

Эффективность ольфакторного транспорта наночастиц оксида марганца (II) при однократном или многократном интраназальном введении

А.В. Ромащенко^{1,2}✉, М.Б. Шарапова¹, Д.В. Петровский¹, М.П. Мошкин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

В экспериментах с многократным ингаляционным введением наноразмерных частиц оксидов металлов показано отсутствие значимой взаимосвязи между количеством предъявлений и концентрацией металла в обонятельных луковицах. Это обстоятельство ставит вопрос о возможном снижении эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием при повторных поступлениях в носовую полость. В данной работе проведено сравнение эффективности назального транспорта магнитоконтрастных наночастиц при их однократном и многократном интраназальном введении и оценено их воздействие на морфофункциональные характеристики ольфакторной системы. Согласно полученным данным, накопление MnO-NЧ в обонятельных луковицах мышей снижается при их повторных интраназальных аппликациях. Кроме того, снижение эффективности ольфакторного транспорта, наблюдаемое при многократном введении MnO-NЧ, частично восстанавливается при интраназальной аппликации муколитика (0.01 M N-ацетил-L-цистеин). При этом концентрация частиц в обонятельных луковицах была пропорциональна объему данной структуры, который, в частности, зависит от количества синаптических контактов между обонятельными луковицами и ольфакторным эпителием. Следует отметить, что при многократном введении MnO-NЧ у мышей снижается толщина ольфакторного эпителия. Таким образом, при многократном интраназальном введении MnO-NЧ снижается эффективность ольфакторного транспорта наночастиц из носовой полости в мозг, что сочетается с увеличением вязкости мукозального слоя и снижением количества синаптических контактов между обонятельными луковицами и ольфакторным эпителием. Полученные результаты свидетельствуют о наличии естественных механизмов защиты ольфакторного эпителия от проникновения патогенов и ксенобиотиков и позволяют сформулировать конкретные практические рекомендации, касающиеся интраназальной аппликации лекарственных препаратов.

Ключевые слова: наночастицы; интраназальное введение; магнитно-резонансная томография; назальный транспорт.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ромащенко А.В., Шарапова М.Б., Петровский Д.В., Мошкин М.П. Эффективность ольфакторного транспорта наночастиц оксида марганца (II) при однократном или многократном интраназальном введении. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(3):304-311. DOI 10.18699/VJ17.248

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Romashchenko A.V., Sharapova M.B., Petrovskii D.V., Moshkin M.P. Olfactory transport efficiency of the manganese oxide nanoparticles (II) after their single or multiple intranasal administrations. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):304-311. DOI 10.18699/VJ17.248

Received 05.10.2016
Accepted for publication 15.12.2016
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: arom@bionet.nsc.ru

Olfactory transport efficiency of the manganese oxide nanoparticles (II) after their single or multiple intranasal administrations

A.V. Romashchenko^{1,2}✉, M.B. Sharapova¹,
D.V. Petrovskii¹, M.P. Moshkin¹

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

² Institute of Computational Technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia

In experiments with reusable inhalation of nano-sized metal oxide particles, it has been shown that there is no significant relationship between the number of presentations and the metal concentration in the olfactory bulb. This fact raises the question of a possible decrease in the efficiency of particulate capturing by the olfactory epithelium after their repeated application into the nasal cavity. In this study, we compared the effectiveness of nasal transport of paramagnetic nanoparticles after their single and multiple intranasal administration and evaluated their effects on the morphological and functional characteristics of the olfactory system. Based on the data, the accumulation of MnO-NPs in the olfactory bulb of mice was reduced after repeated intranasal application. In addition, the decrease in the efficiency of olfactory transport observed after repeated administration of MnO-NPs was partially restored by intranasal application of mucolytic (0.01 M N-acetyl-L-cysteine). In this case, the concentration of particles in the olfactory bulb was proportional to the volume of the structure, which in particular depends on the number of synaptic contacts between the mitral cell of the olfactory bulb (OB) and olfactory epithelium (OE). It should be noted that multiple intranasal injections of MnO-NPs reduce mouse OE thickness. Thus, repeated intranasal introduction of MnO-NPs reduces the efficiency of nanoparticle olfactory transport from the nasal cavity to the brain, which is combined with the increase in the viscosity of the mucosal layer and the reduction in the number of synaptic contacts between OB and OE. These results indicate the presence of the natural mechanisms of protection against the penetration of pathogens and xenobiotics into the olfactory epithelium; they also allow us to formulate practical recommendations on intranasal drugs delivery.

Key words: nanoparticles; intranasal administration; magnetic resonance imaging; nasal transport.

В процессе своей жизнедеятельности организм постоянно подвергается воздействию твердых аэрозолей (ТА), в состав которых могут входить разнообразные ксенобиотики. Оседая на слизистых верхних и нижних дыхательных путей, различные компоненты ТА способны проникать в кровь и, как следствие, накапливаться во внутренних органах. Кроме того, целый ряд твердых частиц различной природы (вирусы, оксиды металлов и т. д.) способен проникать в центральную нервную систему (ЦНС) в обход гемато-энцефалического барьера с поверхности слизистой носовой полости (Sherry Chow et al., 2008; Minoshima, Cross, 2008). Предположительно, механизм подобного транспорта заключается в захвате введенного соединения клетками ольфакторного эпителия и последующем перемещении в более глубокие структуры мозга. В ЦНС с помощью назального транспорта проникают преимущественно ультратонкие частицы размером < 0.5 мкм (Mistry et al., 2009). Известно, что несколько групп вирусов попадают в ЦНС млекопитающих главным образом через ольфакторный путь. В экспериментах на обезьянах, которых интраназально заражали вирусом полиомиелита, были получены первые доказательства прямого поступления наноаэрозолей из носовой полости в мозг. Однако разрушение ольфакторного эпителия сульфатом цинка предотвращало проникновение вируса в мозг (Faber et al., 1944). В ряде работ продемонстрировано, что интраназальная аппликация мышам и крысам наночастиц оксидов марганца, титана и кремния также приводит к их накоплению в головном мозге, и в первую очередь в ольфакторных луковицах (Oberdorster et al., 2004; Elder et al., 2006; Wang et al., 2008; Wu et al., 2011). Отмечено также, что ингаляция наноразмерного аэрозоля оксида марганца животным с окклюзией одной ноздри сопровождается существенным ростом концентрации металла в ольфакторной луковице, расположенной ипсилатерально по отношению к открытому носовому ходу. В контралатеральной луковице содержание Mn остается на уровне контроля (Elder et al., 2006).

При сравнении токсичности растворимых и нерастворимых форм различных ксенобиотиков были обнаружены определенные особенности. На культуре клеток A549 было показано, что суперпарамагнитные частицы железа способны вызывать одноцепочечные разрывы ДНК. Токсичность твердых частиц может также проявляться в том, что, проникая в клетку с помощью эндоцитоза, они подвергаются частичному растворению и тем самым создают более высокую локальную концентрацию ионов (Chattopadhyay et al., 2015). Кроме того, в исследовании, проведенном на культуре клеток PC-12, продемонстрировано, что как оксид марганца (40 нм), так и хлорид марганца (II) снижает концентрацию дофамина и его метаболитов, при этом концентрация свободных радикалов в пять раз выше при добавлении в культуру оксида марганца по сравнению с аналогичной дозой $MnCl_2$ (Hussain et al., 2006). Помимо того, целый ряд неорганических наночастиц способен при попадании внутрь клетки подавлять активность митохондрий (Hussain et al., 2006). Таким образом, проникновение твердых частиц бактериальной, вирусной или неорганической природы из носовой полости в мозг может провоцировать развитие различных неврологических

нарушений. Так, одним из первых симптомов развития ряда деменций (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др.) является нарушение восприятия запаховых стимулов, поэтому воздействия факторов среды, в том числе компонентов вдыхаемых аэрозолей, рассматривают в качестве возможных экологических факторов риска для данных заболеваний (Calderón-Garcidueñas et al., 2013).

В экспериментах с многократным ингаляционным введением наноразмерных частиц оксидов металлов показано отсутствие значимой взаимосвязи между количеством предьявлений и концентрацией металла в обонятельных луковицах (Elder et al., 2006; Yu et al., 2007). Это косвенно указывает на снижение захвата твердых частиц ольфакторным эпителием в процессе их многократного поступления в носовую полость. Однако среди научных публикаций отсутствуют работы, посвященные прямому изучению изменений ольфакторного транспорта наночастиц при их повторных ингаляциях.

Наиболее вероятный путь проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг – нейрональный захват (ольфакторные нейроны, нейроны тройничного нерва) и их последующий аксональный трансинаптический транспорт в более глубокие структуры мозга. Участие клеточного транспорта в перемещении твердых частиц из носовой полости в мозг было показано на примере интраназальной аппликации вирусных наночастиц, которое нарушается при введении ингибиторов аксонального транспорта и индуцированном апоптозе ольфакторных нейронов (Faber et al., 1944). Кроме физико-химических свойств самих частиц, на эффективность назального транспорта компонентов ТА влияет их взаимодействие с мукозальным слоем ольфакторного эпителия, проницаемость которого в первую очередь определяется вязкостью секрета, продуцируемого клетками желез назального эпителия, и интенсивностью продукции слизи. Возрастание вязкости продуцируемой слизи является одним из основных симптомов таких заболеваний, как муковисцидоз и хроническая обструктивная болезнь легких, а увеличение интенсивности продукции секрета наблюдается, например, при различных видах ринита (аллергический, вазомоторный и др.) (Kim, Ho, 2010). Данных о влиянии ТА на морфофункциональное состояние мукозального слоя слизистых практически нет.

Марганец (II) способен уменьшать время релаксации протонов при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ), что позволяет довольно точно определить места его локализации при различных способах введения. Опираясь на это свойство марганцевых соединений, ранее нами было показано, что через 12 ч после однократного интраназального введения мышам магнитоконтрастных наночастиц оксида марганца ($MnO-NЧ$) наблюдается значительное увеличение уровня МРТ-сигнала в обонятельных луковицах животных вследствие увеличения концентрации марганца в данных структурах (Moshkin et al., 2014). Поскольку оксиды марганца – крайне слабо-растворимые соединения даже при лизосомальных рН ($pH \sim 4.0$ (Elder et al., 2006)), наблюдаемое нами увеличение МРТ-сигнала в обонятельных луковицах мыши было связано с накоплением именно частиц марганца, а не ионов (Mn^{2+}). В данном исследовании, с использованием

T1-взвешенной МРТ, *in vivo* охарактеризовано накопление MnO-НЧ в обонятельных луковицах и ольфакторном эпителии мыши при их однократном и многократном интраназальном введении. Далее с помощью поведенческого тестирования и гистологических методов были описаны изменения запахового восприятия и морфологических характеристик ольфакторного эпителия при однократном и многократном интраназальном предъявлении наночастиц. Для оценки состояния ольфакторного эпителия использовались два параметра: его толщина, которая изменяется при массовой гибели обонятельных нейронов (Hurt et al., 1988), и объем обонятельных луковиц, который, в частности, определяется количеством синаптических контактов между ольфакторными нейронами и митральными клетками (внешний плексиморфный слой (Bhatnagar et al., 1987)).

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEF161914X0005). Эксперименты поставлены на самцах мышей SPF-статуса инбредной линии C57BL/6J в возрасте 12–14 нед. (28–32 г). После отсадки в 3-недельном возрасте и до исследований мышей содержали группами по пять особей одного пола в стандартных 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.

Интраназальное введение MnO. Для получения наночастиц MnO (MnO-НЧ) к 0.5 мл 0.2 М раствора MnCl₂, содержащего 12 % Tween 20, добавляли 0.5 мл 0.4 М раствора КОН, 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 12000 об./мин в течение 15 мин. После удаления надосадочной жидкости к осадку частиц добавляли деионизированную воду в объеме, равном объему исходного раствора, и соницировали в течение 1 ч при температуре 22 °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 раствор MnO-НЧ. Количество Tween 20 в получившемся коллоиде определяли с помощью UV-спектрофотометрии (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, США) на длинах волн 210–280 нм, где интенсивность светопоглощения данного соединения максимальна (Xia, Xu, 2006). Исходя из полученных данных, концентрация Tween 20 в растворе MnO-НЧ после отмывок не превышала 0.5 %. Таким образом, суточная доза полисорбата-20, которую получали животные в эксперименте, составляла 2 мг/кг, что на порядок ниже максимально допустимой суточной дозы 25 мг/кг (Bartsch et al., 1975). Физико-химические характеристики использованных частиц представлены на рис. 1.

Морфологию и размеры MnO-НЧ (см. рис. 1, а) изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии

JEM 1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой Veleta (SIS, Германия). Препараты сорбировали в течение 30 с на медные сетки (copper grids), покрытые формваровой пленкой (formvar-coated), стабилизированной напылением углерода с помощью Vacuum Evaporator JEE-420 (JEOL, Япония). Излишки жидкости удаляли фильтровальной бумагой, сетки высушивали на воздухе. В каждом препарате определяли средний размер НЧ путем измерения 100 частиц с четкими границами с помощью программы iTEM, версия 5.2 (JEOL, Япония). Средний диаметр (Mean ± SD) MnO-НЧ составлял 138 ± 53 нм (см. рис. 1, а). Характеристику кристаллической решетки использованных в работе наночастиц (Mn₃O₄-НЧ, Mn₂O₃-НЧ, MnO-НЧ) проводили с помощью порошковой дифрактометрии на станции синхротронного излучения (ВЭПП-3, ИЯФ СО РАН) (Evdokov et al., 2009). Это метод, основанный на рентгеновской дифракции, наиболее подходит для идентификации и характеристики кристаллических фаз в веществе. Дифракцию от образца снимали в монохроматическом излучении с длиной волны 0.1516 нм в диапазоне углов от 45 до 75°. Идентификация фаз осуществлялась с использованием базы данных программы Match, разработанной фирмой Crystal Impact. Было установлено, что коллоид является монофазным оксидом марганца MnO и частицы, входившие в его состав, не имели сформированной кристаллической решетки.

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

Марганец является парамагнетиком, поэтому способен сокращать время спин-решетчатой релаксации (T1). Для MnO-НЧ были получены характеристические времена релаксации на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл. Обратная величина релаксации (T1⁻¹, мс⁻¹) находилась в прямо пропорциональной зависимости от концентрации марганца для MnO-НЧ (см. рис. 1, в).

Схема экспериментов. При исследовании накопления MnO-НЧ в обонятельных луковицах мышей ненаркотизированным животным вводили в одну (эксперимент с однократным введением) или в обе ноздри (эксперимент с многократным введением) коллоидные растворы наночастиц по 10 мкл на ноздрю.

При однократном интраназальном введении физиологический раствор (группа 1, n = 6) или коллоидный раствор наночастиц (группа 2, n = 6) вводился в одну ноздрю за 12 ч до МРТ-сканирования. С помощью полученных T1-взвешенных МРТ-изображений определяли накопление наночастиц в ткани. Ранее нами была показана высокодоверная корреляция между уровнем МРТ-сигнала и концентрацией наночастиц MnO в ткани (Moshkin et al., 2014). Также с помощью T1-взвешенных МРТ-изображений у мышей определяли накопление MnO-НЧ в ольфакторном эпителии. Далее оценивали поведенческий ответ каждой особи на запах воды и загрязненной самками (C57BL/6J) подстилки. После окончания всех тестов животных групп забивали и отбирали гистологический материал для определения толщины ольфакторного эпителия.

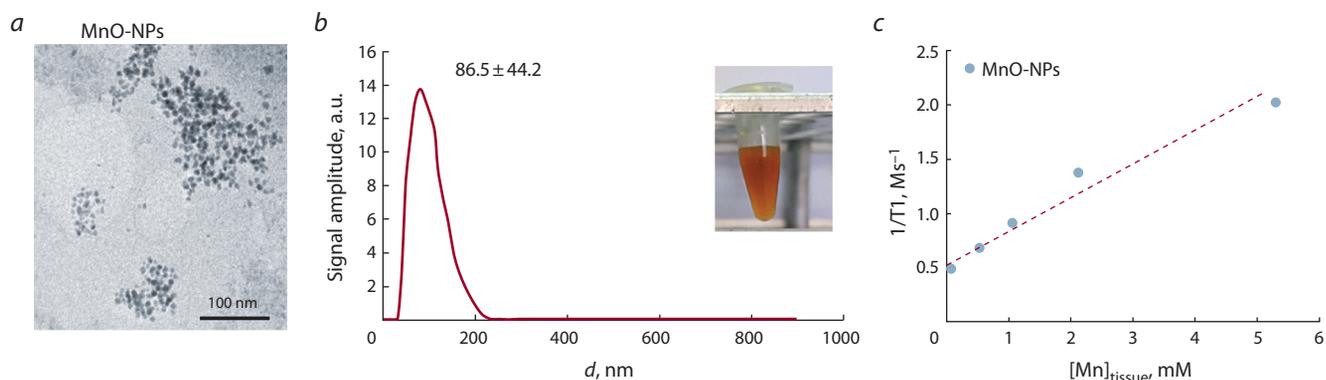


Fig. 1. Physicochemical characteristics of MnO-NPs.

(a) transmission electron microscopy of MnO-NPs; (b) characterization of the distribution of MnO-NPs hydrodynamic radius values in colloidal solution by dynamic light scattering; (c) characterization of MnO-NPs as an MRI contrast (dependence of the proton spin-lattice relaxation time (T1) on manganese concentration in aqueous colloidal MnO-NP solution).

При исследовании накопления наночастиц в обонятельных луковицах при многократном введении MnO-НЧ коллоидный раствор частиц вводили мышам (группа 3, $n = 6$) в одну ноздрю в объеме 10 мкл. Интраназальную аппликацию наночастиц проводили в течение 6 недель два раза в неделю, так чтобы между введениями проходило не менее 2 дней. Таким образом, общее количество введений (n) составило 12. После 12-го введения мышам проводили МРТ-исследование и с помощью T1-взвешенных изображений оценивали накопление MnO-НЧ в обонятельных луковицах и ольфакторном эпителии. Далее в ольфакторном тесте исследовали поведенческий ответ каждой особи на запах загрязненной самками (C57BL/6J) подстилки.

Для исследования влияния муколитика на захват частиц, мышам группы 3 по окончании поведенческого тестирования интраназально вводили в каждую ноздрю по 10 мкл 0.01 М N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ®), после чего через 20 мин в одну ноздрю вводили 10 мкл MnO-НЧ и через 12 ч проводили МРТ-сканирование. После окончания всех тестов животных группы 3 забивали и отбирали гистологический материал для определения толщины ольфакторного эпителия.

МРТ-исследования. Накопление MnO-НЧ в обонятельных луковицах мыши было исследовано с помощью магнитно-резонансной томографии 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 с помощью 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 глубину наркоза.

Информация о распределении марганца по структурам мозга мыши была получена по результатам T1-взвешенных изображений с использованием метода FLASH (fast low angle shot). Параметры импульсной последователь-

ности метода: TE = 2.5 мс, TR = 200 мс; параметры изображения: размер 2.5 × 2.5 см, матрица 512 × 512 точек, толщина среза 0.5 мм, расстояние между срезами 0.5 мм, количество срезов 15, ориентация срезов аксиальная; общее время сканирования 6 мин.

Для приведения к нормальному распределению значения интенсивности МРТ-сигнала логарифмировали – $\log_2(\text{МРТ-сигнал})$. Обработку МРТ-сканов проводили в программе ImageJ.

Ольфакторный тест выполнялся по модифицированной схеме habituation–dishabituation (Schellinck et al., 1995). Поведенческое тестирование проводили через двое суток после МРТ-сканирования и наркотизации. Клетку с чистым подстилом и двумя пустыми пробирками (1.5 мл), прикрепленными с помощью скотча к противоположным стенкам клетки, помещали под вытяжку. Далее тестируемому животному давали свободно перемещаться по клетке в течение 10 мин, после чего, не вынимая животное из клетки, в пробирки аккуратно помещали запаховый стимул. Далее в течение 2 мин с помощью цифровой камеры регистрировали поведение животного. В качестве запаховых стимулов использовали дистиллированную воду и загрязненную подстилку из клетки, где в течение 5 дней содержалось 5 самок, возраст которых составлял 10–12 недель. Для оценки поведенческого ответа животного на предоставляемые запаховые стимулы на полученных видеозаписях подчитывали время обнюхивания каждой пробирки. Обнюхиванием считалось вставание на задние лапки непосредственно рядом с запаховым стимулом (рис. 2, з).

Гистология носовой полости. После проведения МРТ и поведенческих тестов животное умерщвляли, используя 100 % углекислый газ, который подавали в герметично закрытую клетку с животным внутри в течение как минимум 2 мин со скоростью 200 мл/мин. Перед отделением головы от туловища носовую полость мыши промывали 10 % забуференным формалином, после чего череп с удаленными мягкими тканями и мышцами помещали в 4 % формалин и держали в нем не менее суток. Затем проводили декальцинацию с помощью раствора «Трилон-Б» в течение 4 сут, после чего череп заливали парафином, готовили коронар-

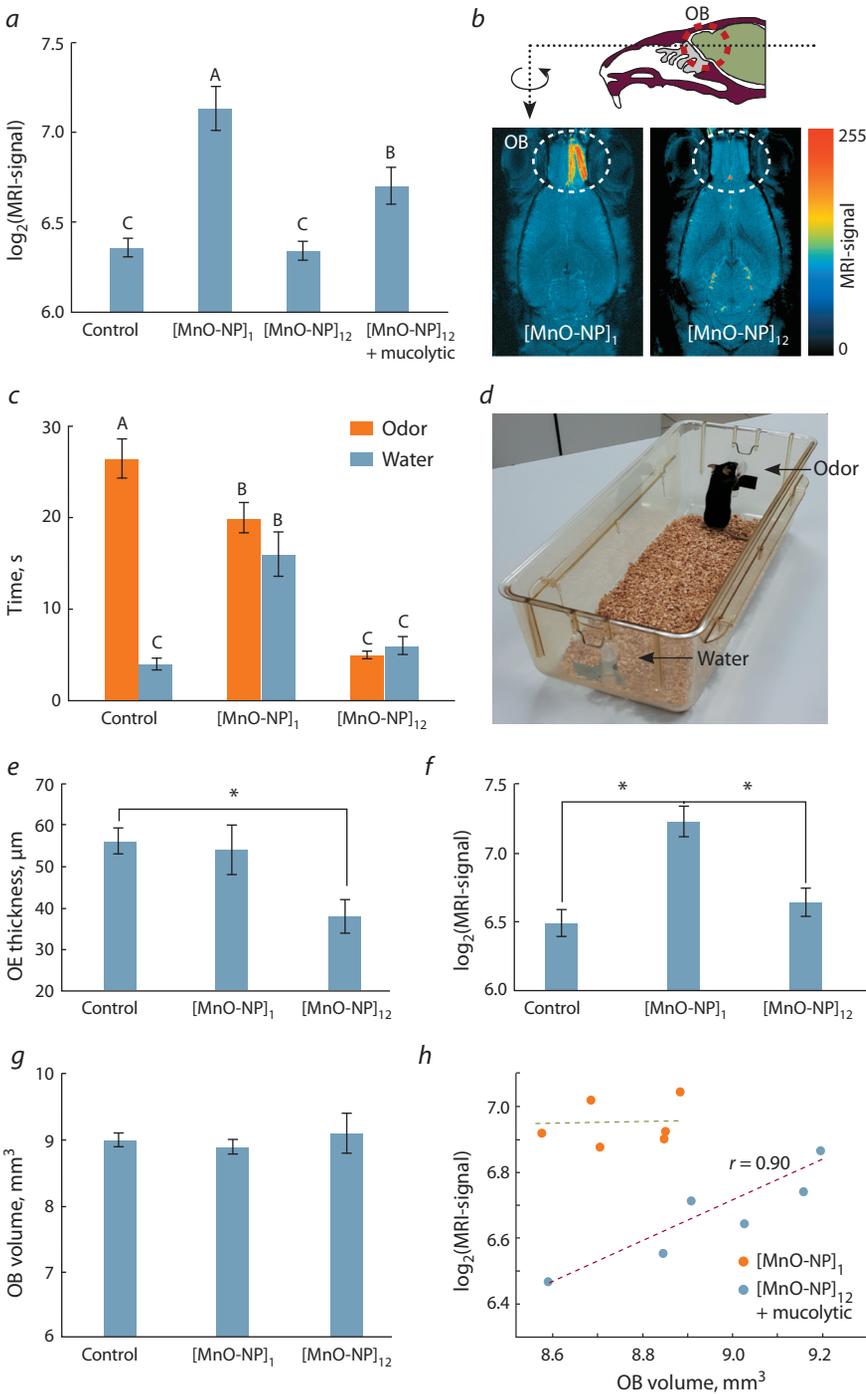


Fig. 2. Comparison of the efficiency of MnO-NP olfactory transport after single and multiple intranasal NP administration and characterization of the factors influencing this process.

(a) MRI signal intensity in a mouse olfactory bulb (OB) 12 hours after MnO-NPs administration. (b) Coronal T1-weighted MR images of MnO-NP accumulation in OB taken 12 hours after intranasal NP administration. (c) The behavioral response of C57BL/6J males of groups 1–3 to the odor of females' litter and distilled water. (d) The device for olfactory testing. (e) Comparison of olfactory epithelium thickness in groups 1–3. (f) The signal level in T1-weighted MR images from the olfactory epithelium region in mice, groups 1–3, recorded 12 hours after MnO-NPs intranasal administration. (g) Comparison of OB volume in individuals of groups 1–3. (h) Correlation coefficient of OB volume with the MRI signal level in OB 12 hours after intranasal MnO-NP administration.

Notes. A, B, C, significant differences (LSD-test, $p < 0.05$). * Significant differences (Student *t* test, $p < 0.05$). Control group (group 1): individuals having been intranasally treated with saline once. [MnO-NP]₁ (group 2) and [MnO-NP]₁₂ (group 3) are animals having been intranasally treated with [MnO-NP]₁ or 12 times, respectively. [MnO-NP]₁₂ + mucolytic drugs are mice from the [MnO-NP]₁₂ – group treated with mucolytic drug 10 μl (0.01M N-acetyl-L-cysteine) 20 minutes prior to intranasal nanoparticle injection.

ные срезы толщиной 5 мкм, которые впоследствии окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологические исследования выполняли с помощью поляризационного микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия) в проходящем свете с цифровой камерой AxioCam ERc5s. Полученные данные анализировали с помощью свободно распространяемого пакета программ ImageJ. Для каждого животного об- считывали по три коронарных гистологических среза носовой полости мыши, сделанных в области ольфакторного эпителия на расстоянии не менее 0.5 мм друг от друга. На каждом срезе проводили измерение толщины ольфакторного эпителия не менее чем в 20 различных участках носовой полости.

Статистика. Для сравнения двух средних использовали *t*-тест Стьюдента. Для множественных сравнений средних использовали LSD-тест (least significant difference). Взаимозависимости исследуемых признаков оценивали с помощью параметрического коэффициента корреляции Пирсона. Данные выражали как средние ± SE.

Результаты

Уровень позитивного MPT-контраста, измеренный в ольфакторных луковицах через 12 ч после однократной интраназальной аппликации MnO-NP (группа 2), существенно превосходил таковой у контрольных особей (см. рис. 2, а, LSD-тест, $p < 0.05$). Вместе с тем после многократного введения наночастиц уровень сигнала не отличался от контроля и был существенно ниже, чем у мышей, которым MnO-NP вводили однократно (см. рис. 2, а, б, LSD-тест, $p < 0.05$).

При исследовании поведенческой реакции на запаховые стимулы было установлено, что только самцы контрольной группы (группа 1) демонстрировали большее время обнюхивания пробирки с подстилкой, загрязненной самками, чем пробирки с водой (см. рис. 2, в, з, LSD-тест, $p < 0.05$). Животные 2-й и 3-й групп тратили одинаковое время на обнюхивание обоих стимулов (LSD-тест, $p > 0.05$). Кроме того, особи 3-й группы в течение теста обнюхивали запаховые стимулы менее продолжительно по сравнению с группами 1 и 2 (см. рис. 2, в, LSD-тест, $p < 0.05$).

Для оценки вклада вязкости мукозального слоя в снижение эффективности захвата наночастиц ольфакторным эпителием при многократном введении MnO-НЧ, животным 3-й группы после окончания ольфакторного тестирования вводили в нос муколитик (0.01 M N-ацетил-L-цистеин), затем через 20 мин интраназально апплицировали MnO-НЧ. Далее через 12 ч проводили повторное МРТ-сканирование. Исходя из полученных результатов, введение муколитика достоверно усилило уровень МРТ-сигнала в обонятельных луковицах животных группы 3 как по сравнению с контролем, так и по сравнению с предыдущим сканированием (LSD-тест, $p < 0.05$). Тем не менее значения МРТ-сигнала в обонятельных луковицах у этих особей были достоверно ниже, чем у животных, которым вводили MnO-НЧ однократно (см. рис. 2, а, LSD-тест, $p < 0.05$).

Для оценки морфологических изменений, происходящих в ольфакторном эпителии и обонятельных луковицах мыши при однократном и многократном интраназальном введении наночастиц, мы использовали Т1-взвешенные МРТ-изображения и гистологические срезы носовой полости животного (см. рис. 2, б–ж). Многократное интраназальное введение MnO-НЧ приводило к достоверному снижению толщины ольфакторного эпителия по сравнению как с контрольной группой животных, так и с особями, которым MnO-НЧ вводили однократно (t-тест Стьюдента, $p < 0.05$). При этом однократное введение наночастиц не влияло на толщину ольфакторного эпителия (см. рис. 2, б, t-тест Стьюдента, $p > 0.05$). Исследование с помощью Т1-взвешенной МРТ накопления MnO-НЧ в обонятельном эпителии показало, что при однократном введении наблюдалось достоверное увеличение МРТ-сигнала в ольфакторном эпителии по сравнению с контрольной группой и с особями, которым MnO-НЧ вводили многократно (см. рис. 2, в, LSD-тест, $p < 0.05$). Ни у одной из трех групп достоверных различий в объемах обонятельных луковиц не обнаружено (см. рис. 2, ж).

Индивидуальные вариации объема и интенсивности МРТ-сигнала в обонятельных луковицах, отражающего накопление марганца, не коррелировали между собой при однократном введении MnO-НЧ. Вместе с тем в группе животных, которым MnO-НЧ вводили многократно, интенсивность накопления марганца в обонятельных луковицах через 12 ч после их совместного с муколитиком интраназального предъявления высокодостоверно коррелировала с объемом обонятельных луковиц (см. рис. 2, з, $r = 0.90$, $p = 0.012$).

Обсуждение

В данной работе нами показано, что однократное интраназальное введение магнито-контрастных MnO-НЧ приводит к значительному увеличению концентрации частиц в обонятельных луковицах мыши. При этом уровень МРТ-сигнала в луковицах мышей контрольной группы и животных, которым вводили MnO-НЧ в течение 6 недель, не различался. В предварительных экспериментах установлено, что концентрация марганца в обонятельных луковицах при однократном интраназальном введении MnO-НЧ за 4 недели снижается до фоновых значений. Исходя из этого можно предположить, что отсутствие раз-

ницы в уровне МРТ-сигнала в обонятельных луковицах контрольной группы мышей и особей, которым многократно вводили MnO-НЧ, является следствием снижения эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием при многократном предъявлении частиц. Подобные результаты были получены в экспериментах с многократным субхроническим ингаляционным введением наноразмерных металлических частиц. Концентрация частиц в обонятельных луковицах в этих экспериментах при интраназальном введении определяется концентрацией частиц в предъявляемом коллоидном растворе, а не количеством аппликаций (Yu et al., 2007). Снижение эффективности захвата частиц окончаниями обонятельных нервов может быть следствием двух независимых процессов: с одной стороны, уменьшения количества ольфакторных рецепторных клеток, которые, вероятнее всего, захватывают твердые частицы с помощью эндоцитоза из носовой полости и перемещают их в более глубокие структуры мозга (Mistry et al., 2009), а с другой стороны, изменения вязкости мукозального слоя, одна из функций которого – защита эпителия от оседающих на его поверхности патогенов и ксенобиотиков (Cone, 2009).

Как говорилось выше, наиболее вероятный путь проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг – это аксональный транспорт. Участие аксонального транспорта в процессе перемещения ксенобиотиков из носовой полости в мозг было продемонстрировано на примере движения вируса полиомиелита, герпеса и интраназального введения хлорида марганца. В обоих случаях предварительное введение в нос колицина, ингибитора полимеризации тубулина, блокировало их накопление в обонятельных луковицах (Faber et al., 1944; Mikloska et al., 1999; Pautler, Koretsky, 2002). В нашей работе для оценки морфологических изменений в ольфакторной системе вследствие интраназальной аппликации наночастиц мы использовали два параметра: толщину ольфакторного эпителия и объем обонятельных луковиц. При массовой гибели ольфакторных нейронов, с одной стороны, должна уменьшиться толщина эпителия (Hurt et al., 1988), с другой, исходя из данных литературы, ольфакторные дисфункции различного генеза (например, инфекционные, токсические, возрастные) приводят к изменению объема обонятельных луковиц за счет снижения количества синаптических контактов между ольфакторными нейронами и митральными клетками (Bhatnagar et al., 1987). Согласно полученным результатам, однократное введение частиц не приводило к значимым морфологическим изменениям толщины ольфакторного эпителия и объема обонятельных луковиц. При этом многократное введение наночастиц мышам достоверно снижало толщину обонятельного эпителия, но на объем ольфакторных луковиц достоверного влияния не оказывало. Учитывая, что при интраназальном введении сульфата цинка изменения в толщине ольфакторного эпителия возможно зафиксировать уже через сутки (Matulionis, 1975), можно заключить, что однократное закапывание MnO-НЧ в нос мыши, в отличие от субхронического, не приводит к достоверным морфологическим изменениям в обонятельном эпителии. Таким образом, гибель клеток в ольфакторном эпителии при многократном введении частиц может вносить вклад

в процесс снижения эффективности захвата и транспорта твердых частиц из носовой полости в мозг.

В нашем эксперименте снижение времени обнюхивания подстилки с запахом самок наблюдалось не только у самцов с выраженными морфологическими изменениями ольфакторного эпителия, которым MnO-NЧ вводили в нос многократно, но и у самцов без выраженных изменений в толщине обонятельного эпителия, которым частицы вводились только один раз. Возможность того, что уже однократное интраназальное введение наночастиц приводит к функциональным нарушениям в работе ольфакторной системы, имеет важное патогенетическое значение. Нарушение обоняния служит диагностическим критерием таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера (Meshulam et al., 1998). Кроме того, у пациентов с подтвержденным клиническим диагнозом «депрессия» наблюдается нарушение в работе ольфакторной системы. При этом ольфакторная дисфункция рассматривается в качестве одной из возможных причин развития депрессии, что подтверждено на различных экспериментальных моделях, в которых у животных искусственно подавляли восприятие запаховых стимулов с помощью бальбэктомии или разрушения обонятельного эпителия, чем вызывали поведенческие, иммунные, эндокринные и биохимические изменения, характерные для депрессивного состояния (Harkin et al., 2003).

Первым барьером на пути проникновения твердых частиц из носовой полости в мозг является мукозальный слой, который представляет собой пористый гель, защищающий поверхность ольфакторного эпителия от проникновения различных патогенов и ксенобиотиков. Показано, что твердые частицы в основном преодолевают мукозальный слой через поры, в которых вязкость секрета значительно ниже, чем в остальной части мукозального геля (Olmsted et al., 2001). Так, при муковисцидозе диаметр и количество пор значительно снижаются, что становится непреодолимым барьером даже для вирусных частиц (Verkman et al., 2003) и причиной очень низкой эффективности *in vivo* генной трансфекции, тем самым затрудняя лечение данного заболевания (Kitson et al., 1999). Для оценки вклада изменения вязкости мукозального слоя в снижение эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием при многократном предъявлении MnO-NЧ, мы использовали муколитик, который при предварительном интраназальном введении значительно повышал интенсивность накопления в обонятельных луковицах мыши введенных в нос MnO-NЧ. Кроме того, в пользу гипотезы об увеличении вязкости мукозального слоя при многократном интраназальном введении наночастиц говорит то, что в отличие мышей, которым MnO-NЧ вводился в нос только один раз, у животных, подвергшихся многократной интраназальной аппликации, предъявление MnO-NЧ без муколитика не вызывало накопления марганца не только в обонятельных луковицах, но и в поддерживающих и рецепторных клетках ольфакторного эпителия (см. рис. 2, а). При этом предварительное введение муколитика усливало накопление частиц во всем ольфакторном эпителии, а не только в ольфакторных нейронах. Полученные результаты свидетельствуют о вкладе процесса увеличения вязкости

мукозального слоя в снижение проницаемости ольфакторного эпителия для наночастиц.

Таким образом, в наблюдаемое нами снижение эффективности захвата твердых частиц ольфакторным эпителием мыши при их многократном интраназальном предъявлении вносят вклад два основных процесса: гибель ольфакторных нейронов и увеличение вязкости мукозального слоя. В пользу совместного действия этих факторов свидетельствует то, что при предварительном интраназальном предъявлении муколитика мышам, которым субхронически вводили в нос MnO-NЧ, транспорт наночастиц в мозг напрямую ($r = 0.90$, см. рис. 2, з) зависел от объема обонятельных луковиц. В то же время известно, что объем глобулярного слоя ОЛ, где расположены синаптические контакты митральных клеток и ольфакторных нейронов, составляет до 30 % объема всей луковицы (Royet et al., 1988). Полученные результаты свидетельствуют о наличии естественных механизмов защиты ольфакторного эпителия от проникновения патогенов и ксенобиотиков, а также позволяют сформулировать конкретные практические рекомендации, касающиеся интраназальной аппликации лекарственных препаратов, а именно: предпочтительное снижение частоты интраназальных введений и увеличение дозировки.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Science Foundation, project 14-14-00221.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bartsch W.G.K.G., Sponer G., Dietmann K., Fuchs G. Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1, 2-propanediol and Tween 20. *Arzneimittel-Forschung*. 1975;26(8):1581-1583.
- Bhatnagar K.P., Kennedy R.C., Baron G., Greenberg R.A. Number of mitral cells and the bulb volume in the aging human olfactory bulb: A quantitative morphological study. *Anatomical Record*. 1987; 218(1):73-87.
- Calderón-Garcidueñas L., Franco-Lira M., Mora-Tiscareño A., Medina-Cortina H., Torres-Jardón R., Kavanaugh M. Early Alzheimer's and Parkinson's disease pathology in urban children: Friend versus foe responses – it is time to face the evidence. *BioMed Res. International*. 2013;2013:161687.
- Chattopadhyay S., Dash S.K., Tripathy S., Das B., Mandal D., Pramanik P., Roy S. Toxicity of cobalt oxide nanoparticles to normal cells; an *in vitro* and *in vivo* study. *Chem.-Biol. Interact*. 2015;226: 58-71.
- Cone R.A. Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Rev*. 2009;61(2):75-85.
- Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J., Oberdorster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ. Health Perspectives*. 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. Instruments and Methods in Physics Res. A*. 2009;603(1):194-195.
- Faber H.K., Silverberg R.J., Dong L. Poliomyelitis in the cynomolgus monkey. *J. Exp. Med*. 1944;80(1):39-57.
- Harkin A., Kelly J.P., Leonard B.E. A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clin. Neurosci. Res*. 2003;3(4-5):253-262.

- Hurt M.E., Thomas D.A., Working P.K., Monticello T.M., Morgan K.T. Degeneration and regeneration of the olfactory epithelium following inhalation exposure to methyl bromide: Pathology, cell kinetics, and olfactory function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1988;94(2):311-328.
- Hussain S.M., Javorina A.K., Schrand A.M., Duhart H.M., Ali S.F., Schlager J.J. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol. Sciences.* 2006;92(2):456-463.
- Kim Y.S., Ho S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2010;12(5):319-330.
- Kitson C., Angel B., Judd D., Rothery S., Severs N., Dewar A., Huang L., Wadsworth S., Cheng S., Geddes D. The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Therapy.* 1999;6(4):534-546.
- Matulionis D.H. Ultrastructural study of mouse olfactory epithelium following destruction by ZnSO₄ and its subsequent regeneration. *Am. J. Anat.* 1975;142(1):67-89.
- Meshulam R., Moberg P., Mahr R., Doty R. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch. Neurol.* 1998;55(1):84-90.
- Mikloska Z., Sanna P.P., Cunningham A.L. Neutralizing antibodies inhibit axonal spread of herpes simplex virus type 1 to epidermal cells *in vitro*. *J. Virol.* 1999;73(7):5934-5944.
- Minoshima S., Cross D. *In vivo* imaging of axonal transport using MRI: aging and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2008;35(1):89-92.
- Mistry A., Glud S.Z., Kijems 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.
- Moshkin M., Petrovski D., Akulov A., Romashchenko A., Gerlinskaya L., Ganimedov V., Muchnaya M., Sadovsky A., Koptyug I., Savelov A. Nasal aerodynamics protects brain and lung from inhaled dust in subterranean diggers, *Ellobius talpinus*. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2014;281(1792):20140919.
- Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicol.* 2004;16(6-7):437-445.
- Olmsted S.S., Padgett J.L., Yudin A.I., Whaley K.J., Moench T.R., Cone R.A. Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophys. J.* 2001;81(4):1930-1937.
- Pautler R.G., Koretsky A.P. Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage.* 2002;16(2):441-448.
- Royet J.P., Souchier C., Jourdan F., Ploye H. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: Numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J. Comparative Neurol.* 1988; 270(4): 559-568.
- Schellinck H.M., Rooney E., Brown R.E. Odors of individuality of germfree mice are not discriminated by rats in a habituation-dishabituation procedure. *Physiology & Behavior.* 1995;57(5):1005-1008.
- Sherry Chow H.H., Zhi C., Matsuura T. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats. *J. Pharmaceut. Sci.* 1999;88(8):754-758.
- Verkman A.S., Song Y., Thiagarajah J.R. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am. J. Physiology – Cell Physiology.* 2003;284(1):C2-C15.
- Wang J., Liu Y., Jiao F., Lao F., Li W., Gu Y., Li Y., Ge C., Zhou G., Li B., Zhao Y., Chai Z., Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology.* 2008;254(1-2):82-90.
- 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.
- Xia S., Xu S. Improved assay of coenzyme Q10 from liposomes by Tween 80 solubilisation and UV spectrophotometry. *J. Sci. Food Agr.* 2006;86(13):2119-2127.
- Yu L.E., Lanry Yung L.Y., Ong C.N., Tan Y.L., Suresh Balasubramaniam K., Hartono D., Shui G., Wenk M.R., Ong W.Y. Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology.* 2007;1(3):235-242.