

## Роль ольфакторного транспорта в проникновении наночастиц оксида марганца из кровеносного русла в мозг

А.В. Ромашенко<sup>1,3</sup>✉, М.Б. Шарапова<sup>1</sup>, К.Н. Морозова<sup>1</sup>, Е.В. Киселева<sup>1</sup>, К.Э. Купер<sup>2</sup>, Д.В. Петровский<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: yuter2006@yandex.ru

Возможность поступления из носовой полости в головной мозг наночастиц (НЧ) различной природы не вызывает сомнения. Как уже было показано ранее, накопление НЧ в центральной нервной системе (ЦНС) может спровоцировать целый ряд неврологических заболеваний, поэтому понимание механизмов данного процесса представляет интерес как с научной, так и с практической точек зрения. Предполагается, что из крови НЧ могут проникнуть в ЦНС, исключительно преодолев гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Попав с поверхности легких в кровеносное русло, НЧ могут накапливаться в различных слизистых оболочках, в том числе и в слизистой носовой полости. Таким образом, нельзя исключать возможность транспорта НЧ из кровотока в мозг за счет их захвата окончаниями обонятельных нейронов. Для проверки этой гипотезы мы использовали парамагнитные НЧ оксида марганца ( $Mn_3O_4$ -НЧ), паттерны накопления которых в структурах мозга мыши регистрировали с помощью T1-взвешенной магнитно-резонансной томографии. В настоящем исследовании была проведена оценка влияния интраназальной аппликации ингибиторов эндоцитоза и аксонального транспорта на накопление  $Mn_3O_4$ -НЧ в структурах ЦНС при их введении в носовую полость или в кровоток. Сравнительный анализ полученных результатов показал, что перенос  $Mn_3O_4$ -НЧ из носовой полости в мозг эффективнее их проникновения в ЦНС из кровеносного русла, которое может осуществляться как за счет локального преодоления ГЭБ, например при накоплении  $Mn_3O_4$ -НЧ в зубчатой извилине гиппокампа, так и через захват и транспорт НЧ из крови клетками ольфакторного эпителия. При этом эксперименты с введением хлорпромазина, специфического ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза, и метил- $\beta$ -циклодекстрина, вещества, разрушающего липидные рафты, участвующие в захвате веществ клетками эндотелия, продемонстрировали различия в механизмах захвата НЧ из носовой полости и кровеносного русла. В результате проведенного исследования нам удалось показать значимый вклад аксонального транспорта в поступление наночастиц в головной мозг как из носовой полости, так и из сосудистого русла. Это объясняет накопление в мозге субмикронных частиц различной природы (нейротропные вирусы, нерастворимые ксенобиотики и др.), которые не способны преодолевать ГЭБ. Полученные результаты будут полезны как для понимания патогенеза различных нейродегенеративных заболеваний, так и для исследования побочных эффектов терапевтических препаратов, вводимых внутривенно. Ключевые слова: наночастицы; ольфакторный транспорт; магнитно-резонансная томография; внутривенное введение.

**Для цитирования:** Ромашенко А.В., Шарапова М.Б., Морозова К.Н., Киселева Е.В., Купер К.Э., Петровский Д.В. Роль ольфакторного транспорта в проникновении наночастиц оксида марганца из кровеносного русла в мозг. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):482-488. DOI 10.18699/VJ19.517

## The role of olfactory transport in the penetration of manganese oxide nanoparticles from blood into the brain

A.V. Romashchenko<sup>1,3</sup>✉, M.B. Sharapova<sup>1</sup>, K.N. Morozova<sup>1</sup>, E.V. Kiseleva<sup>1</sup>, K.E. Kuper<sup>2</sup>, D.V. Petrovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Budker Institute of Nuclear Physics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> The Institute of Computational Technologies, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: yuter2006@yandex.ru

There is no doubt that various nanoparticles (NPs) can enter the brain from the nasal cavity. It is assumed that NPs can penetrate from blood into the central nervous system (CNS) only by breaking the blood-brain barrier (BBB). The accumulation of NPs in CNS can provoke many neurological diseases; therefore, the understanding of its mechanisms is of both academic and practical interest. Although hitting from the surface of the lungs into the bloodstream, NPs can accumulate in various mucous membranes, including the nasal mucosa. Thus, we cannot rule out the ability of NPs to be transported from the bloodstream to the brain through the olfactory uptake. To test this hypothesis, we used paramagnetic NPs of manganese oxide ( $Mn_3O_4$ -NPs), whose accumulation patterns

in the mouse brain were recorded using T1-weighted magnetic resonance imaging. The effect of intranasal application of endocytosis and axonal transport inhibitors on the brain accumulation patterns of intranasally or intravenously injected  $Mn_3O_4$ -NPs was evaluated. A comparative analysis of the results showed that the transport of  $Mn_3O_4$ -NPs from the nasal cavity to the brain is more efficient than their local permeation through BBB into CNS from the bloodstream, for example with the accumulation of  $Mn_3O_4$ -NPs in the dentate gyrus of the hippocampus, and through the capture and transport of NPs from the blood by olfactory epithelium cells. Also, experiments with the administration of chlorpromazine, a specific inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, and methyl- $\beta$ -cyclodextrin, inhibitor of the lipid rafts involved in the capture of substances by endothelium cells, showed differences in the mechanisms of NP uptake from the nasal cavity and from the bloodstream. In this study, we show a significant contribution of axonal transport to NP accumulation patterns in the brain, both from the nasal cavity and from the vascular bed. This explains the accumulation of different sorts of submicron particles (neurotropic viruses, insoluble xenobiotics, etc.), unable to pass BBB, in the brain. The results will add to the understanding of the pathogenesis of various neurodegenerative diseases and help studying the side effects of therapeutics administered intravenously.

Key words: nanoparticles; olfactory transport; magnetic resonance imaging; intravenous injection.

**For citation:** Romashchenko A.V., Sharapova M.B., Morozova K.N., Kiseleva E.V., Kuper K.E., Petrovskii D.V. The role of olfactory transport in the penetration of manganese oxide nanoparticles from blood into the brain. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):482-488. DOI 10.18699/VJ19.517 (in Russian)

## Введение

Люди, как и другие наземные животные, постоянно подвергаются воздействию твердых аэрозолей, в состав которых могут входить разнообразные ксенобиотики. Оседая на слизистых верхних и нижних дыхательных путей, субмикронные и наноразмерные аэрозоли способны проникать в кровь и накапливаться во внутренних органах, включая головной мозг. Как показывает целый ряд экспериментальных исследований, накопление твердых частиц в мозге животного приводит к нарушению в работе дофаминовой и серотониновой систем мозга и, как следствие, к нейродегенерации (Tranfield, Walker, 2012). Кроме того, показано, что у людей, живущих на расстоянии менее 50 м до автострад, резко возрастает риск развития болезни Альцгеймера. Анализ зависимости эпидемиологической ситуации от концентрации твердых аэрозолей и выхлопных газов в атмосфере показал, что на риск нейродегенеративной патологии оказывает влияние концентрация именно твердых частиц в воздухе, а не компонентов выхлопных газов (Chen et al., 2017).

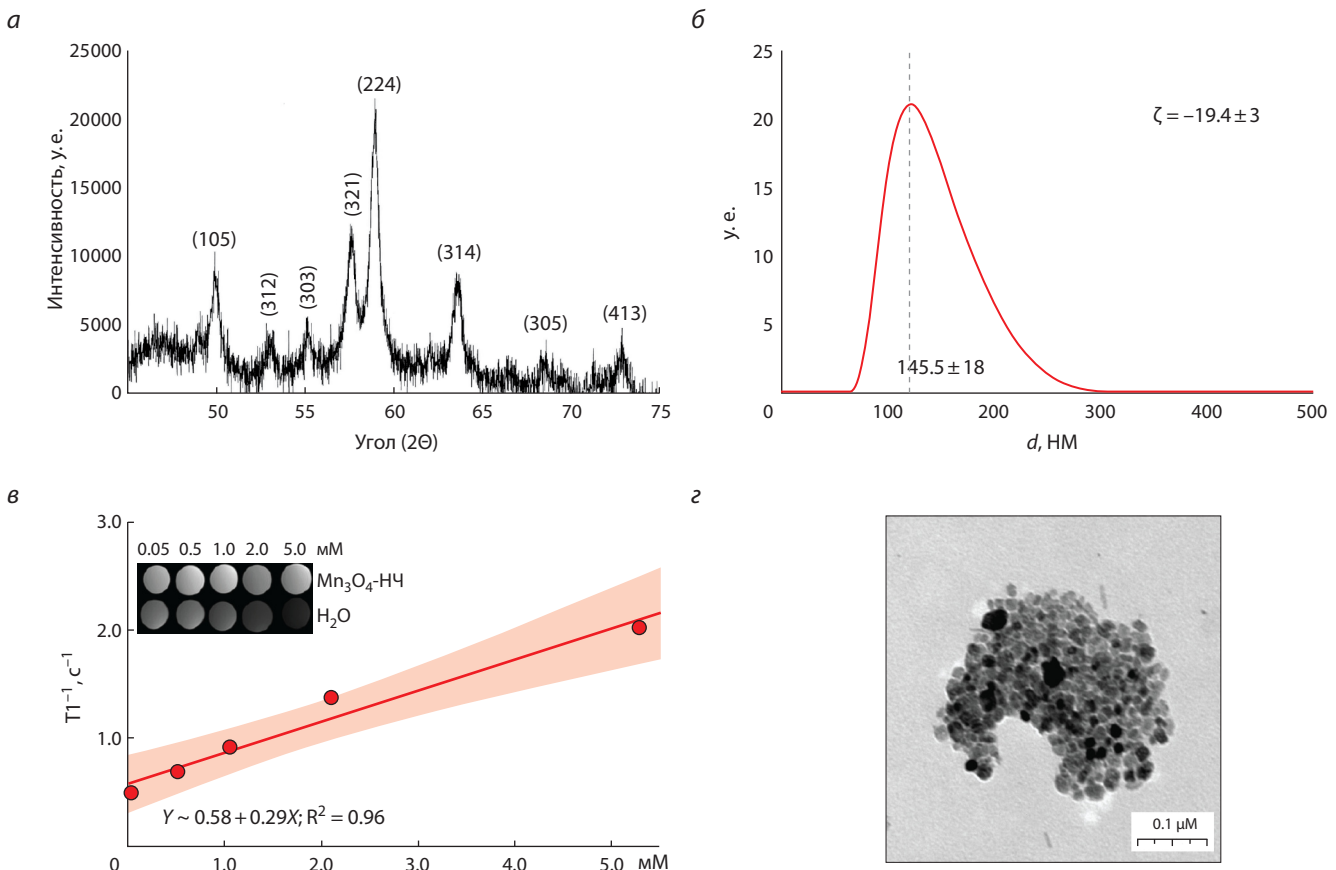
Несмотря на это, в качестве основных мишеней для поражающего действия наноаэрозолей рассматривают дыхательную и сердечно-сосудистую системы (Donaldson et al., 2002; Chen et al., 2008; Brook et al., 2010; Kampfrath et al., 2011). Соответственно, большая часть исследований посвящена изучению порտальной роли легких в проникновении наночастиц в кровь и их аккумуляции во внутренних органах, в том числе в мозге. Однако в настоящее время имеется значительное количество экспериментальных данных, указывающих на ведущую роль назального эпителия в транспорте наноаэрозолей напрямую из окружающей среды в мозг (Kreyling, 2016). Для ряда вирусов основным путем проникновения в центральную нервную систему млекопитающих является транспорт из носовой полости в мозг. К ним относят: вирус герпеса (HSV-1, HSV-2) (Kennedy, Chaudhuri, 2002), вирус гриппа А (Tanaka et al., 2003), борнавирусы (Sauder, Staeheli, 2003), рабдовирусы, в том числе вирус бешенства (Astic et al., 1993), парагрипп (Mogi et al., 2004), прионы (Zanusso et al., 2003). Основу ольфакторного транспорта, обеспечивающего перемещение вирусов, как, возможно,

и наночастиц (Mistry et al., 2009), из носовой полости в мозг, составляет захват вирионов окончаниями обонятельных нервов с последующим перемещением внутри аксонов и преодолением синаптических передач (Mogi et al., 2005).

Поскольку носовая полость характеризуется высоким уровнем васкуляризации, существует вероятность того, что наночастицы (НЧ) проникают в кровяное русло, а уже оттуда поступают в мозг. Для оценки вклада данного процесса в формирование наблюдаемых пространственно-временных паттернов распределения НЧ в мозге мышей мы провели сравнение накопления НЧ в центральной нервной системе (ЦНС) при их интраназальном и внутривенном введениях. В настоящем исследовании были использованы наночастицы оксида марганца ( $Mn_3O_4$ -НЧ), которые благодаря способности марганца сокращать время T1-релаксации протонов эффективно детектируются магнитно-резонансной томографией (МРТ). Оценку накопления  $Mn_3O_4$ -НЧ, основанную на изменении МРТ-сигнала в структурах мозга мыши, проводили через 12 ч после интраназального/внутривенного введения. Это время, согласно данным литературы и нашим предварительным экспериментам, соответствует максимальному накоплению в обонятельных луковицах интраназально введенных наночастиц (Khlebtsov, Dykman, 2011). Для выявления роли ольфакторных нейронов в транспорте  $Mn_3O_4$ -НЧ из носовой полости или кровеносного русла в мозг было исследовано влияние предварительной назальной аппликации ингибиторов эндоцитоза и аксонального транспорта на уровень МРТ-сигнала в ЦНС.

## Материалы и методы

**Животные.** Для экспериментов были использованы самцы мышей SPF-статуса инбредной линии Balb/c в возрасте 10–12 нед (25–32 г). Всего в исследовании было использовано 64 особи. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Экспериментальные животные содержались в клетках однополыми семейными группами по 2–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы OptiMice (Animal Care Systems) в



**Рис. 1.** Физико-химические характеристики  $Mn_3O_4$ -НЧ.

*a* – характеристика кристаллической фазы в образце  $Mn_3O_4$ -НЧ, исследованной методом порошковой дифрактометрии; *б* – значения гидродинамического радиуса (*d*) и дзета-потенциала ( $\zeta$ )  $Mn_3O_4$ -НЧ, полученные методом динамического светорассеяния; *в* – зависимость обратной величины времени T1-релаксации от концентрации марганца в образцах  $Mn_3O_4$ -НЧ; *г* – фотография коллоида  $Mn_3O_4$ -НЧ, выполненная методом ПЭМ высокого разрешения.

контролируемых условиях, при температуре 22–26 °C, относительной влажности 30–60 % и световом режиме 14C:10T с рассветом в 01:00. Корм Ssniff (Германия) и деионизированная вода, обогащенная минеральной смесью «Северянка» (Санкт-Петербург), животным предоставлялись *at libitum*.

**Наночастицы.** В работе использовали коммерчески доступные наночастицы оксида марганца  $Mn_3O_4$  ( $Mn_3O_4$ -НЧ, US3340, US-NANO, США).

Структуру полученных наночастиц марганца определяли методом X-ray powder Diffraction (XRD). XRD проводился на ускорительном комплексе ВЭПП-3 при следующих параметрах синхротронного излучения: длина волны монохроматического луча  $\lambda = 0.1516$  нм и диапазон углов  $2\theta$  – от 45 до 75° (рис. 1, *a*). Гидродинамический диаметр наночастиц  $Mn_3O_4$ -НЧ в коллоидном растворе определяли методом динамического светорассеяния при углах рассеяния 90° и температуре 22 °C, а дзета-потенциал – с помощью электрофореза в U-образной ювенте в соответствии с протоколами производителя Zetasizer NanoZS (Malvern, Англия) (см. рис. 1, *б*). Морфологию и размеры наночастиц изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Микроскоп – JEM 1400 (JEOL, Япония) с цифровой камерой Veleta (SIS, Германия) (см. рис. 1, *г*).

Как было показано в нашей предыдущей работе (Ромашченко и др., 2017), обратные величины релаксации ( $T1^{-1}$ ,  $ms^{-1}$ , см. рис. 1, *в*) использованных  $Mn_3O_4$ -НЧ находились в прямо пропорциональной зависимости от концентрации марганца в образцах. В экспериментах *in vivo* было показано, что уровень МРТ-сигнала в ольфакторных луковицах (ОЛ) через 12 ч после интраназальной аппликации  $Mn_3O_4$ -НЧ прямо пропорционален концентрации марганца в образце (Ромашченко и др., 2017). Для калибровки были взяты именно ОЛ, так как концентрация наночастиц в этой структуре при интраназальном или ингаляционном введении максимальна (Moshkin et al., 2014). Ранее мы продемонстрировали низкую растворимость  $Mn_3O_4$ -НЧ при различных pH в биологических средах, что дало нам основание рассматривать наблюдаемые изменения МРТ-сигнала в структурах мозга мыши после интраназального/внутривенного введений  $Mn_3O_4$ -НЧ как следствие накопления в нервной ткани нерастворимых форм марганца, а не  $Mn^{2+}$  (Ромашченко и др., 2017). Это позволило использовать уровень T1-взвешенного МРТ-сигнала для оценки накопления НЧ в ткани.

**Схема экспериментов.** При исследовании накопления наночастиц марганца в структурах мозга ненаркотизированным мышам вводили по 10  $\mu$ л коллоидного раствора частиц (5.5 мг/мл) в одну ноздрю или 100  $\mu$ л  $Mn_3O_4$ -НЧ

внутривенно. Непосредственно перед использованием НЧ диспергировали в течение 1 мин на ультразвуковом гомогенизаторе при частоте 20 кГц и мощности 300 Вт. В пилотных экспериментах показано, что значения МРТ-сигнала в ОЭ и ОЛ достигают своего максимума как при внутривенном, так и при интраназальном введении через 12 ч после предоставления НЧ. Для определения паттернов накопления  $Mn_3O_4$ -НЧ МРТ-сканирование мозга мыши проводили два раза: 24 ч до и 12 ч после введения. Сравнение полученных значений МРТ-сигнала до и после предьявления НЧ давало возможность оценить достоверность накопления марганца в той или иной структуре.

Для исследования роли ольфакторных нейронов в захвате и транспорте наночастиц марганца мышам до интраназального/внутривенного введения наночастиц в каждую ноздрю апплицировали по 10 мкл раствора следующих соединений:

- хлорпромазин (С8138 SIGMA, Sigma-Aldrich) – специфический ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза (Wang et al., 1993; Voucrot et al., 2015), препарат вводили в дозе 0.4 мг/кг;
- метил-β-циклодекстрин (332615 SIGMA, Sigma-Aldrich) – разрушает липидные рафты (Brownell et al., 2011), участвующие в захвате веществ клетками эндотелия, препарат вводили в дозе 0.4 мг/кг;
- хлорид цинка (229997 SIGMA, Sigma-Aldrich) – индуктор гибели клеток ольфакторного эпителия (Burd, 1993), препарат вводили в дозе 20 мг/кг;
- колхицин (С9754 SIGMA, Sigma-Aldrich) – соединение, подавляющее полимеризацию тубулина, эндоцитоз и клеточный транспорт (Castel, 1990), препарат вводили в дозе 0.2 мг/кг.

Для каждого вещества было протестировано по восемь животных. Колхицин и хлорпромазин вводили за 20 мин, а раствор хлорида цинка – за 24 ч до интраназальной

аппликации  $Mn_3O_4$ -НЧ, что обусловлено скоростью наступления эффекта используемого вещества.

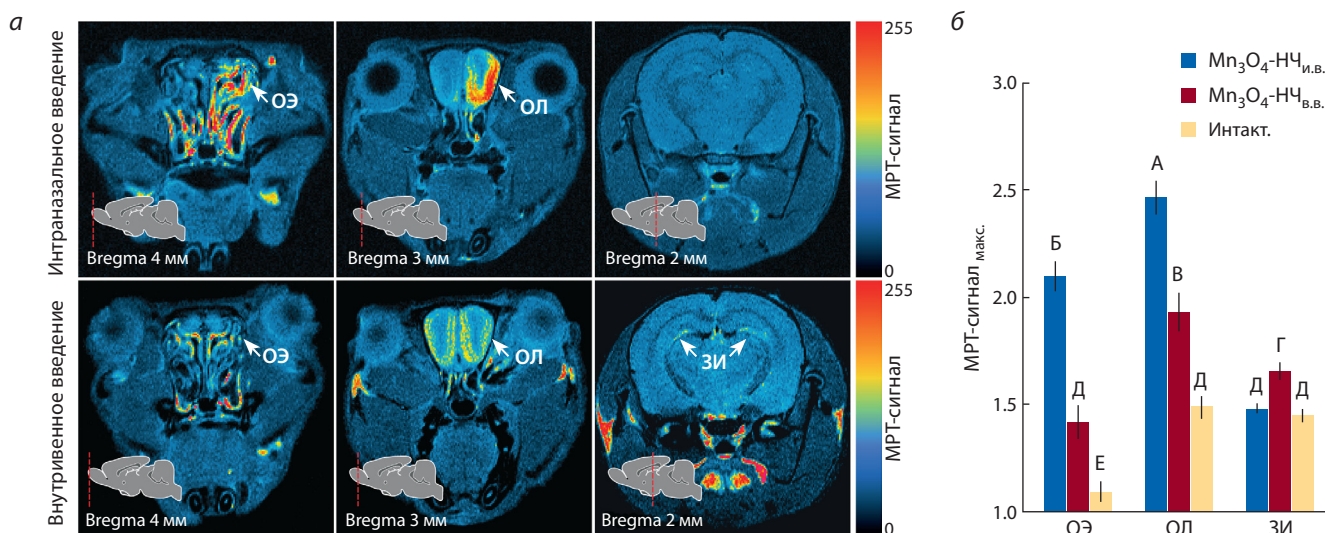
**МРТ-исследования.** Накопление магнитоконтрастных наночастиц в структурах мозга мыши было исследовано с помощью МРТ на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл. МРТ-сканирование и последующая обработка полученных изображений проводились в соответствии с ранее разработанными протоколами (Ромашенко и др., 2017).

**Статистика.** Для сравнения двух средних использовали U-критерий Манна–Уитни. Множественные сравнения средних проводили с помощью LSD-теста (Least Significant Difference). Данные выражали как средние ± SE.

## Результаты

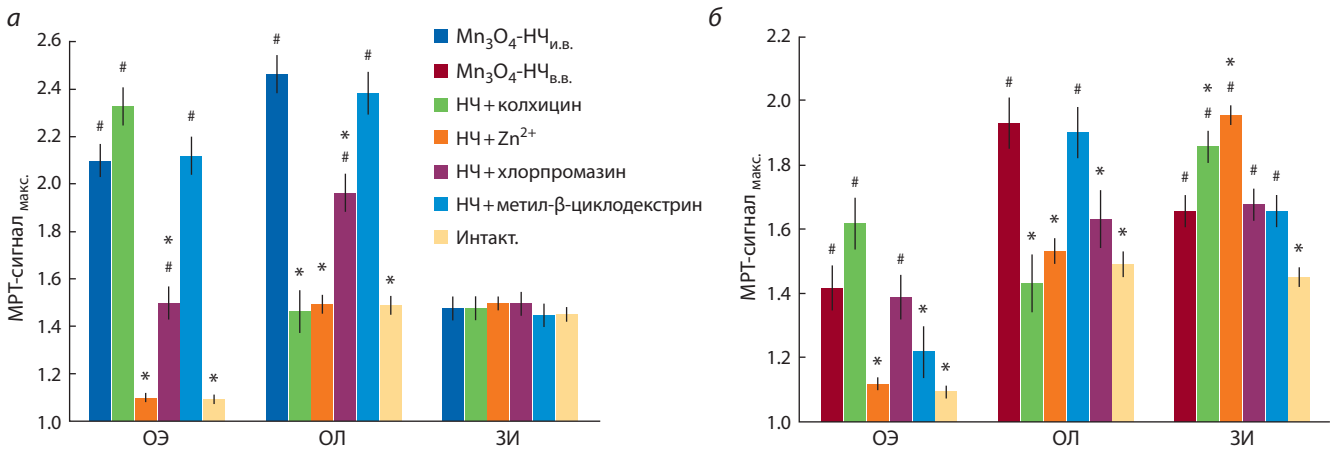
Для анализа паттернов распределения наночастиц при двух способах их введения были выбраны структуры мозга мыши, в которых уровень МРТ-сигнала через 12 ч после введения был выше, чем у интактных животных (рис. 2, а). В обеих группах инъекция  $Mn_3O_4$ -НЧ приводила к статистически значимому увеличению МРТ-сигнала в ольфакторной луковице (ОЛ) и ольфакторном эпителии (ОЭ) (см. рис. 2, б). И при интраназальном, и при внутривенном введении  $Mn_3O_4$ -НЧ максимальный уровень сигнала наблюдался в ОЛ (см. рис. 2). Уровень МРТ-сигнала в ОЭ и ОЛ при введении  $Mn_3O_4$ -НЧ в носовую полость был выше, чем в вену, а в зубчатой извилине гиппокампа (ЗИ) достоверное накопление марганца удалось зарегистрировать только при введении  $Mn_3O_4$ -НЧ в вену (см. рис. 2, б).

Таким образом, накопление  $Mn_3O_4$ -НЧ при их введении в кровь или аппликации в носовую полость ограничивалось преимущественно структурами ольфакторной системы (см. рис. 2), что поставило вопрос о роли ольфакторного эпителия в проникновении наночастиц в мозг как



**Рис. 2.** Паттерны накопления  $Mn_3O_4$ -НЧ в ольфакторных луковицах (ОЛ), ольфакторном эпителии (ОЭ) и зубчатой извилине (ЗИ) при их интраназальном (а, верхняя панель) и внутривенном (а, нижняя панель) введении.

Белыми стрелками обозначены места гиперинтенсивности, соответствующие накоплению  $Mn_3O_4$ -НЧ. Для визуализации паттернов накопления частиц марганца на МРТ-скане было использовано псевдоокрашивание; б – количественная оценка изменения уровня МРТ-сигнала в ОЛ, ОЭ и ЗИ через 12 ч после интраназального (и.в./)внутривенного (в.в.) введения  $Mn_3O_4$ -НЧ. Для оценки накопления наночастиц в структуре использовали нормализованный относительно референса МРТ-сигнал. Интакт. – усредненные значения МРТ-сигнала в ОЛ, ОЭ и ЗИ у животных до интраназального/внутривенного введения НЧ; б – А–Е – достоверность отличий средних значений (LSD-тест,  $p < 0.05$ ).



**Рис. 3.** Влияние интраназальной аппликации ингибиторов эндоцитоза и аксонального транспорта на накопление  $Mn_3O_4$ -НЧ в ольфакторных луковицах (ОЛ), ольфакторном эпителии (ОЭ) и зубчатой извилине (ЗИ) мыши через 12 ч после их введения в носовую полость (а) или кровеносное русло (б).

Для оценки накопления наночастиц в структуре использовали нормализованный относительно референса MRT-сигнал. Интакт. – усредненные значения MRT-сигнала в ОЛ, ОЭ и ЗИ у животных до интраназального/внутривенного введения НЧ. \* – достоверные отличия по сравнению с контрольной группой, которой вводили только НЧ (U-тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ); # – достоверные отличия по сравнению с интактными животными, до введения НЧ (U-тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ).

из носовой полости, так и из сосудистого русла. Исходя из данных литературы, наиболее вероятным механизмом проникновения наночастиц из носовой полости в мозг является их захват ольфакторными нейронами с помощью эндоцитоза и последующий аксональный транспорт в гломерулярный слой ОЛ, где они пересекают синаптический контакт и переходят в митральные клетки ОЛ. Мы предположили, что при внутривенном введении, как и при интраназальном,  $Mn_3O_4$ -НЧ накапливаются в клетках ольфакторного эпителия, откуда с помощью аксонального транспорта проникают в нейроны ОЛ. Для проверки этой гипотезы использовали ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза (хлорпромазин), ингибитор аксонального транспорта (колхицин), вещество, разрушающее липидные рафты, участвующие в захвате веществ клетками эндотелия (метил- $\beta$ -циклодекстрин) (András et al., 2012), и индуктор гибели клеток ольфакторного эпителия (раствор хлорида цинка). Как индуктор гибели клеток ОЭ, так и ингибитор аксонального транспорта при их предварительной интраназальной аппликации практически полностью предотвращали накопление  $Mn_3O_4$ -НЧ в ОЛ (рис. 3). Ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза, введенный в носовую полость, снижал накопление  $Mn_3O_4$ -НЧ в ОЭ и ОЛ только при их интраназальном предъявлении. Интраназальное введение метил- $\beta$ -циклодекстрина достоверно снижало накопление  $Mn_3O_4$ -НЧ в ОЭ и ОЛ только при внутривенном введении НЧ. Ни один из апплицированных в нос ингибиторов не оказал значимого влияния на уровень MRT-сигнала в зубчатой извилине (см. рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о значимой роли ольфакторного транспорта в проникновении и распространении наночастиц в пределах обонятельного тракта как с поверхности носовой полости, так и из кровяного русла.

## Обсуждение

В настоящей работе мы исследовали паттерны накопления  $Mn_3O_4$ -НЧ в структурах мозга мыши при их внутривен-

ном и интраназальном предъявлении. Наличие марганца в тканях мозга проявляется в усилении сигнала на T1-взвешенных MRT-изображениях, величина которого напрямую зависит от концентрации марганца в ткани (Lin, Koretsky, 1997). В частности, микроэлементный анализ ОЛ, выделенных у мышей сразу после MRT-исследования, показал близкий к единице коэффициент корреляции между интенсивностью томографического сигнала и содержанием Mn в ткани (Ромашенко и др., 2017). Все это дает основание рассматривать значения MRT-сигнала как полуколичественный показатель насыщения марганцем тканей мозга. Используемые в работе частицы практически нерастворимы в крови и слабо растворимы при pH, соответствующей кислой среде лизосом (Ромашенко и др., 2017). Поэтому паттерны MRT-контраста, зарегистрированные в первые 12 ч после введения  $Mn_3O_4$ -НЧ, можно рассматривать как результат накопления наночастиц, не ионов марганца (II), которые, будучи агонистами кальциевых каналов, способны проникать во внутриклеточное пространство (Lin, Koretsky, 1997). Используемые нами  $Mn_3O_4$ -НЧ имели достаточно большой гидродинамический радиус (~130 нм), что, по всей видимости, ограничивало их способность преодолевать ГЭБ. Поэтому при внутривенном введении  $Mn_3O_4$ -НЧ мы наблюдали локализованный, а не распределенный характер их накопления и статистически значимое увеличение MRT-сигнала, ассоциированное с накоплением частиц, обнаружили только в ОЭ, ОЛ и зубчатой извилине гиппокампа. Схожие паттерны накопления наблюдались при аппликации  $Mn_3O_4$ -НЧ интраназально. Исходя из уровня MRT-сигнала, наибольшая концентрация частиц в случае их инъекции в кровяное русло или носовую полость была в ОЛ и ОЭ. При этом в обоих случаях уровень MRT-сигнала в ОЛ был достоверно больше по сравнению с ОЭ, что может объясняться особенностями анатомии ОЛ. Каждая глобула в ОЛ иннервируется несколькими нейронами ОЭ (Dhuria et al., 2010), что может приводить

к «концентрированию» контраста. Совпадение паттернов накопления при двух типах введения частиц натолкнуло нас на мысль, что в обоих случаях важную роль в проникновении наночастиц в мозг играет ольфакторный транспорт, который, исходя из данных литературы, вероятнее всего, осуществляется за счет эндоцитоза частиц клетками назального эпителия и их последующим аксональным транспортом (Mori et al., 1995; Dhuria et al., 2010; Munster et al., 2012; Hopkins et al., 2014; John et al., 2014).

Для проверки сформулированной в результате анализа паттернов накопления частиц гипотезы мы провели оценку роли клеток ольфакторного эпителия в накоплении частиц в ОЛ при их внутривенном и интраназальном введении. Ранее было показано, что уже через сутки после интраназального предьявления раствора солей цинка (5 %) вызывают гибель клеток ОЭ (Burd, 1993). В наших экспериментах предварительное (за 24 ч) введение раствора хлорида цинка привело к практически полной отмене накопления МРТ-сигнала в ОЛ. Последующие эксперименты с предоставлением колхицина, ингибирующего аксональный транспорт (Ribak et al., 1978), подтвердили предположение о ведущей роли ольфакторных нейронов в накоплении  $Mn_3O_4$ -НЧ в ОЛ при обоих типах введения. При этом эксперименты с введением хлорпромазина, специфического ингибитора клатрин-зависимого эндоцитоза (Wang et al., 1993), и метил- $\beta$ -циклодекстрина, ингибитора липидных рафтов (András et al., 2012), продемонстрировали различия в механизмах захвата НЧ из носовой полости и кровеносного русла.

Аппликация ингибиторов никак не отразилась на накоплении  $Mn_3O_4$ -НЧ в зубчатой извилине гиппокампа. Статистически значимое увеличение МРТ-сигнала в этой структуре при внутривенном введении  $Mn_3O_4$ -НЧ может быть связано с характерным для данной области активным нейрогенезом, который требует дополнительных как структурных (мембрана), так и энергетических ресурсов, что может интенсифицировать процессы захвата веществ из кровяного русла, в том числе и путем эндоцитоза. В свою очередь, это может увеличивать вероятность проникновения наночастиц.

## Заключение

В результате проведенного исследования нам удалось показать значимый вклад аксонального транспорта в поступлении наночастиц в головной мозг как из носовой полости, так и из сосудистого русла. Это объясняет накопление в мозге субмикронных частиц различной природы (не нейротропные вирусы, нерастворимые ксенобиотики и др.), которые не способны преодолевать ГЭБ. Полученные результаты будут полезны как для понимания патогенеза различных нейродегенеративных заболеваний, так и для исследования побочных эффектов терапевтических препаратов, вводимых внутривенно.

## Список литературы / References

Ромашенко А.В., Петровский Д.В., Шарапова 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

- [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 Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):848-855. DOI 10.18699/VJ17.305. (in Russian)]
- András I.E., Eum S.Y., Toborek M. Lipid rafts and functional caveolae regulate HIV-induced amyloid beta accumulation in brain endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012;421(2):177-183. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.03.128.
- Astic L., Saucier D., Coulon P., Lafay F., Flamand A. The CVS strain of rabies virus as transneuronal tracer in the olfactory system of mice. Brain Res. 1993;619(1):146-156. DOI 10.1016/0006-8993(93)91606-S.
- Boucrot E., Ferreira A.P., Almeida-Souza L., Debard S., Vallis Y., Howard G., Bertot L., Sauvonnnet N., McMahon H.T. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. Nature. 2015;517(7535):460-465. DOI 10.1038/nature14067.
- 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. J. Occup. Environ. Med. 2010;68:224-230. DOI 10.1136/oem.2009.053991.
- Brownell W.E., Jacob S., Hakizimana P., Ulfendahl M., Fridberger A. Membrane cholesterol modulates cochlear electromechanics. Pflügers Arch. 2011;461(6):677-686. DOI 10.1007/s00424-011-0942-5.
- Burd G.D. Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. Microsc. Res. Tech. 1993;24(3):195-213. DOI 10.1002/jemt.1070240302.
- Castel M.N., Malgouris C., Blanchard J.C., Laduron P.M. Retrograde axonal transport of neurotensin in the dopaminergic nigrostriatal pathway in the rat. Neuroscience. 1990;36(2):425-430. DOI 10.1016/0306-4522(90)90438-A.
- Chen H., Kwong J.C., Copes R., Tu K., Villeneuve P.J., Van Donkelaar A., Hystad P., Martin R.V., Murray B.J., Wilton A.S. Living near major roads and the incidence of dementia, Parkinson's disease, and multiple sclerosis: a population-based cohort study. Lancet. 2017; 389(10070):718-726. DOI 10.1016/S0140-6736(16)32399-6.
- Chen Z., Meng H., Xing G., Yuan H., Zhao F., Liu R., Chang X., Gao X., Wang T., Jia G., Ye C., Chai Z., Zhao Y. Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to  $SiO_2$  nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population. Environ. Sci. Technol. 2008;42(23):8985-8992. DOI 10.1021/es800975u.
- Dhuria S.V., Hanson L.R., Frey W.H. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. J. Pharm. Sci. 2010;99(4):1654-1673. DOI 10.1002/jps.21924.
- 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. DOI 10.1089/089426802320282338.
- Hopkins L.E., Patchin E.S., Chiu P.L., Brandenberger C., Smiley-Jewell S., Pinkerton K.E. Nose-to-brain transport of aerosolised quantum dots following acute exposure. Nanotoxicology. 2014; 8(8):885-893. DOI 10.3109/17435390.2013.842267.
- John J.A.S., Ekberg J.A., Dando S.J., Meedeniya A.C., Horton R.E., Batzloff M., Owen S.J., Holt S., Peak I.R., Mackay-Sim A. *Burkholderia pseudomallei* penetrates the brain via destruction of the olfactory and trigeminal nerves: implications for the pathogenesis of neurological melioidosis. MBio. 2014;5(2):e00025-14. DOI 10.1128/mBio.00025-14.
- Kampfrath T., Maiseyue A., Ying Z., Shah Z., Deiluisi J.A., Xu X., Kherada N., Brook R.D., Reddy K.M., Parthasarathy S., Chen L.C., Moffatt-Bruce S., Sun Q., Morawietz H., Rajagopalan S. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. Circ. Res. 2011; 108(6):716-726. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.110.237560.

- Kennedy P.G.E., Chaudhuri A. Herpes simplex encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2002;73:237-238. DOI 10.1136/jnnp.73.3.237.
- Khlebtsov N., Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Chem. Soc. Rev.* 2011;40(3):1647-1671. DOI 10.1039/C0CS00018C.
- Kreyling W.G. Discovery of unique and ENM-specific pathophysiological 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. DOI 10.1016/j.taap.2016.02.004.
- Lin Y.J., Koretsky A.P. Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: An approach to direct imaging of brain function. *Magn. Reson. Med.* 1997;38(3):378-388. DOI 10.1002/mrm.1910380305.
- Mistry A., Glud S.Z., Kjemis J., Randel J., Howard K.A., Stolnik S., Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. *J. Drug Target.* 2009;17(7):543-552. DOI 10.1080/1061186090305547.
- Mori I., Komatsu T., Takeuchi K., Nakakuki K., Sudo M., Kimura Y. Parainfluenza virus type 1 infects olfactory neurons and establishes long-term persistence in the nerve tissue. *J. Gen. Virol.* 1995;76(5):1251-1254. DOI 10.1099/0022-1317-76-5-1251.
- Mori I., Nishiyama Y., Yokochi T., Kimura Y. Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host. *Rev. Med. Virol.* 2004;14(4):209-216. DOI 10.1002/rmv.426.
- Mori I., Nishiyama Y., Yokochi T., Kimura Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J. Neurovirol.* 2005;11(2):129-137. DOI 10.1080/13550280590922793.
- Moshkin M.P., Petrovskii D.V., Akulov A.E., Romashchenko A.V., Gerlinskaya L.A., Ganimedov V.L., Muchnaya M.I., Sadovsky A.S., Koptyug I.V., Savelov A.A., Troitsky S.Y. Nasal aerodynamics protects brain and lung from inhaled dust in subterranean diggers, *Ellobius talpinus*. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2014;281(1792):919. DOI 10.1098/rspb.2014.0919.
- Munster V.J., Prescott J.B., Bushmaker T., Long D., Rosenke R., Thomas T., Scott D., Fischer E.R., Feldmann H., De Wit E. Rapid Nipah virus entry into the central nervous system of hamsters via the olfactory route. *Sci. Rep.* 2012;2:736. DOI 10.1038/srep00736.
- Ribak C.E., Vaughn J.E., Saito K. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 1978;140(2):315-332. DOI 10.1016/0006-8993(78)90463-8.
- Sauder C., Staeheli P. Rat model of Borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J. Virol.* 2003;77(23):12886-12890. DOI 10.1128/JVI.77.23.12886-12890.2003.
- Tanaka H., Park C.H., Ninomiya A., Ozaki H., Takada A., Umemura T., Kida H. Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Vet. Microbiol.* 2003;95(1):1-13. DOI 10.1016/S0378-1135(03)00132-9.
- Tranfield E.M., Walker D.C. Understanding human illness and death following exposure to particulate matter air pollution. *Environmental Health-Emerging Issues and Practice.* IntechOpen, 2012. DOI 10.5772/30264.
- Wang L.H., Rothberg K.G., Anderson R.G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* 1993;123(5):1107-1117. DOI 10.1083/jcb.123.5.1107.
- Zanusso G., Ferrari S., Cardone F., Zampieri P., Gelati M., Fiorini M., Farinazzo A., Gardiman M., Cavallaro T., Bentivoglio M., Righetti P.G. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(8):711-719. DOI 10.1056/NEJMoa022043.

#### ORCID ID

A.V. Romashchenko orcid.org/0000-0002-0674-0574  
D.V. Petrovskii orcid.org/0000-0002-0623-0363

**Благодарности.** Исследования поддержаны грантом Российского научного фонда (№ 17-74-10081) и выполнены с использованием оборудования ЦКП, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.03.2019. После доработки 16.04.2019. Принята к публикации 16.04.2019.