц ($Mn_3O_4-NЧ_{аморф.}$) и частиц с выраженной кристаллической структурой ($Mn_3O_4-NЧ_{кристал.}$) через мукозальный слой и их последующее накопление в ОЭ мыши при однократном интраназальном введении. Для оценки влияния параметров мукозального геля на эффективность проникновения частиц в ОЭ предварительно перед введением коллоида носовую полость обрабатывали раствором муколитика (дитиотреитол), снижающего вязкость продуцируемой слизи.

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Эксперименты поставлены на самцах мышей SPF-статуса инбредной линии C57BL/6J в возрасте 12–14 нед (28–32 г). После отсадки в трехнедельном возрасте и до исследований животных содержали группами по пять особей одного пола в стандартных

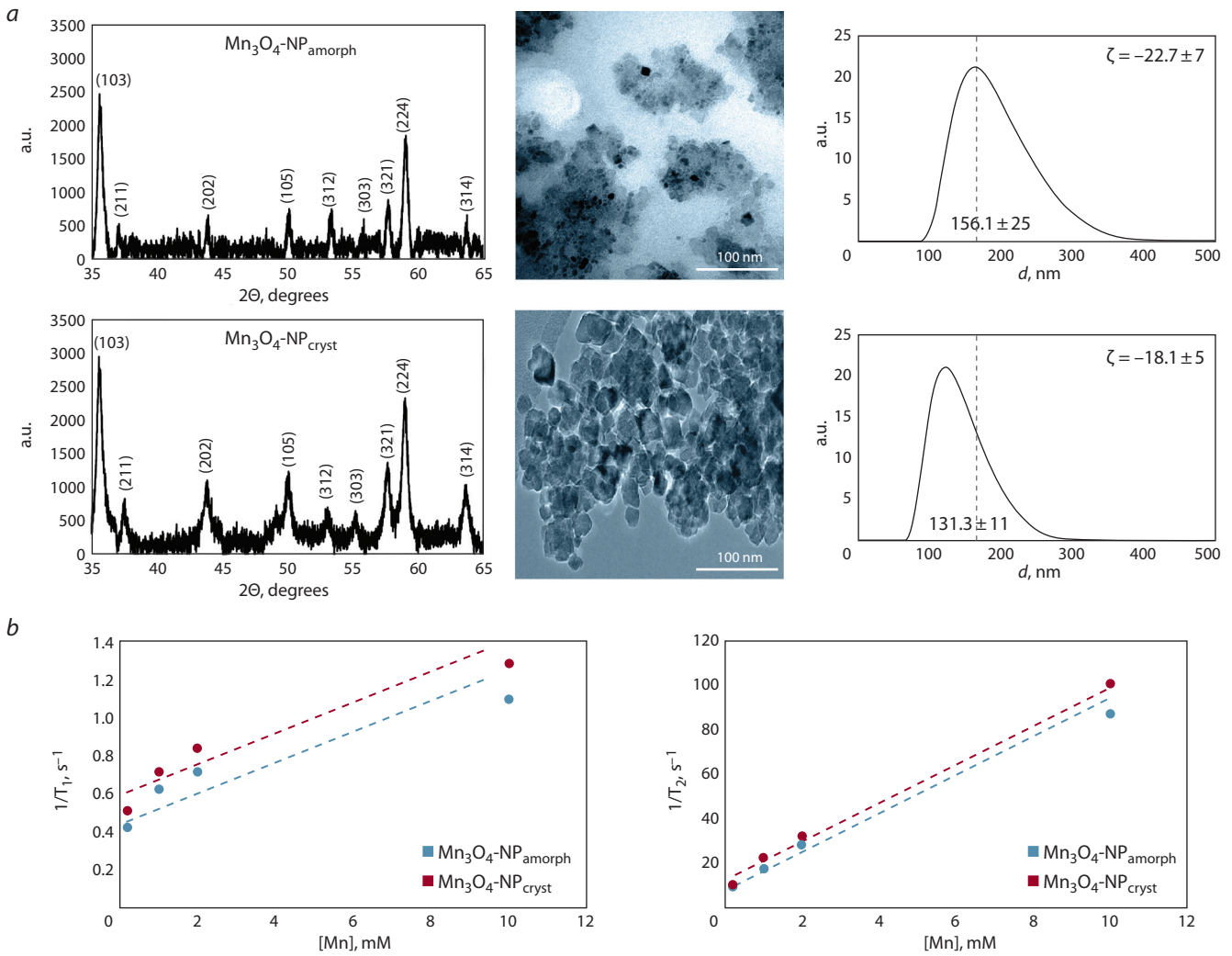


Fig. 1. Physicochemical characterization of amorphous and crystalline Mn₃O₄ nanoparticles. (a) Crystal lattice parameters (left), morphology (center), and size (right). Upper row, amorphous particles; lower row, crystalline particles. Characterization of the crystalline phase in a Mn₃O₄-NP sample by powder diffraction at the synchrotron radiation facility, Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk. Colloid photographs were taken by high-resolution TEM. Parameters: hydrodynamic radii (*d*) and ζ potentials of Mn₃O₄-NP_{amorph} and Mn₃O₄-NP_{cryst} (b) Dependence of reciprocal relaxation times T₁ and T₂ on manganese concentrations in Mn₃O₄-NP_{amorph} and Mn₃O₄-NP_{cryst} samples.

клетках (35 × 25 × 12 см) при температуре 22–24 °С и искусственном световом режиме 14С:10Т. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду мыши получали *ad libitum*. В качестве подстилочного материала применяли обеспыленные древесные опилки.

Наночастицы. В работе использовано два типа наночастиц (НЧ) оксида марганца – коммерчески доступные кристаллические наночастицы Mn₃O₄ (Mn₃O₄-НЧ_{кристалл.}, US3340, US-NANO, США), а также полученные в результате гидролиза хлорида марганца (II) наночастицы Mn₃O₄ (Mn₃O₄-НЧ_{аморф.}).

Для получения Mn₃O₄-НЧ_{аморф.} к 0.5 мл 0.2 М раствора MnCl₂, содержащего в качестве кэпирующего агента 12 % Tween 20, добавляли 0.5 мл 0.4 М раствора KOH, содержащего 16 % Tween 20, после чего активно перемешивали с помощью вортекса в течение 30 с. Далее полученные частицы отмывали, для чего их осаждали центрифугированием при 18000 G в течение 15 мин. Все

операции проводили при комнатной температуре. После удаления надосадочной жидкости к осадку частиц добавляли деионизированную воду в объеме, равном объему исходного раствора, и соницировали в течение 1 ч при температуре 4 °С на ультразвуковом гомогенизаторе QSonica Q700 с непогружным зондом Cup Horn (5.5» cup) (QSonica, США) (110 В, 50/60 Гц, частота 20 кГц, мощность 300 Вт/л; число циклов ON/OFF (30 с/30 с) – 60). Процедуру отмывки проводили четыре раза, после чего получали стабильный коллоидный раствор.

Характеристика использованных наночастиц. Физико-химические характеристики использованных частиц представлены на рис. 1, а.

Морфологию и размеры наночастиц изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Микроскоп – JEM 1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой Veleta (SIS, Германия). Характеристику кристаллической решетки использованных в работе наночастиц

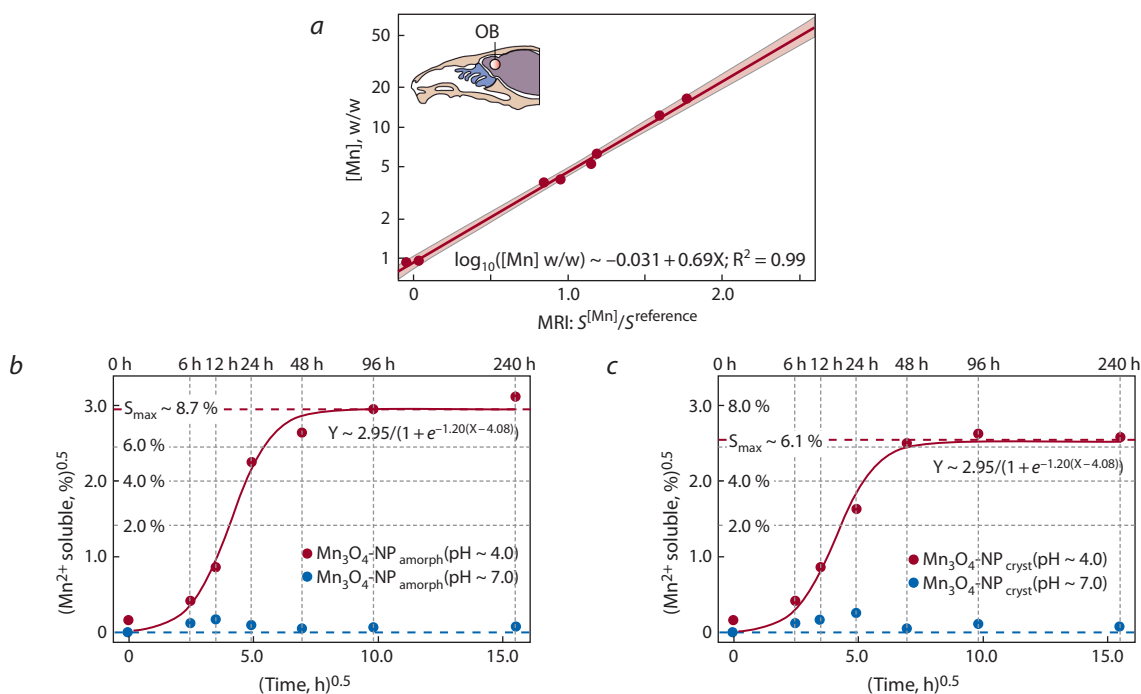


Fig. 2. The potential of Mn₃O₄-NP_{amorph} and Mn₃O₄-NP_{cryst} as contrasts and their solubility in biologic media.

(a) Correlation between the MRI signal amplitude in mouse olfactory bulbs (OBs) in T1-weighted images and manganese concentrations in OB tissue 24 h after intranasal Mn₃O₄-NP_{cryst} application. The accumulation of nanoparticles in tissues was assessed from MRI responses in T1-weighted images normalized to the reference. Manganese concentrations in tissues were measured by atomic emission spectroscopy with two-jet arc plasma. (b, c) Dynamics of the dissolution of (b) Mn₃O₄-NP_{amorph} and (c) Mn₃O₄-NP_{cryst} at pH 6.8 (citrate buffer) and pH 4.0 (citrate buffer) within 10 days.

(Mn₃O₄-НЧ_{аморф}, Mn₃O₄-НЧ_{кристал}.) проводили с помощью порошковой дифрактометрии на станции синхротронного излучения (ИЯФ СО РАН) (Evdokov et al., 2009) (см. рис. 1, a).

Параметры наночастиц в суспензии определяли методом динамического светорассеяния при углах рассеяния 90° и температуре 22 °С и электрофореза с помощью Zeta-sizer NanoZS (Malvern, Великобритания) в соответствии с протоколом производителя (см. рис. 1, a).

Марганец является парамагнетиком, поэтому способен сокращать время спин-решетчатой релаксации (T1) при проведении МРТ. Для всех наночастиц были получены характеристические времена релаксации на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл. Обратные величины релаксации (T1⁻¹, мс⁻¹ и T2⁻¹, мс⁻¹) находились в прямо пропорциональной зависимости от концентрации марганца в образцах (см. рис. 1, б). Далее в экспериментах *in vivo* было показано, что уровень МРТ-сигнала в ОЛ через 12 ч после интраназальной аппликации Mn₃O₄-НЧ_{кристал} прямо пропорционален концентрации марганца в образце (рис. 2, a).

Это дало нам возможность перейти к количественным оценкам эффективности захвата и транспорта магнито-контрастных наночастиц из носовой полости в мозг. Используя данный подход, мы определили, что концентрация Mn₃O₄-НЧ в обонятельных луковицах мыши достигает максимума через сутки после их однократного интраназального введения. Для того чтобы оценить вклад в наблюдаемые эффекты возможного частичного растворения кристаллических и аморфных Mn₃O₄-НЧ, проведена оцен-

ка растворимости используемых частиц при различных рН в биологических средах. Измерение растворимости проводили, основываясь на том, что релаксивность ионов марганца примерно в 50 раз выше релаксивности используемых частиц, поэтому при растворении частиц резко возрастает релаксивность раствора, что позволяет определить концентрацию ионов в растворе. Зная начальное содержание марганца в пробе в виде нерастворимых частиц и количество ионов марганца в растворе, возможно оценить динамику растворения наночастиц (см. рис. 2, б, в).

Для интраназального введения использовали коллоидные растворы наночастиц с концентрацией марганца 5.5 г/л. За 1 ч до введения растворы наночастиц диспергировали на ультразвуковом гомогенизаторе при частоте 20 кГц, мощности 300 Вт. Образец подвергали сонификации в течение 30 односторонних циклов (30 с ON и 30 с OFF) и далее определяли параметры с помощью динамического углового светорассеяния (см. рис. 1, a).

Схема экспериментов. При исследовании накопления различных наночастиц марганца в ОЭ и ОЛ ненаркотизированным животным (для каждого типа наночастиц n = 6) вводили по 10 мкл коллоидного раствора частиц в одну ноздрю. Дважды через 30 мин и 12 ч проводили МРТ-сканирование ОЭ и ОЛ. Накопление наночастиц в этих структурах оценивали с помощью T1-взвешенных МРТ-изображений. В пилотных экспериментах показано, что значения МРТ-сигнала в ОЭ достигают своего максимума через 30 мин после введения, а в ОЛ – через 12 ч.

Для того чтобы исследовать влияние вязкости мукозального слоя на эффективность захвата наночастиц марганца

ОЭ, мышам (для каждого типа наночастиц $n = 6$) за 20 мин до назальной аппликации наночастиц в каждую ноздрю вводили по 10 мкл 0.01 М дитиотреитола, снижающего вязкость продуцируемой слизи, после чего через 30 мин проводили МРТ-сканирование.

МРТ-исследования. Накопление магнитоконтрастных наночастиц в ОЭ и ОЛ мыши исследовано с помощью МРТ на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл.

За 5 мин до исследования мышей обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали за счет водного контура в томографическом столике-кроватьке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глущину наркоза.

Информация о распределении марганца по структурам мозга мыши получена по результатам T1-взвешенных изображений с использованием метода FLASH (fast low angle shot) со следующими параметрами: импульсная последовательность (TE = 2.5 мс, TR = 200 мс), изображения (размер 2.5 × 2.5 см; матрица 512 × 512 точек; толщина среза 0.5 мм; размеры вокселя 75 мкл × 75 мкл × 0.5 мм; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 15; ориентация срезов аксиальная). Общее время сканирования составляло 6 мин.

Накопление частиц марганца в клетках ОЭ и ОЛ выражали как отношение уровня МРТ-сигнала в исследуемых структурах к уровню МРТ-сигнала в референсе, которым служила микропробирка с фосфатным буфером (0.5 мл), помещенная вдоль головы мыши. Обработку МРТ-сканов проводили в программе ImageJ.

Статистика. Множественные сравнения средних проводили с помощью LSD-теста (least significant difference). Оценку взаимозависимостей исследуемых признаков проводили при использовании параметрического коэффициента корреляции Пирсона. Данные выражали как средние ± SE.

Результаты

Характеристика использованных наночастиц. Морфологию и размеры Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} и Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} (см. рис. 1, а) изучали с помощью ПЭМ. Коллоидный раствор Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} сформирован частицами кубической формы. По результатам межплоскостных измерений этот образец состоял из частиц с размерами 50–80 нм, имеющих оформленную кристаллическую решетку, соответствующую сложному оксиду марганца (II, III) Mn_3O_4 (см. рис. 1, а). Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} представлял собой коллоидный раствор агломератов сферических частиц с размерами от 30 до 100 нм. Результаты измерения межплоскостных расстояний и низкого контраста частиц на ПЭМ-изображениях позволяют заключить, что эти частицы имеют аморфную структуру (см. рис. 1, а).

Параметры кристаллической решетки трех образцов частиц исследованы методом порошковой дифрактометрии. Идентификация фаз осуществлялась с использованием

базы данных программы Match!, разработанной фирмой Crystal Impact. Установлено, что коллоид Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} является монофазным оксидом марганца Mn_3O_4 (см. рис. 1, а). Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} имели слабо сформированную кристаллическую решетку, соответствующую оксиду марганца Mn_3O_4 .

Все использованные для интраназального введения образцы частиц находились в коллоидном состоянии. Гидродинамический радиус частиц в суспензии измеряли перед каждой аппликацией методом динамического светового рассеяния. Дзета-потенциал (ζ) определяли с помощью электрофореза в U-образной кювете. Достоверных отличий по этим параметрам в использованных образцах не установлено (см. рис. 1, а).

Для оценки эффективности МРТ-контрастов измеряли $r1$ и $r2$ релаксивность – величины, обратно пропорциональные способности химических соединений сокращать время спин-решетчатой (T1) и спин-спиновой (T2) релаксации. Исследование релаксивности использованных частиц показало, что Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} и Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} не имели статистически значимых различий по данному параметру (см. рис. 1, б). Из полученных данных следует, что для достижения одного и того же уровня МРТ-сигнала необходимо в первом приближении одинаковое количество частиц Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} и Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.}. Для того чтобы оценить вклад в наблюдаемые эффекты возможного частичного растворения кристаллических и аморфных Mn_3O_4 -НЧ, проведена оценка растворимости используемых частиц при различных рН в биологических средах. Показано, что при рН 6.0–7.5 за сутки растворению подвергается менее 0.1 % от массы всех частиц в растворе. При рН = 4.0, соответствующей лизосомальной рН, за сутки растворяется менее 8 % от массы всех частиц в растворе (рис. 2, б, в). Таким образом, учитывая, что рН мукозального слоя колеблется в пределах 6.8–7.8 (Lai et al., 2009), при исследовании проницаемости мукозального слоя для наночастиц растворением Mn_3O_4 -НЧ при взаимодействии с муцином можно пренебречь, а возможный вклад частичного растворения Mn_3O_4 -НЧ в изменение уровня МРТ-сигнала в луковицах мышей после их захвата клетками эпителия будет так или иначе пропорционален количеству захваченных частиц, что может вносить систематическую ошибку в пределах 8 %, но не мешает проводить межгрупповые сравнения.

Интраназальное введение наночастиц марганца. Накопление в ОЭ наночастиц марганца, оцененное как уровень МРТ-сигнала в клетках назального эпителия через 30 мин после введения коллоидных растворов, было достоверно выше для наночастиц Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} по сравнению с таковым для Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} (рис. 3, а, б; LSD-тест, $p < 0.05$).

Назальная аппликация муколитика за 20 мин до введения коллоидных растворов полностью нивелировала различия по уровню МРТ-сигнала в ОЭ между исследуемыми наночастицами. Это было достигнуто за счет того, что введение муколитика, не влияя на накопление в ОЭ Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.}, достоверно усиливало проникновение в ОЭ Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} (см. рис. 3, а). Повторная томография задействованных в экспериментах животных показала, что значения МРТ-сигнала в ОЛ через 12 ч после

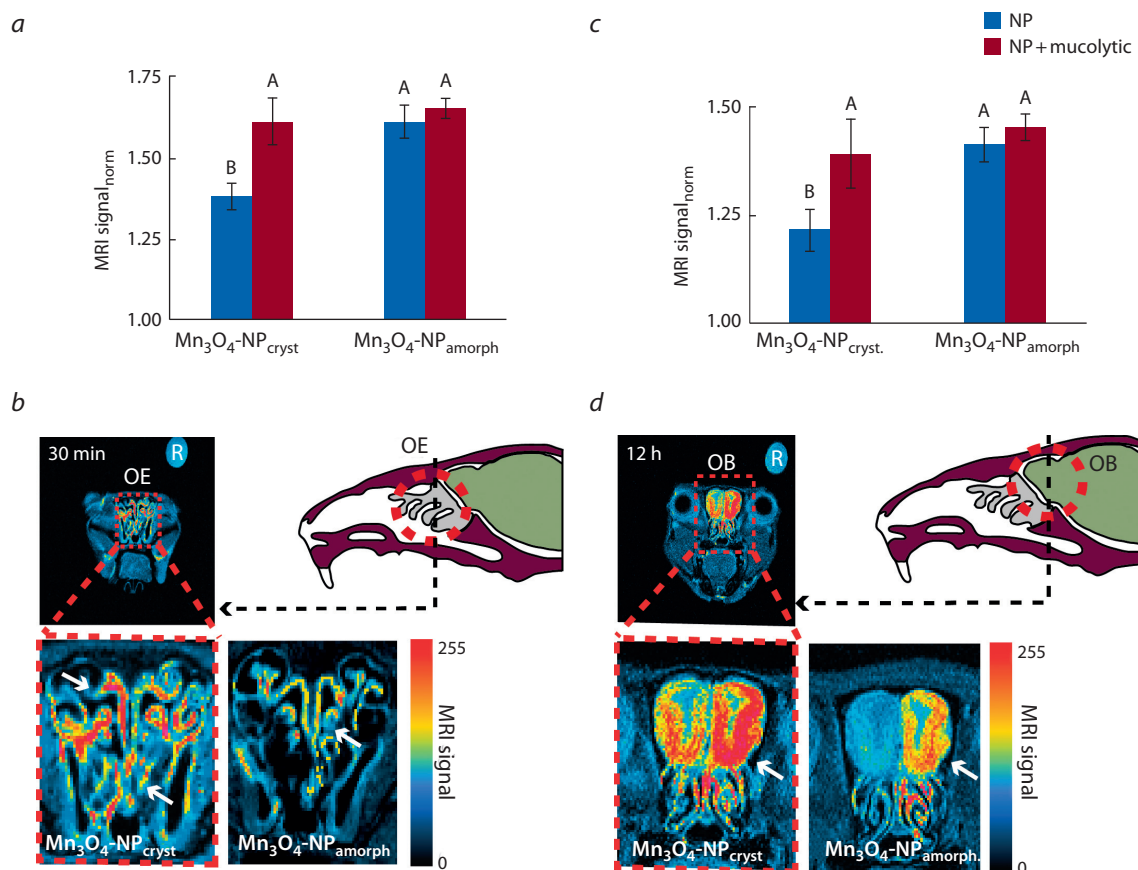


Fig. 3. Accumulation of amorphous and crystalline Mn_3O_4 nanoparticles after intranasal application.

(a) The effect of a mucolytic (dithiothreitol) on the accumulation of amorphous and crystalline particles in OE after intranasal application. The accumulation of nanoparticles in tissues was assessed from MRI responses in T1-weighted images normalized to the reference. (b) Coronal T1-weighted MR images of the nasal cavity taken 30 min after intranasal application of the colloid solution of the particles. (c) The effect of the mucolytic on the accumulation of amorphous and crystalline particles in OB after intranasal application. The accumulation of nanoparticles in tissues was assessed from MRI responses in T1-weighted images normalized to the reference. (d) Coronal T1-weighted MR images of OB taken 12 h after intranasal application of MnO -NP, Mn_2O_3 -NP, and Mn_3O_4 -NP. White arrows indicate hyperintensity sites apparent from the accumulation of manganese oxide particles; R, the reference (phosphate-buffered saline). A, B, significance of differences between mean values (LSD test, $p < 0.05$). *Differences significant at $p < 0.05$ according to the Student t test.

апликация наночастиц высокодостоверно коррелировала ($r = 0.82$) с уровнем МРТ-сигнала в ОЭ, измеренным через 30 мин после введения наночастиц (см. рис. 3, в). При этом в экспериментах без предварительного введения муколитика большее накопление марганца отмечено для Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} по сравнению с Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} (см. рис. 3, в, г). Как и в случае с ОЭ, предварительное введение муколитика нивелировало различия между группами по уровню МРТ-сигнала в ОЛ (см. рис. 3, в).

Обсуждение

Эффективность нейронального захвата и транспорта наночастиц во многом зависит от их свойств – размера, гидрофобности, дзета-потенциала (Lai et al., 2009). Менее изучена роль кристаллической или аморфной структуры наночастиц. В данной работе проведено сравнительное исследование способности к перемещению из носовой полости в мозг аморфных и кристаллических наночастиц оксидов марганца. Полуколичественная оценка их накопления выполнена на основе значений позитивного

контраста на T1-взвешенных МРТ-изображениях ОЭ. Как следует из наших результатов, величина МРТ-сигнала высокодостоверно коррелирует с содержанием марганца в тканях мозга (Moshkin et al., 2014).

Поскольку значительных различий в контрастных свойствах (релаксивности) и размере (гидродинамический радиус, диаметр «зерен») используемых наночастиц не наблюдалось, можно заключить, что для достижения одного и того же уровня МРТ-сигнала в ОЛ и ОЭ необходимо одно и то же количество наночастиц. Таким образом, мы показали, что проникновение Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} из носовой полости в мозг происходит более эффективно по сравнению с Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.}

Первым барьером на пути проникновения наночастиц из носовой полости в мозг является мукозальный слой, покрывающий поверхность ОЭ. На эффективность проникновения через мукозальный слой и последующего ольфакторного захвата твердых частиц могут влиять как их размеры, химический состав и поверхностный заряд, так и менее очевидные свойства, как, например, структура

кристаллической решетки. Ранее было продемонстрировано, что в ЦНС с помощью назального транспорта проникают в мозг преимущественно ультратонкие частицы размером < 0.2 мкм (Mistry et al., 2009). Известно, что частицы с отрицательным и нейтральным поверхностным зарядом преодолевают мукозальный слой лучше, чем частицы с положительным зарядом (Norris, Sinko, 1997; Mistry et al., 2009). Кроме того, показано, что совместное использование наночастиц и муколитиков, меняющих вязкость продуцируемой слизи, увеличивает эффективность проникновения частиц через мукозальный слой (Ferrari et al., 2001).

Для проверки гипотезы о том, что наблюдаемые различия в накоплении интраназально введенных наночастиц в головном мозге связаны с более эффективным проникновением аморфных частиц через мукозальный слой по сравнению с кристаллическими, мы предварительно обрабатывали носовую полость раствором муколитика. Согласно полученным результатам, интраназальное введение муколитика не повлияло на эффективность проникновения аморфных Mn_3O_4 -НЧ, увеличив при этом накопление в ОЭ и ОЛ кристаллических Mn_3O_4 -НЧ. Учитывая отсутствие значимых различий по гидродинамическим размерам и поверхностному потенциалу между кристаллическими и аморфными наночастицами, можно предположить, что большее накопление Mn_3O_4 -НЧ_{аморф.} в ОЛ при их интраназальной аппликации обусловлено тем, что для этих частиц мукозальный слой ОЭ более проницаем в сравнении с Mn_3O_4 -НЧ_{кристал.} Возможно, гидрофильность аморфных частиц выше, чем кристаллических, что, как следует из данных, полученных *in vitro*, может значительно увеличить интенсивность их проникновения через мукозальный слой (Lai et al., 2009). Это подтверждается рядом теоретических и экспериментальных исследований, в которых показано, что по мере уменьшения степени упорядоченности кристаллической структуры химического соединения возрастает его гидрофильность (Hancock, Parks, 2000; Gupta et al., 2004; Good, Rodríguez-Hornedo, 2009; Murdande et al., 2010). Кроме того, для некоторых слаборастворимых фармпрепаратов показано, что использование более гидрофильных аморфных форм позволяет увеличить по сравнению с кристаллическими биодоступность соединения за счет увеличения концентрации частиц в предьявляемом коллоидном растворе (Miyazaki et al., 1975; Yang et al., 2010).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что аморфные и кристаллические наночастицы оксидов марганца существенно различаются по эффективности преодоления мукозального слоя ОЭ и, соответственно, по способности к проникновению из носовой полости в мозг. Эти сведения могут быть полезны при разработке подходов к оценке токсикологической опасности воздушной среды, поскольку известно, что в состав промышленных твердых аэрозолей входят не только кристаллические, но и аморфные формы оксидов металлов (Minni et al., 1984; Antonini et al., 2006). Кроме того, понимание существенного влияния мукозального слоя на эффективность транспорта наночастиц может найти приложение при разработке ингаляционных методов терапевтического воздействия.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-74-10081. Work in the Shared Access Center was supported by the Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Antonini J.M., Santamaria A.B., Jenkins N.T., Albin E., Lucchini R. Fate of manganese associated with the inhalation of welding fumes: potential neurological effects. *Neurotoxicology*. 2006;27(3):304-310.
- Barman S.C., Singh R., Negi M.P.S., Bhargava S.K. Fine particles (PM_{2.5}) in ambient air of Lucknow city due to fireworks on Diwali festival. *J. Environ. Biol.* 2009;30(5):625-632.
- Borm P.J.A. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. *Inhal. Toxicol.* 2002;14(3):311-324.
- Brook R.D., Bard R.L., Burnett R.T., Shin H.H., Vette A., Croghan C., Phillips M., Rodes C., Thornburg J., Williams R. Differences in blood pressure and vascular responses associated with ambient fine particulate matter exposures measured at the personal versus community level. *Occup. Environ. Med.* 2010;68:224-230.
- Chen Z., Meng H., Xing G., Yuan H., Zhao F., Liu R., Chang X., Gao X., Wang T., Jia G. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population. *Environ. Sci. Technol.* 2008;42(23):8985-8992.
- Crater J.S., Carrier R.L. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromol. Biosci.* 2010;10(12):1473-1483.
- Donaldson K., Brown D., Clouter A., Duffin R., MacNee W., Renwick L., Tran L., Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 2002;15(2):213-220.
- Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ. Health Perspect.* 2006;114(8):1172-1178.
- Evdokov O.V., Titov V.M., Tolochko B.P., Sharafutdinov M.R. In situ time-resolved diffractometry at SSTRC. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A.* 2009;603(1):194-195.
- Ferrari S., Kitson C., Farley R., Marriott C., Parkins D.A., Scarpa M., Wainwright B., Evans M.J., Colledge W.H. Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium. *Gene Therapy*. 2001;8(18):1380-1386.
- Genter M.B., Newman N.C., Shertzer H.G., Ali S.F., Bolon B. Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicol. Pathol.* 2012;40(7):1004-1013.
- Good D.J., Rodríguez-Hornedo N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2009;9(5):2252-2264.
- Gupta P., Chawla G., Bansal A.K. Physical stability and solubility advantage from amorphous celecoxib: the role of thermodynamic quantities and molecular mobility. *Mol. Pharm.* 2004;1(6):406-413.
- Hancock B.C., Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.* 2000;17(4):397-404.
- Heusinkveld H.J., Wahle T., Campbell A., Westerink R.H.S., Tran L., Johnston H., Stone V., Cassee F.R., Schins R.P.F. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology*. 2016;56:94-106.
- Iqbal A., Ahmad I., Khalid M.H., Nawaz M.S., Gan S.H., Kamal M.A. Nanoneurotoxicity to nanoneuroprotection using biological and computational approaches. *J. Environ. Sci. Health. C.* 2013;31(3):256-284.
- Kampfrath T., Maisey A., Ying Z., Shah Z., Deiluisi J.A., Xu X., Kherada N., Brook R.D., Reddy K.M., Padture N.P. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. *Circ. Res.* 2011;108(6):716-726.

- Kittelson D.B., Watts W.F., Johnson J.P. Nanoparticle emissions on Minnesota highways. *Atmos. Environ.* 2004;38(1):9-19.
- Kreyling W.G. Discovery of unique and ENM-specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016;299:41-46.
- Lai S.K., O'Hanlon D.E., Harrold S., Man S.T., Wang Y.-Y., Cone R., Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(5):1482-1487.
- Lai S.K., Wang Y.-Y., Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009;61(2):158-171.
- Minni E., Gustafsson T.E., Koponen M., Kalliomaki P.-L. A study of the chemical structure of particles in the welding fumes of mild and stainless steel. *J. Aerosol Sci.* 1984;15(1):57-68.
- Mistry A., Glud S.Z., Kjems J., Randel J., Howard K.A., Stolnik S., Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J. Drug Targeting.* 2009;17(7):543-552.
- Miyazaki S., Hori R., Arita T. Physico-chemical property and gastrointestinal absorption of some solid phases to tetracycline. *Yakugaku Zasshi.* 1975;95(6):629.
- Morales J.A., Herzog S., Kompter C., Frese K., Rott R. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol.* 1988;177(2):51-68.
- Moshkin M.P., Petrovski D.V., Akulov A.E., Romashchenko A.V., Gerlinskaya L.A., Ganimedov V.L., Muchnaya M.I., Sadovsky A.S., Koptuyug I.V., Savelov A.A. Nasal aerodynamics protects brain and lung from inhaled dust in subterranean diggers, *Ellobius talpinus*. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2014;281(1792). DOI 10.1098/rspb.2014.0919.
- Murdande S.B., Pikal M.J., Shanker R.M., Bogner R.H. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: I. A thermodynamic analysis. *J. Pharm. Sci.* 2010;99(3):1254-1264.
- Norris D.A., Sinko P.J. Effect of size, surface charge, and hydrophobicity on the translocation of polystyrene microspheres through gastrointestinal mucin. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997;63(11):1481-1492.
- Parmalee N.L., Aschner M. Manganese and aging. *Neurotoxicology.* 2016;56:262-268.
- Patchin E.S., Anderson D.S., Silva R.M., Uyeminami D.L., Scott G.M., Guo T., Van Winkle L.S., Pinkerton K.E. Size-dependent deposition, translocation, and microglial activation of inhaled silver nanoparticles in the rodent nose and brain. *Environ. Health Persp.* 2016;124(12):1870. DOI 10.1289/EHP1234.
- Ryzhikov A.B., Ryabchikova E.I., Sergeev A.N., Tkacheva N.V. Spread of Venezuelan equine encephalitis virus in mice olfactory tract. *Arch. Virol.* 1995;140(12):2243-2254.
- Sharma V., Kumar A., Dhawan A. Nanomaterials: exposure, effects and toxicity assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B: Biol. Sci.* 2012;82(1):3-11.
- Stroop W.G., Rock D.L., Fraser N.W. Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory systems of the mouse central nervous system during acute and latent infections by in situ hybridization. *Lab. Invest.* 1984;51(1):27-38.
- Trickler W.J., Lantz S.M., Schrand A.M., Robinson B.L., Newport G.D., Schlager J.J., Paule M.G., Slikker W., Biris A.S., Hussain S.M. Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine.* 2012;7(6):835-846.
- Wu J., Wang C., Sun J., Xue Y. Neurotoxicity of silica nanoparticles: brain localization and dopaminergic neurons damage pathways. *ACS Nano.* 2011;5(6):4476-4489.
- Yang W., Johnston K.P., Williams R.O. Comparison of bioavailability of amorphous versus crystalline itraconazole nanoparticles via pulmonary administration in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010;75(1):33-41.