

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»

На правах рукописи

Шарафутдинова Люция Ахтямовна

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
НЕРВНОЙ, ИММУННОЙ И РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМ
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НАНОРАЗМЕРНОГО
ДИОКСИДА ТИТАНА В ФОРМЕ РУТИЛА
(экспериментальное исследование)

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Научный консультант:
доктор биологических наук,
Валиуллин В.В.

Казань – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Общая характеристика наночастиц	18
1.1.1 Типы наночастиц и их применение в биомедицине	18
1.1.2 Наночастицы диоксида титана	27
1.2 Токсические свойства наночастиц	39
1.2.1 Наночастицы и иммунная система	40
1.2.2 Гепатотоксические эффекты наночастиц	52
1.2.3 Нейротоксические эффекты наночастиц	62
1.2.4 Органы репродуктивной системы при воздействии наночастиц	69
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	87
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	98
3.1 Лимфоидные органы крысы в условиях перорального введения наночастиц диоксида титана	98
3.1.1 Морфологическая характеристика тимуса	98
3.1.2 Морфологическая характеристика селезенки	103
3.1.3 Морфологическая характеристика поверхностных шейных лимфатических узлов	112
3.2 Показатели крови человека и крысы в условиях воздействия наночастиц диоксида титана	118
3.2.1 Нейтрофилы крови человека после воздействия наночастиц диоксида титана в условиях <i>in vitro</i> , по данным атомно-силовой микроскопии	118
3.2.2 Клинико-лабораторные показатели крови крысы на фоне перорального введения наночастиц диоксида титана	122

3.3 Морфологические особенности печени на фоне введения наночастиц диоксида титана	125
3.3.1 Структурные особенности печени	125
3.3.2 Ультроструктурная характеристика печени	131
3.4 Морфофункциональные изменения ЦНС при интраназальном введении наночастиц диоксида титана	138
3.4.1 Морфологическая характеристика гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса головного мозга	138
3.4.1.1 Структурные особенности полей СА1, СА3, зубчатой извилины гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса мозга	138
3.4.1.2 Ультроструктурные особенности гиппокампа и миндалевидного комплекса мозга	147
3.4.1.3 Иммуногистохимические особенности гиппокампа и миндалевидного комплекса мозга	152
3.4.2 Функциональные характеристики ЦНС	159
3.4.2.1 Показатели электроэнцефалографии головного мозга крыс	159
3.4.2.2 Особенности поведения животных	162
3.5 Репродуктивная система крыс при пероральном введении наночастиц диоксида титана	165
3.5.1 Структурно-функциональная характеристика семенников	165
3.5.2 Эффекты антенатального воздействия НЧ TiO_2 на эмбриональное и раннее постнатальное развитие	171
3.5.2.1 Токсические эффекты наночастиц диоксида титана, регистрируемые в антенатальном периоде развития	171
3.5.2.2 Эффекты воздействия НЧ TiO_2 в антенатальный период на раннее постнатальное развитие потомства	174
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	176

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	207
ВЫВОДЫ	210
Список сокращений	213
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	214

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Спектр потенциально токсичных химических веществ, используемых человеком в повседневной жизни, постоянно растет, в связи с чем существует острая необходимость в исследовании их негативного эффекта на различные органы и ткани человека. В последнее время пристальное внимание привлечено к относительно новым ультрадисперсным формам веществ, полученным с использованием нанотехнологий, к числу которых относят наночастицы (НЧ). В наноразмерном состоянии (<100 нм) любые вещества приобретают новые химические, физические и биологические свойства, существенно отличающиеся от их свойств в макрообъемном состоянии и обуславливающие широкое использование НЧ в различных сферах человеческой деятельности. Вместе с тем накоплены данные, что их небольшие размеры и очень высокая удельная поверхность (в расчете на единицу массы), а также значительная реакционная способность позволяет им при попадании в организм беспрепятственно преодолевать биологические барьеры, увеличивать продукцию активных форм кислорода (АФК), что приводит к повреждению внутриклеточных структур (Oberdörster G., 2000; Brohi R.D. et al., 2017).

Среди применяемых в настоящее время наноматериалов наиболее широко используются НЧ диоксида титана (TiO_2) (Piccinno F. et al., 2012; Ma Y., 2014). Они имеют ряд потребительских достоинств, связанных с хорошей фотокаталитической активностью, высокой химической и термической стабильностью и относительно невысокой стоимостью. Традиционно НЧ TiO_2 рассматривались как плохо растворимые, химически инертные частицы, обладающие низкой токсичностью, и они даже использовались в качестве отрицательного контроля при сравнении соединений в ряде токсикологических исследований (Zhang D.D. et al., 2002; Jeng H.A., Swanson J.J., 2006). Однако быстрый рост числа публикаций о негативном воздействии НЧ TiO_2 на различные органы и ткани свидетельствует о высоком интересе исследователей к их биологической безопасности. Неблагоприятное влияние НЧ TiO_2 на клетки и ткани человека возможно как в производственных

условиях, когда человек не имеет возможности избежать такого контакта, так и в результате непреднамеренного употребления, связанного с их включением в состав продовольственных, промышленных и фармакологических товаров (Хотимченко С.А. и др., 2015; Гмошинский И.В. и др., 2018; Winkler Н.С., 2018). Следует подчеркнуть, что несмотря на то, что экологи и токсикологи рассматривают НЧ как новые потенциально опасные для биологических структур материалы (Jovanović В., 2015; Ахлянович Н.С., Новиков Д.К., 2016) исследования по безопасности НЧ TiO_2 существенно отстают от масштабов их использования. Так, Британская неправительственная организация Soil Association, занимающаяся сертификацией органических продуктов, отказалась сертифицировать продукты, содержащие искусственно созданные НЧ с размером менее 125 нм, считая их потенциально опасными для здоровья. В Европе, к примеру во Франции, два министерства – экологии и экономики подписали совместное постановление о том, что с 1 января 2020 года в этой стране вводится официальный запрет на использование пищевой добавки E171 (TiO_2) при производстве продуктов питания. В России использование E171, в составе которой до 36% частиц имеют размер менее чем 100 нм, никак не регламентировано санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами по использованию пищевых добавок. Таким образом, максимальная концентрация TiO_2 устанавливается технологическими инструкциями, то есть самим производителем.

Существенным фактором, который следует учитывать при изучении разнообразных эффектов НЧ TiO_2 , является их способность накапливаться в организме (Heringa M. В. et al., 2018), что может привести к отсроченным во времени морфофункциональным проявлениям воздействия этих соединений. Кроме того, нарушения структуры и функции любого органа, которые обнаруживаются после введения НЧ, могут быть не только следствием прямого их воздействия на различные клетки, но и результатом повреждения других органов и систем - суммарный эффект. Известно, что наибольшую опасность для здоровья человека представляет нарушение работы регуляторных систем, к которым

относятся нервная, иммунная, эндокринная и ряд других, в частности, репродуктивная.

В связи с вышеизложенным, актуальность изучения влияния НЧ TiO_2 на морфофункциональное состояние интегрирующих систем организма – иммунной, нервной, а также репродуктивной не вызывает сомнений.

Степень разработанности темы исследования. Эффекты влияния НЧ TiO_2 , в том числе и токсические, молекулярные механизмы их воздействия на различные ткани организма в последние годы активно изучаются. На различных моделях показано, что воздействие НЧ TiO_2 приводит к повышенной генерации АФК многими клетками организма, что является одним из основных повреждающих факторов для большинства из них (Sha B. et al., 2013; Azim S.A. et al., 2015; Suker D.K., Jasim F.A. et al., 2018). Выявлено, что НЧ TiO_2 вызывают усиление ПОЛ, активацию ряда каспаз, в конечном итоге повреждение ДНК и, как следствие этого, последующую апоптотическую гибель клеток (Pele L.C., 2015; Zhang Z. et al., 2018). В качестве определяющего фактора неблагоприятных последствий воздействия НЧ TiO_2 в литературе выделяют размер и кристаллическую фазу. Две аллотропные формы НЧ – анатаз и рутил – имеют разные поверхностные свойства и реакционную способность. В зависимости от кристаллической структуры токсические свойства НЧ TiO_2 могут варьировать. На сегодняшний день в литературе существует противоречивая информация относительно негативных эффектов разных кристаллических форм НЧ TiO_2 . Показано, что анатазная структура НЧ TiO_2 в 100 раз более токсична, чем его рутильная форма (Хие Y., 2010; Smith M.A. et al., 2014). Обе фазы – анатаз и рутил – широко используются при производстве солнцезащитных кремов, красок, пластмасс, бумаги и др. Однако последняя, ввиду более высокой поглощающей способности, твердости и химической стойкости, используется гораздо чаще. Вместе с тем в последние годы появились данные о сходных по силе и направленности эффектах этих форм НЧ TiO_2 (Xu Y. et al., 2017), в связи с чем, возникает необходимость изучения последствий воздействия НЧ TiO_2 рутильной модификации на клетки и ткани организма. Кроме того, в большинстве работ авторы не всегда уточняют

кристаллическую фазу НЧ, что затрудняет интерпретацию данных и указывает на дефицит информации относительно неблагоприятных эффектов различных форм НЧ TiO_2 .

Основные пути поступления в организм НЧ, как и любых ксенобиотиков, – желудочно-кишечный тракт, кожа и дыхательные пути. В экспериментах показано, что НЧ TiO_2 легко проникают в организм при вдыхании, после чего накапливаются в головном мозге, проходя гематоэнцефалический барьер, и обнаруживаются преимущественно в гиппокампе и коре головного мозга (Wang J., 2008), где они контактируют с различными клетками ЦНС, вызывая апоптоз, повреждение органелл клетки, сигнальных путей, нарушение регуляции синаптической пластичности, окислительный стресс (ОС) и даже воспалительную реакцию (Hu R.P. et al., 2011; Marazziti D. et al., 2012; Li J. et al., 2013; Feng X.L. et al., 2015). Обнаружено, что НЧ TiO_2 вызывают нейровоспалительный ответ, о чем свидетельствует повышение уровня противовоспалительных цитокинов, высвобождаемых активированной микроглией мозга мышей (Su M. et al., 2015). Выявлено нарушение экспрессии генов, связанных с сигнальными путями нейротропина, такими как фактор роста нервов (NGF) и нейротрофический фактор мозга (BDNF). В экспериментах *in vitro* показано, что НЧ TiO_2 (20 нм) повышают образование агрегатов бета-амилоидного пептида в нейронах ЦНС, который является отягчающим фактором развития нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, НЧ TiO_2 способны вызывать дисбаланс между процессами образования и инактивации свободных радикалов: повышение образования АФК, индуцированное воздействием НЧ, превосходит способность биологических антиоксидантов предотвращать ОС, что в конечном счете приводит к нарушениям функций ЦНС. Морфофункциональные изменения со стороны ЦНС и в первую очередь подкорковых структур и гиппокампа, являющихся частью лимбической системы, до сих пор до конца не раскрыты.

Наиболее чувствительной к любым неблагоприятным воздействиям среды является иммунная система, представленная тимусом, селезенкой, лимфатическими узлами, а также система крови (Ерофеева Л. М. и др., 2005;

Васендин Д. В., 2011; 2014; Бгатова Н.П. и др., 2014; Кварацхелия А.Г. и др., 2016; Susan A. Elmore, 2012; Ngobili T.A., Daniele M.A., 2016). Вместе с тем данные о морфофункциональных изменениях лимфоидных органов при воздействии НЧ TiO_2 носят фрагментарный характер. Так, в ряде работ показано, что ежедневное внутрибрюшинное введение НЧ TiO_2 приводит к гиперемии красной и белой пульпы селезенки мышей, усилению пролиферативных процессов в лимфоидных узелках и интенсивности апоптоза клеток. Показано, что на фоне перорального введения НЧ TiO_2 в клетках селезенки возникает ОС, опосредованный активацией p38-Nrf-2 сигнального пути, что приводит к снижению эффективности иммунного ответа (Heringa M. B. et al., 2018). В исследованиях токсического действия внутрижелудочного введения анатазной формы нанодисперсного TiO_2 (Dua Y. et al., 2010; Moon E.Y. et al., 2011) обнаружено снижение активности В- и Т-лимфоцитов (Т-хелперов, Т-цитотоксических/супрессоров, а также изменение их соотношения в печени), усиление процессов апоптоза и активация макрофагов. Таким образом, морфофункциональные изменения лимфоидных органов и иммунных клеток при воздействии рутильной формы нанодисперсного TiO_2 недостаточно изучены.

Результаты исследований последних лет показали, что НЧ TiO_2 оказывают негативное влияние не только на соматические, но и половые клетки, что является следствием нарушения процессов гаметогенеза (Morgan A.M., 2017). Клеточные механизмы, лежащие в основе нарушений сперматогенеза и овогенеза под влиянием НЧ, остаются малопонятными. Относительно сперматогенеза – до сих пор не ясно, какие из клеток сперматогенного эпителия наиболее чувствительны к повреждающему действию НЧ. Следует отметить, что негативное влияние НЧ TiO_2 на репродуктивную систему не ограничивается влиянием на сперматогенез, но также затрагивает как овогенез, так и эмбриональное развитие (Warheit D.B., 2015). Несмотря на то, что этим вопросам посвящено достаточно большое количество исследований, механизмы этих нарушений и клетки-мишени для НЧ в органах женской репродуктивной системы до сих пор не исследованы, а имеющиеся в литературе сведения, посвященные данной проблеме, во многом противоречивы.

Показано, что длительное воздействие НЧ TiO_2 (90 дней) приводит к подавлению экспрессии генов, связанных с синтезом эстрогена и прогестерона (Gao G. et al., 2012). Известно, что НЧ при различных способах введения проникают через плацентарный барьер, повышая частоту резорбции плодов, и оказывают негативное воздействие на развитие эмбрионов (Sumner S. C. et al., 2010; Snyder R. W. et al., 2015). Несмотря на то, что использование НЧ TiO_2 в быту считается относительно безопасным по сравнению с другими наноматериалами, достаточных доказательств этого до сих пор нет, так как процессы гаметогенеза и эмбриогенеза в условиях воздействия НЧ не исследованы в полной мере.

Таким образом, несмотря на значительное число публикаций, посвященных исследованию влияния НЧ TiO_2 , систематизированные данные о морфофункциональных изменениях нервной, иммунной, репродуктивной систем в литературе отсутствуют, что не позволяет в полной мере оценить эффект их воздействия на организм человека.

Цель исследования – охарактеризовать морфофункциональное состояние нервной, иммунной и репродуктивной систем при воздействии рутильной формы нанодисперсного диоксида титана в экспериментальных условиях.

Задачи исследования:

1. Провести морфометрическое исследование тимуса, селезенки, поверхностных шейных лимфатических узлов и оценить выраженность пролиферативной активности, интенсивности апоптоза и макрофагальную реакцию для выявления морфофункциональных изменений лимфоидных органов при ежедневном пероральном введении крысам НЧ TiO_2 (рутил, 30 дней, 10 мг/кг массы тела).

2. Выявить изменения структурных и упругих свойств нейтрофилов периферической крови человека при инкубации с НЧ TiO_2 в системе *in vitro* с помощью высокоразрешающей атомно-силовой микроскопии.

3. Оценить изменения клинко-лабораторных показателей и активности индикаторных ферментов печени в крови крыс при пероральном введении НЧ TiO_2 .

4. Охарактеризовать на тканевом и ультраструктурном уровнях морфофункциональные изменения печени крыс, оценить количество CD68⁺ макрофагов и Ki-67⁺ клеток при пероральном введении НЧ TiO₂.

5. Оценить морфометрические показатели нейронов зон CA1, CA3, зубчатой извилины гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса при интраназальном введении НЧ TiO₂, охарактеризовать морфологические и ультраструктурные изменения нейронов, реактивные изменения астроцитов на основании иммуногистохимического выявления антител к глиальному кисломю фибриллярному белку (GFAP), чувствительность клеток к эндотелиальному фактору роста сосудов на основании изучения экспрессии рецептора VEGFR-1/Flt-1.

6. Установить эффекты интраназального введения НЧ TiO₂ на функции ЦНС путем анализа амплитудных, спектральных характеристик электроэнцефалограммы головного мозга и особенностей поведения крыс.

7. Оценить морфометрические показатели сперматогенного эпителия и интерстициальных клеток Лейдига, пролиферативную активность клеток сперматогенного эпителия и динамику изменения количества сперматогоний по числу Ki-67⁺ и c-kit⁺ клеток в семенниках крыс при пероральном введении НЧ TiO₂.

8. Определить эмбриотоксические эффекты НЧ TiO₂ при пероральном введении крысам в течение всего срока беременности путем оценки уровня предимплантационной и постимплантационной смертности.

9. Исследовать отдаленные эффекты антенатального воздействия НЧ TiO₂ при ежедневном пероральном введении крысам во время беременности путем анализа развития потомства крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза.

Научная новизна. Впервые охарактеризованы морфофункциональные изменения органов лимфоидной, нервной и репродуктивной систем при воздействии нанодисперсного TiO₂ рутильной модификации.

При пероральном введении НЧ TiO₂ в концентрации, эквивалентной среднесуточной дозе потребления человеком, в тимусе, в белой пульпе селезенки наблюдалось опустошение коркового вещества, снижение пролиферативной

активности клеток в сочетании с увеличением числа гибнущих клеток по механизму апоптоза. В лимфатических узлах выявлены гиперплазия В- и Т-зон, макрофагальная реакция в синусах.

В печени на фоне дистрофических изменений и повышения активности индикаторных ферментов увеличивалось количество CD68⁺ макрофагов, пролиферативная активность гепатоцитов.

В системе *in vitro* методом атомно-силовой микроскопии установлено, что инкубация нейтрофилов с НЧ TiO₂ вызывала изменения механических свойств поверхности нейтрофилов, что косвенно свидетельствует об уменьшении скорости их миграции, задержке и агрегации в микроциркуляторном русле.

При интраназальном введении НЧ TiO₂ были выявлены дегенеративные изменения нейронов, активация астроцитов и процессов ангиогенеза. Обнаружены существенные изменения биоэлектрической активности нейронов фронтальной и теменной областей коры головного мозга крыс, а также повышение тревожности и уровня ориентировочно-исследовательской активности животных.

На фоне перорального введения НЧ TiO₂ в сперматогенном эпителии определялись дистрофические изменения: уменьшение его толщины, дезорганизация слоев, появление клеток с признаками дегенерации, снижение пролиферативной активности, сокращение числа c-kit⁺ стволовых клеток, что в совокупности свидетельствовало о нарушении процессов сперматогенеза.

Результаты изучения влияния НЧ TiO₂ при пероральном введении самкам крыс в течение всего периода беременности выявили увеличение показателей предимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности, а также признаки снижения скорости роста и морфо-функционального развития потомства в период раннего постнатального онтогенеза.

Научно-практическая значимость. Получены новые данные фундаментального характера, раскрывающие морфологические и физиологические аспекты влияния рутильной формы нанодисперсного TiO₂ на различные органы и ткани, которые приближают нас к пониманию механизмов их токсического воздействия на организм в целом. Полученные данные представляют практический

интерес, поскольку традиционно считается, что нанодисперсный TiO_2 в рутильной модификации гораздо менее токсичен, чем его анатазная кристаллическая форма. Поскольку в настоящее время высока вероятность непреднамеренного воздействия на человека различных наноматериалов, в том числе и НЧ TiO_2 , ввиду их широкомасштабного использования в различных сферах жизнедеятельности, появилась необходимость максимально уменьшить риски отрицательных последствий таких контактов. Однако на сегодняшний день, к сожалению, отсутствуют адекватные методы диагностики и лечения последствий неблагоприятного воздействия НЧ на организм человека. В связи с этим полученные нами данные позволяют разработать новые подходы для устранения негативных эффектов наноматериалов на клетки организма и меры их профилактики. Выявленные морфофункциональные изменения в ключевых, в том числе и регуляторных, системах показали, что при длительном воздействии НЧ TiO_2 даже максимальные допустимые уровни его содержания в продуктах питания, косметических средствах с учетом их способности аккумулироваться в организме не всегда являются безопасными для человека. Полученные данные о влиянии длительного воздействия рутильной формы нанодисперсного TiO_2 на иммунную, нервную и репродуктивную системы могут стать основой для дальнейших исследований по установлению безопасных уровней его содержания в продовольственных товарах, лекарственных препаратах, средствах гигиены и т.д., так как их использование не регламентировано санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами, а концентрация устанавливается технологическими инструкциями, то есть самим производителем.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 5, 6.

Методология и методы исследования. Методология заключалась в системном подходе и комплексном анализе результатов морфологического исследования и их сопоставлении с данными иммуногистохимического, морфометрического, ультрамикроскопического, биохимического исследований и атомно-силовой микроскопии. Проведен критический анализ отечественных и

зарубежных научных трудов в области нанотоксикологии, которые явились теоретической и методологической базой диссертационного исследования. В работе были использованы *in vitro* модели, а также комплекс методов: гистологические морфометрические, электронномикроскопические, биохимические, гематологические, электрофизиологические, поведенческие тесты, статистический анализ, позволившие детально изучить не только структурные изменения тканей и адекватно идентифицировать клетки, но и охарактеризовать их функциональное состояние.

Степень достоверности и апробация работы. Высокая степень достоверности результатов, обоснованность выводов обеспечивается достаточным количеством исследованного материала, использованием современных апробированных методов исследования, адекватной статистической обработкой полученных результатов исследования, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

Основные положения работы представлены и обсуждены на научной конференции «Организация и пластичность коры больших полушарий головного мозга» (Москва, 2001); 8-м международном симпозиуме «Базальные ганглии и поведение в норме и при патологии» (Санкт-Петербург, 2002); 4-й международной конференции по функциональной нейроморфологии (Санкт-Петербург, 2002); Всероссийской конференции «Пластичность и структурно-функциональная взаимосвязь коры и подкорковых образований мозга» (Москва, 2003); международной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2004); международной конференции «The Summer Workshop on «Dynamics of Dispersed Systems: Experimental and Numerical Research on Nano-, Micro-, Meso- and Macroscale» (Уфа, 2014); Всероссийской конференции «Современная нейробиология: достижения, закономерности, проблемы, инновации, технологии» (Уфа, 2015); XIII конгрессе Международной ассоциации морфологов (Петрозаводск, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экологии человека» (Уфа, 2015);

IV международной конференции «Modern problem in systemic regulation physiological functions Conference proceedings» (Москва, 2015); VI межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению» (Екатеринбург, 2017, 2018); 5-й международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы (Nanomaterials and living systems)», NLS-2018 (Казань, 2018); XIV международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018); XIV конгрессе Международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018); конференции, посвященной 100-летию ВГМУ им. Н.Н. Бурденко и преподавания гистологии «Общегистологические аспекты современной медицины» (Воронеж, 2018); VII международной научно-практической конференции «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск, 2018).

Личное участие автора заключалось в планировании исследования, постановке цели и задач, выборе методов исследования и подборе адекватных маркеров, проведении экспериментов, заборе материала для исследования, анализе экспериментальных данных, статистической обработке, теоретическом обобщении результатов исследования, подготовке публикаций.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе при изложении лекционного курса и проведении практических занятий на кафедре общей патологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Положения, выносимые на защиту

1. Пероральное введение НЧ TiO_2 рутильной модификации приводит к выраженным морфофункциональным изменениям лимфоидных органов (тимуса, селезенки, поверхностных шейных лимфатических узлов), которые сопровождаются нарушением процессов пролиферации, повышением интенсивности апоптоза клеток. В тимусе наблюдается морфологическая картина акцидентальной инволюции, приводящей к гипотрофии органа, в селезенке обнаружена редукция белой пульпы с опустошением Т- и В-зависимых зон, в поверхностных лимфатических узлах шеи определяется гиперпластическая реакция лимфоидной ткани.

2. Негативные эффекты НЧ TiO_2 на нейтрофилы периферической крови человека заключаются в значительном изменении морфологии клеток и повышении ригидности их поверхности, что косвенно указывает на потенциально низкую деформируемость в микроциркуляторном русле и, следовательно, на нарушение миграционной способности лейкоцитов.

3. Следствием интраназального поступления НЧ TiO_2 являются морфофункциональные нарушения в гиппокампе и центральном ядре миндалевидного комплекса головного мозга, заключающиеся в повреждении нейронов, изменении нейро-глиального соотношения, активации процессов ангиогенеза и сопровождающиеся нарушением функциональных характеристик ЦНС (изменение биоэлектрической активности головного мозга, снижение ориентировочно-исследовательской активности, нарастание негативно-эмоционального состояния).

4. Сперматогенез обладает высокой чувствительностью к воздействию НЧ TiO_2 , что проявляется деструктивными изменениями сперматогенного эпителия и интерстициальной ткани семенников, уменьшением количества $c\text{-kit}^+$ стволовых клеток и снижением их пролиферативной активности.

5. Эндогенное поступление НЧ TiO_2 в организм самок крыс во время беременности является существенным фактором риска и приводит к повышению

уровня эмбриональной смертности, нарушению как антенатального, так и раннего постнатального развития потомства, что свидетельствует об эмбриотоксическом влиянии наночастиц.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 40 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 14 — в журналах, включенных ВАК России в перечень изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 257 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа сопровождается 69 рисунками и 14 таблицами. Список литературы включает 584 наименования (100 отечественных и 484 иностранных).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика наночастиц

Динамичное развитие нанотехнологий привело к крупномасштабному производству и применению материалов, содержащих наноразмерные частицы (НЧ). Под наночастицами понимают изолированные твёрдофазные объекты, имеющие отчётливо выраженную границу с окружающей средой, размеры которых во всех трёх измерениях составляют от 1 до 100 нм. Ряд уникальных физико-химических свойств НЧ по сравнению с традиционными микроструктурными материалами обуславливает их широкое использование в различных отраслях промышленности и биомедицине (Pelaz V., et al., 2017). В настоящее время НЧ находят применение в микроэлектронике, энергетике, химической, пищевой, парфюмерно-косметической промышленности, оптике, строительстве, контроле и охране состояния окружающей среды (Kunzmann A., et al., 2011; Vance M. E. et al., 2015; Pelaz V. et al., 2017). Уникальные свойства наноматериалов и их биологическая активность позволяют использовать их для адресной доставки лекарственных препаратов в терапии кардиологических, онкологических и ряда других заболеваний, в геномной и молекулярной инженерии (Cheng Y. et al., 2014; Shen Y. et al., 2017; von Moos L.M., 2017; Winkler H.C. et al., 2018).

1.1.1 Типы наночастиц и их применение в биомедицине

Наночастицы можно разделить на три основные группы: органические наночастицы (липосомы и полимеры), неорганические наночастицы (металлы, оксиды металлов, керамические, квантовые точки) и наночастицы на основе углерода (De Matteis V., Rinaldi R., 2018).

Липосомальные наночастицы. Это сферические везикулы с мембраной, состоящей из липидного бислоя, содержащие гидрофильное вещество. Для создания таких везикул используются амфифильные молекулы, подобные биологическим мембранам для повышения биологической и фармацевтической

доступности, а также безопасности действия различных лекарственных средств (Panahi Y. et al., 2017). Активное соединение может быть гидрофильным и, следовательно, находиться в водном пространстве или гидрофобным, оставаясь в липидной мембране. Липосомальные НЧ имеют большие возможности применения в наномедицине, а также в пищевой и косметической промышленности ввиду их высокой биосовместимости и биоразлагаемости. В настоящее время липосомы в основном используются для доставки химиотерапевтических препаратов при лечении рака (Malam Y., Loizidou M., Seifalian A. M., 2009). Они также могут связывать большой спектр биологически активных веществ, включая фармацевтические препараты или пищевые ингредиенты. В последние годы технология получения нанолипосом стала высокоразвитой, предлагая реальные возможности для специалистов в таких областях, как контролируемое высвобождение и инкапсулирование пищевых ингредиентов и улучшение стабильности и биодоступности чувствительных соединений. Таким образом, они широко используются в качестве контейнеров для инкапсулирования и контролируемого высвобождения биологически активных веществ (Panahi Y. et al., 2017).

Полимерные наночастицы. Большинство полимерных наночастиц известно своей биоразлагаемостью и биосовместимостью и чаще других НЧ становятся составной частью систем доставки лекарственных препаратов (Farokhzad O. S., Langer R. 2009; Patel T. et al., 2012; El-Say K. M., El-Sawy H. S. 2017). Этот тип наночастиц может быть изготовлен из природных полимеров, таких как хитозан или синтетических полимеров, таких как полилактиды, поли(метилметакрилат) (ПММА) или полиэтиленгликоль (ПЭГ) (El-Say K. M., El-Sawy H. S., 2017). Они обладают прекрасными свойствами, т.к. поверхность таких НЧ легко поддается модификации, а размер и растворимость можно контролировать на стадии производства.

Наночастицы металлов и их соединений. Металлические НЧ золота (Au), обладают уникальными электронными и оптическими свойствами, они нетоксичны и биосовместимы, а их поверхность может быть модифицирована другими

биомолекулами ввиду их отрицательного заряда (Chen P. C., 2008; Patra C. R. et al., 2010). Поверхность Au обладает уникальной возможностью связывания различных лигандов, таких как белки, олигонуклеотиды и антитела, содержащие функциональные группы, например, фосфины, тиолы, меркаптаны и амины, имеющие высокое сродство к поверхности золота (Alivisatos A. P. et al., 1996). Наноконъюгаты на основе Au находят применение для диагностики различных заболеваний. Так, Ел-Саед и соавт. (El-Sayed I. et al., 2005) использовали НЧ Au для визуализации злокачественных новообразований путем избирательной транспортировки этих НЧ в ядро раковых клеток, что подчеркивает важность применения их в биомедицине (Gao H., Shi W., Freund L. B., 2005).

Наночастицы оксидов металлов обладают выраженной каталитической и антиоксидантной активностью, химической стабильностью, оптическими свойствами и биосовместимостью, благодаря чему они столь привлекательны для применения в биомедицине. Наиболее широко используются оксид железа (Fe_3O_4), диоксид титана (TiO_2), диоксид циркония (ZrO_2) и оксид церия (CeO_2) (Andreescu S. et al., 2012). Например, НЧ TiO_2 входят в состав медицинских имплантатов из-за биосовместимости их поверхности. Высокая каталитическая способность и выраженные антиоксидантные свойства НЧ ZrO_2 позволяют использовать их в качестве антиоксидантных и противовоспалительных средств (Celardo I. et al., 2011). Все возрастающий интерес представляют и НЧ CeO_2 , обладающие уникальным комплексом физико-химических свойств, благодаря которым этот материал проявляет высокую биологическую активность. Так, НЧ CeO_2 обладают дифференцирующими свойствами по отношению к здоровым и опухолевым клеткам: в малых концентрациях они способны защищать здоровые клетки от канцерогенов, при увеличении концентрации – способствуют гибели раковых клеток при сохранении жизнеспособности здоровых. Кроме того, уникальные свойства НЧ CeO_2 заключаются в том, на своей поверхности эти НЧ имеют много дефектов, в основном кислородные вакансии, которые приводят к сочетанию сосуществующих состояний окисления церия (IV) и церия (III), то есть к редокс-паре, которая лежит в основе каталитической активности НЧ CeO_2 . Эти

характеристики обуславливают интерес использования этих НЧ в качестве биологического антиоксиданта. В настоящее время НЧ CeO_2 используется в оказании помощи больным, т.к. они способны перехватывать реакционные кислородные соединения, образующиеся в результате ишемии и вызывающие гибель клеток мозга. Другим примером использования в биомедицинских приложениях НЧ оксидов металлов являются НЧ пористого кремнезема (SiO_2). Благодаря большой удельной площади их поверхности, объема пор, контролируемого размера частиц и хорошей биосовместимости они находят применение в доставке лекарственных средств в биомедицине и биосенсорах (Wang Y. et al., 2015). Исследования продемонстрировали эффективность использования и других НЧ, например, оксида цинка (ZnO) для доставки лекарственных средств и биовизуализации. Однако, поверхность НЧ ZnO для защиты от среды биологической системы требует модификации, поскольку они легко растворимы в воде и кислых растворах. Кроме того, для использования наночастиц ZnO для флуоресценции при визуализации они сначала должны быть легированы, поскольку полоса ZnO находится в УФ области, а УФ-свет не может проникать в ткани и может быть вреден для клеток и тканей (Zhang Z.-Y. et al., 2013).

Керамические наночастицы. Это неорганические соединения с пористыми свойствами способны транспортировать такие молекулы, как белки, ферменты или лекарственные средства, без набухания и ухудшения пористости в результате внешнего воздействия pH или температуры (Singh D. et al., 2013). Наиболее часто используются НЧ кремнезема и алюминия. Однако ядро этих НЧ не ограничивается этими двумя материалами, а фактически может состоять из комбинации металлических и неметаллических материалов (Singh D. et al., 2014). Например, НЧ мезопористого кремнезема, покрытые CeO_2 , были разработаны в качестве транспортных средств для доставки лекарств в раковые клетки легких путем высвобождения β -циклодекстрина (Xu C. et al., 2013).

В настоящее время во многих медицинских приложениях используется широкий спектр керамических наноматериалов, включая глинистые минералы,

цемент и стекло. Биосовместимая керамика, также известная как биокерамика, главным образом используется в стоматологии. Биокерамические НЧ имеют хорошую биосовместимость, гидрофильность, остеопроводимость, биоразлагаемость и резорбируемость. Наиболее широко используемые керамические нанобиоматериалы — фосфат кальция, сульфат и карбонат кальция, трикальций фосфат, гидроксипатит, биоактивная стеклянная керамика, керамика на основе диоксида титана, керамика из оксида алюминия, керамика из циркония и керамические полимерные композиты. Все они применяются в наномедицине, ортопедии, направленной костной регенерации, стоматологии и тканевой инженерии, а также для других биомедицинских целей (Букреева Т.В. и др., 2011; Dziadek M., Stodolak-Zych E., Cholewa-Kowalska K., 2017).

Квантовые точки. Это НЧ, изготовленные из полупроводниковых материалов с флуоресцентными свойствами. Квантовые точки (КТ) состоят из полупроводникового ядра (например, кадмий–селен (селенида кадмия), кадмий–теллур, индий–фосфата, или индия–арсенат), покрытого оболочкой (например, сульфида цинка для улучшения их оптических и физических свойств, а также для предотвращения утечки токсичных тяжелых металлов (Ghaderi S. et al., 2011). Эти НЧ являются наиболее используемыми в биоимиджинге и анализе биосигналов, однако требуется их конъюгация с биомолекулами, такими как белки, пептиды или олигонуклеотиды (Xing Y. et al., 2009).

Биосовместимость квантовых точек имеет важное значение для их биологического и биомедицинского применения. Одним из наиболее важных КТ являются золотые квантовые точки, обладающие свойствами, аналогичными свойствам наночастиц золота, однако, в отличие от других КТ, они не проявляют флуоресценции. Вместо этого они обладают колориметрическими свойствами, что позволяет их использовать в таких методах как секвенирование ДНК, гибридизационные анализы, проточная цитометрия и иммуноблоттинг (Сао Y. С., Jin R., Mirkin C. A., 2002).

Наночастицы на основе углерода. К ним относятся фуллерены и нанотрубки. Фуллерены — это новые аллотропы углерода с полигональной структурой,

состоящие исключительно из 60 атомов углерода (Cha C. et al., 2013). Углеродные нанотрубки (УНТ) обычно изготавливаются из химического осаждения из паровой фазы графита. Существуют два класса углеродных нанотрубок: одностенные (ОУНТ) и многостенные (МУНТ), последние проявляют мощные антимикробные свойства (Maleki Dizaj S. et al., 2015). Наночастицы на основе углерода представляют интерес в биомедицинских приложениях в силу своих физических свойств, в том числе высокой электропроводности и превосходной механической прочности, но не являются биоразлагаемыми и требуют модификации поверхности, так как имеют определенную тенденцию к образованию крупных агрегатов (Miglietta M. L. et al., 2009; Patra M. et al., 2011; Vardharajula S. et al., 2012).

Уникальная противомикробная активность УНТ положена в основу разработок по защите здоровья человека и в частности УНТ могут оказаться полезными для дезинфекции воды, создания антимикробных покрытий и препаратов (Митрофанова И.В. и др., 2014). Одним из направлений использования антимикробных свойств нанотрубок является создание бионанопленок. Бионанопленки – это материалы, которые получают после нанесения наноматериалов на поверхность. Они биосовместимы, имеют высокую антимикробную активность, инертны, гидрофильны и легко удаляются после нанесения. Наибольшее распространение получили наноструктуры на основе углеродных нанотрубок, функционализированных поливиниловым спиртом и NCH Ag (Otsuka H. et al., 2003).

Среди важных задач, которые встают перед исследователями, – прижизненная визуализация опухолей *in vivo*. Одним из современных методов неинвазивной визуализации органов и тканей является фотоакустическая томография. Повысить контрастность опухоли можно введением контрастирующих агентов на основе УНТ, ассоциированных с циклическим аргинилглициласпарагиновым пептидом (Bianco A. et al., 2005). Фотоакустический сигнал ОУНТ находится в линейной зависимости от их концентрации.

Использование ОУНТ в качестве контрастного вещества позволяет получить изображение ткани на достаточной глубине (De La Zerda A. et al., 2008).

Магнитные МУНТ также могут стать основой технологии отслеживания пораженных лимфатических узлов для распознавания и их удаления за счет агрегации магнитных частиц в очагах метастазирования. Для выявления лимфатических метастазов были разработаны МУНТ, которые успешно доставляют гемцитобин в лимфатические узлы (Yu X. et al., 2010), и МУНТ, растворяющиеся в воде путем полимеризации акриловой кислотой *in situ* (Yang F. et al., 2009).

Высокая удельная поверхность, а, следовательно, высокая реакционная способность НЧ металлов и оксидов металлов позволяет использовать их для подавления роста патогенных бактерий, в том числе устойчивых к антибиотикам (Chouikrat R. et al., 2012). Облучение наночастиц относительно маломощным излучением может привести к фотостимулированным реакциям на их поверхности. Такие реакции — в частности, генерация синглетного кислорода, используются в фотодинамической терапии. Фотодинамическая терапия (ФДТ) является современным и быстро развивающимся методом диагностики и лечения широкого спектра заболеваний, от лечения рака до лечения корневого канала благодаря своим антибактериальным эффектам (Idris N.M. et al., 2012; Cheng Y. et al., 2015; Dobson J. et al., 2018).

Фотодинамическая терапия предполагает совместное действие химиотерапевтических и физических (лазерное излучение, излучение светодиодов и других источников) факторов в присутствии кислорода. Метод основан на селективном накоплении фотосенсибилизатора в опухолевой ткани, который способен генерировать цитотоксические агенты, вызывающие гибель опухолевых клеток при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей максимальной абсорбции (Poon I.K.H. et al., 2014; Huang H.C. et al., 2015). Сенсибилизатор вводится в организм, чаще всего внутривенно, и накапливается в тканях опухоли. Затем ткани, пораженные патологическим процессом, облучают светом. Поглощение молекул фотосенсибилизатора квантов света в присутствии

кислорода приводит к фотохимической реакции, которая приводит к образованию синглетного кислорода, вызывая некроз опухолевых клеток. На ранних стадиях развития опухоли ее клетки питаются кислородом, но по мере роста ткани возникает потребность в кровоснабжении. Стенки новообразованных сосудов не так прочны, как в здоровых сосудах, поэтому необходимо использовать НЧ, которые могут проникать в стенки новообразованных сосудов и накапливаться в тканях опухоли.

Сформированные комплексы обладают новыми свойствами. Наночастицы могут быть ассоциированы с нуклеиновыми кислотами и белками, встроенными в мембраны, проникать в клеточные органеллы, изменяя функции биологических структур (Xie J. et al., 2013; Chen Z. et al., 2016). Развитие знаний в области применения наночастиц привело к возможности использования данной технологии в методе ФДТ (Calixto G. et al., 2016). Недавние исследования показали, что металлические НЧ могут быть использованы в качестве фотосенсибилизаторов. В настоящее время, в ряде исследований проводится изучение возможности использования НЧ на основе оксида молибдена, TiO_2 , ZnO и оксида вольфрама в качестве фотосенсибилизаторов в ФДТ (Cheng L. et al., 2014; Colombeau L. et al., 2016; Ding D. et al., 2017).

Способность НЧ продуцировать активные формы кислорода, повреждающие бактерии и связываться с их ДНК или РНК, препятствуя репликации микробиологических процессов, позволяет использовать НЧ как антибактериальные агенты (Arvizo R.R. et al., 2012; Zain N.M. et al., 2014). А небольшие размеры НЧ обуславливают их беспрепятственное попадание в клетки и ткани организма и легкого попадания в кровь (Singh M. et al., 2011). В течение многих лет антибактериальное действие НЧ широко исследовалось. Однако до сих пор обсуждается отсутствие способности некоторых НЧ различать бактерии, несмотря на их токсичность для многих клеток живого организма. К НЧ с антибактериальной активностью относятся НЧ серебра, золота, железа, оксида железа, оксида меди, оксида цинка, оксида алюминия, диоксида титана и галлия.

Так, в последние годы появились данные, что НЧ на основе металлов обладают потенциалом для преодоления лекарственной устойчивости, которая осложняет лечение туберкулеза при использовании антибиотиков на протяжении длительного периода времени (Jafari A.R. et al., 2016). Наночастицы Ag в чистом виде не проявляют выраженного цитотоксического эффекта и не подавляют рост микобактерий туберкулеза *in vitro*. Однако, смесь НЧ серебра и оксида цинка в определенном соотношении оказывает мощное антибактериальное действие в отношении микобактерий туберкулеза (Praba V.L. et al., 2013; Jafari A.R. et al., 2016). Помимо туберкулеза, НЧ Ag также рассматриваются в качестве потенциального средства для лечения заболеваний, передающихся половым путем, таких как хламидиоз, гонорея и сифилис. Хламидиоз передается половым путем инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*, которая, как правило, вызывает тяжелые воспалительные реакции. Используя НЧ серебро-поливинилпирролидон с хорошей противовоспалительной активностью (Yilma A.N. et al., 2013) на модели хламидийной инфекции в лабораторных исследованиях на мыши макрофагов J774 показано, что эти НЧ проявляют выраженный антибактериальный эффект. Кроме того, эти НЧ эффективны при лечении гонореи и сифилиса из-за их способности взаимодействовать с клеточной мембраной бактерий (Alexander J.W., 2009). Наночастицы серебра также используются для лечения инфекций мочевыводящих путей (Jacob Inbaneson S. et al., 2011). Включение ионов серебра на мочевого катетер также снижает риск инфекций мочевыводящих путей (Pickard R. et al., 2012; Ritter J. et al., 2013). Катетеры Bardex IC и Dover IC, покрытые слоем НЧ серебра, высвобождают ионы Ag, тем самым предотвращая инфекции мочевыводящих путей (Ford J., Hughes G., Phillips P., 2014).

Наночастицы оксида меди также проявляют антибактериальную активность. Ахамед с соавт. (2014) показали, что НЧ оксида меди были эффективны против широкого спектра штаммов бактерий. Однако, НЧ проявляли высокую активность по отношению к *E. coli* и *E. faecalis* и менее активны к *K. pneumoniae* (Ahamed M. et al., 2014).

1.1.2 Наночастицы диоксида титана

Среди наноматериалов на сегодняшний день в наиболее крупных масштабах вырабатываются и используются наночастицы диоксида титана (TiO_2). Так, например, производство нанодисперсного TiO_2 составляет 70% от общего объема производства пигментов во всем мире (Baan R. et al, 2006; Ruth Magaye J.Z. et al., 2012). Ежегодно во всем мире потребляется около 4 млн тонн TiO_2 (Ortlieb M., 2010), который входит в пять топ-5 наноматериалов (Лаштур А.Л., Ерёмин В.В. 2015; Shukla R.K. et al., 2011), используемых в потребительских товарах. Диоксид титана применяется в качестве отбеливающего агента в потребительских товарах и продуктах питания в связи с его яркостью, стойкостью к изменению цвета и высоким показателем преломления. Диоксид титана используется для производства красок, бумаги, пластмасс, чернил, лекарственных препаратов, пищевых продуктов (пищевая добавка E171), косметики, зубных паст, солнцезащитных кремов и т.д. (Соколова О.С., 2012; American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) Threshold limit values and biological exposure indices for 1992–1993. Cincinnati: Ohio: American Conference of Governmental industrial hygienists; 1992; Participants IRSIW, 2000). К пищевым продуктам с высоким содержанием TiO_2 относятся жевательные резинки и леденцы (Лукутцова Н.П. и др., 2015; Zhao J. et al., 2009). По данным просвечивающей электронной микроскопии около 36% частиц в составе E171 имеют размер меньше, чем 100 нм (Lee K.P. et al., 1985). В области наномедицины НЧ TiO_2 обсуждаются как полезный инструмент для визуализации нанотерапевтических средств (IARC. Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. IARC Sci Publ. 2006; 86) и рассматриваются как потенциальный фотосенсибилизатор для использования в фотодинамической терапии онкологических больных (Sun J., et al., 2018).

Физико-химические свойства. Титан (Ti) — девятый по распространенности элемент в земной коре, средняя концентрация которого в

земной коре составляет 4400 мг/кг. Благодаря своему высокому сродству к кислороду и другим элементам Ti не существует в свободном состоянии в природе. Наиболее распространенное окисленное состояние Ti составляет +4, но существуют +3 и +2 состояния. Металлические Ti, TiO₂ и TiCl₄ являются наиболее широко используемыми в промышленности соединениями. Диоксид титана, TiO₂, также известный как оксид титана (IV), ангидрид титановой кислоты, титан, титановый ангидрид или Ti-белый, представляет собой природный оксид Ti. Диоксид титана представляет собой белый негорючий порошок без запаха с молекулярной массой 79,9 г/моль, температурой кипения 2972°C, температурой плавления 1843°C и относительной плотностью 4,26 г/см³ при 25°C, это плохо растворимые частицы, которые широко используются в качестве белого пигмента. Анатаз и рутил - две кристаллические формы TiO₂, причем анатаз является более химически реактивной его формой (Warheit D.V. et al., 2007; Sayes C.M. et al., 2006). Например, Саес с соавт. (Sayes C.M. et al., 2006) показали, что НЧ TiO₂ (80/20; анатаз/рутил, 3-5 нм, 100 мкг / мл) генерировали в 6 раз больше активных форм кислорода (АФК), чем рутил после УФ-облучения. Было высказано предположение, что анатаз TiO₂ более токсичен, чем TiO₂ рутил (Хуе С. et al., 2010; Petkovic J. et al., 2011). Наночастицы TiO₂ обычно представляют собой смесь форм анатаза и рутила. На физико-химические свойства НЧ влияют форма, размер, характеристики поверхности и внутренняя структура. Микроразмерная форма TiO₂ (рутильная форма) считается химически инертной. Однако, с уменьшением размера частиц площадь поверхности увеличивается, что и вызывает озабоченность у исследователей ввиду возможного вредного воздействия НЧ TiO₂ на здоровье человека (Andersson P. et al., 2011; Wang C., Li Y., 2012). Модификация поверхности НЧ, например, специальное покрытие, влияет на активность НЧ TiO₂. Так, после модификации поверхности НЧ TiO₂ полимером наблюдалось ослабление их цитотоксических эффектов (Saber A.T. et al., 2012; Tedja R. et al., 2012).

Таким образом, НЧ TiO₂ обладают различными физико-химическими свойствами по сравнению с микроразмерной формой TiO₂, что, вероятно,

определяет их биологическую активность. Исходя из этого факта, следует тщательно подойти к оценке неблагоприятных последствий воздействия НЧ TiO_2 для здоровья человека и окружающей среды, даже несмотря на известный факт низкой токсичности микродисперсной формы TiO_2 .

Применение. TiO_2 – белый пигмент, который широко используется ввиду его яркости и очень высокого показателя преломления. Ежегодно по всему миру потребляется около четырех миллионов тонн этого пигмента (Ortlieb M., 2010). Кроме того, TiO_2 составляет 70% от общего объема производства пигментов во всем мире (Baan R. et al, 2006; Ruth Magaye J.Z. et al., 2012) и входит в топ-5 НЧ, используемых в потребительских продуктах (Shukla R.K. et al., 2011). Диоксид титана может использоваться в производстве красок, покрытий, пластмасс, бумаги, чернил, лекарств, фармацевтических препаратов, пищевых продуктов, косметики и зубной пасты (Wolf R. et al., 2003; Kaida T. et al., 2004). Этот наноматериал применяется даже в качестве пигмента для отбеливания обезжиренного молока. Кроме того, НЧ TiO_2 уже давно используются в качестве компонента для создания протезных имплантатов, особенно тазобедренного и коленного суставов (Jacobs J.J. et al., 1991; Sul Y.T. et al., 2010). Однако, такие имплантаты иногда оказываются несостоятельными ввиду деградации материалов в имплантате или хронического воспалительного ответа на материал имплантата (Sadrieh N. et al., 2010).

В настоящее время НЧ TiO_2 производятся в большом количестве и широко используются из-за их высокой стабильности, антикоррозионных и фотокаталитических свойств (Riu J. et al., 2006). Наночастицы TiO_2 могут использоваться в каталитических реакциях, таких как полупроводниковый фотокатализ, при обработке воды, загрязненной опасными промышленными побочными продуктами (Ni M. et al., 2007), и в нанокристаллических солнечных элементах в качестве фотоактивного материала (Yuan Y. et al., 2010). Промышленное использование фотокаталитического эффекта НЧ TiO_2 также нашло свое применение в других приложениях, особенно в производстве самоочищающихся и противотуманных покрытий, таких как самоочищающиеся плитки, самоочищающиеся окна, самоочищающийся текстиль и противотуманные

автомобильные зеркала (Montazer M, Seifollahzadeh S., 2011). В области наномедицины НЧ TiO_2 рассматриваются как полезные инструменты в современных средствах визуализации и нанотерапии (Yuan Y. et al., 2010). Например, НЧ TiO_2 оцениваются как потенциальные фотосенсибилизаторы для использования в фотодинамической терапии (Szacilowski K. et al., 2005). Кроме того, уникальные физические свойства делают НЧ TiO_2 идеальными для включения их в состав различных средств ухода за кожей. Например, они входят в состав бальзамов для губ и солнцезащитных кремов, где на их долю приходится до 25% (Trouiller B. et al., 2009; Chaudhry Q., 2015; SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety, 2013). Нанопрепараты с НЧ TiO_2 в данный момент изучаются как новые компоненты средств для лечения *acne vulgaris*, рецидивирующих кондилом, атопического дерматита, гиперпигментированных поражений кожи и других не дерматологических заболеваний (Wiesenthal A. et al., 2011). Наночастицы TiO_2 также проявляют антибактериальные свойства при ультрафиолетовом облучении (Yuan Y. et al., 2010; Montazer M. et al., 2011).

Пути воздействия и допустимые нормы. Титан присутствует в тканях человека и животных, но только в следовых количествах. Нет никаких доказательств того, что титан является важным элементом для живого организма. Концентрация соединений Ti в питьевой воде обычно низкая. Поступление титана в организм может составлять 300-400 мкг/день. Частицы TiO_2 получают и используют в различных размерных фракциях, включая мелкие (приблизительно 0,1-2,5 мкм) и наноразмерные (<0,1 мкм, первичные частицы) (Schkroeder H.A. et al., 1963).

Воздействие НЧ TiO_2 на человека может происходить в процессе производства и использования. Наночастицы TiO_2 используются в виде аэрозолей, суспензии или эмульсии. Основными маршрутами воздействия НЧ TiO_2 , которые имеют токсикологическую значимость на рабочем месте, являются ингаляционный и дермальный. Известно, что более 150 наименований продуктов, основанных на нанотехнологичном производстве обречены на долгосрочный контакт с кожей. И наиболее распространенными наноматериалами, обнаруженными в

потребительских продуктах, предназначенных для кожного нанесения, являются НЧ TiO_2 (Robertson T.A. et al., 2010). Нанодисперсный TiO_2 входит в состав зубной пасты, пищевых красителей и пищевых добавок, в связи с чем при использовании этих продуктов неизбежна оральная экспозиция. В недавнем исследовании Веир с соавт. (Weir A. et al., 2012) продемонстрировали, что конфеты, сладости и жевательные резинки содержат самое высокое количество НЧ TiO_2 . В наномедицине внутривенная или подкожная инъекция носителей из наночастиц TiO_2 является уникальным способом доставки НЧ TiO_2 в организм человека (Zhao J., Castranova V., 2011).

В США, среднее суточное потребление НЧ TiO_2 в составе пищи оценивается как 1-2 мг/кг массы тела для детей в возрасте от 10 лет и 0,2–0,7 мг/кг для других возрастных групп. В Великобритании потребление этих НЧ составляет 2-3 мг/кг/день для детей и по 1 мг/кг/день для остальных возрастных группах (Weir A. et al., 2012). Для населения Германии соответствующий показатель составляет 0,5 - 1 мг/кг/сут для взрослых и достигает ~ 2 мг/кг/сут у детей (Bachler G. et al., 2015). Самое высокое потребление НЧ TiO_2 было показано у детей 3-9 лет, для которых в зависимости от пищевых привычек средняя концентрация этих НЧ в составе различных продуктов составило 0,9–8,8 мг/кг веса тела в день с 95 перцентилями 2,4–30,2 мг/кг в день. В эти расчеты не был включен факт случайного проглатывания зубной пасты или бальзамов для губ, что может привести к занижению фактического потребления НЧ TiO_2 . Другое исследование оценки концентрации НЧ TiO_2 в пищевых продуктах, проведенное в Голландии показало, что самая высокая экспозиция (медиана 1,4 мг/кг веса тела в день и 95-й перцентиль 4,9 мг/кг) была обнаружена у детей 2-6 лет (Sprong C. et al., 2016), опять же, без учета факта непреднамеренного проглатывания зубной пасты. На рисунке 1 и в таблице 1 представлены данные о концентрации НЧ TiO_2 в различных продуктах питания и средние суточные дозы потребления их у людей разных возрастных групп.

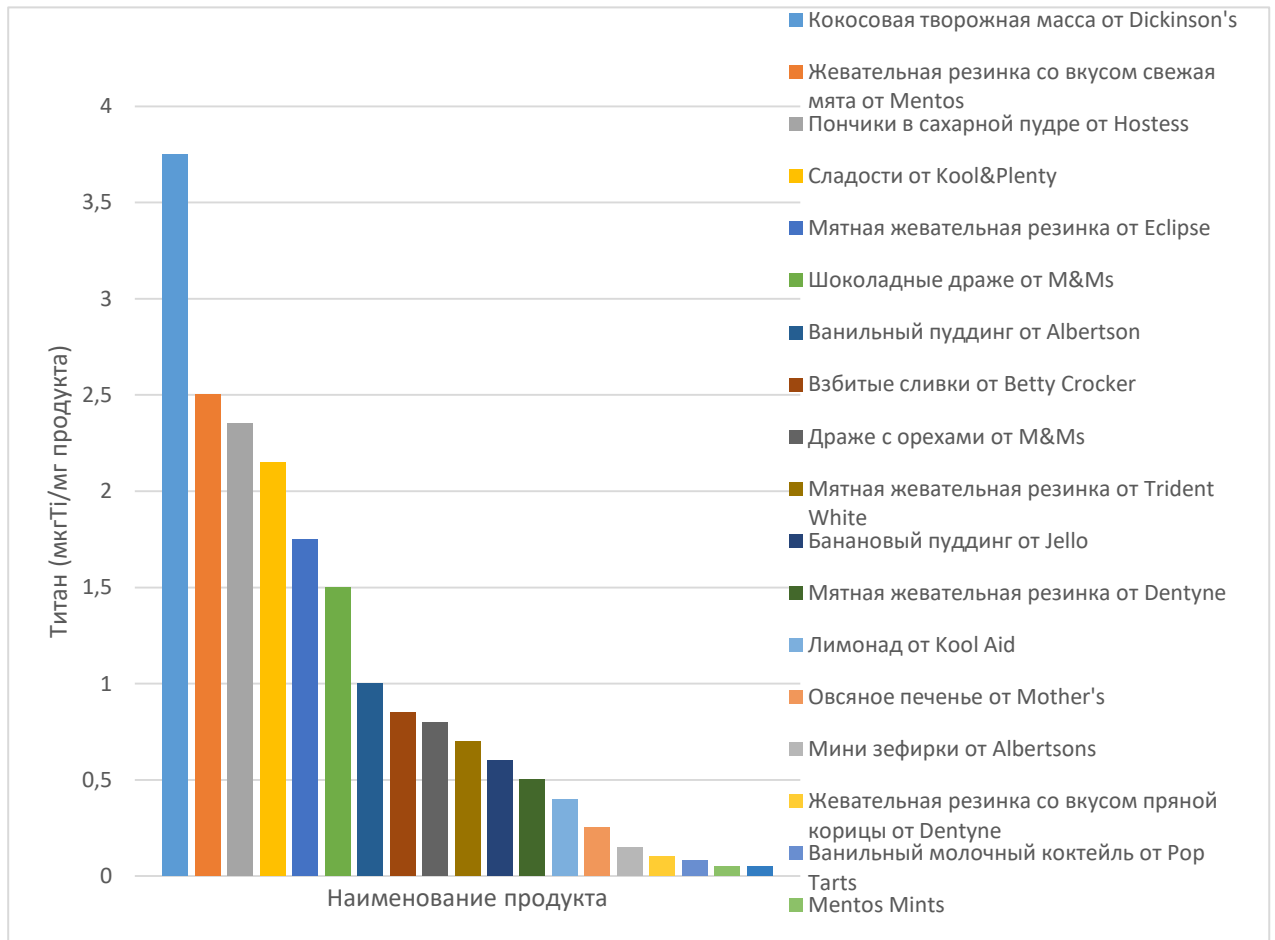


Рисунок 1. Концентрация НЧ TiO_2 в продуктах питания. (<https://scienceandfooducla.wordpress.com/2016/04/12/titanium-dioxide-in-food>)

В исследовании, проведенном Бэкман и соавт. (2000) мужчины – добровольцы принимали частицы анатаза в дозах 23 и 46 мг в желатиновых капсулах (средний размер частиц 160 нм) или в виде порошка (средний размер частиц 380 нм) (Vöckmann J. et al., 2000). Уровень TiO_2 в крови, измеренный сразу после приема с помощью атомно-эмиссионной ИСП-спектроскопии, находился в пределах 0,007 и 0,02 $\mu\text{g/ml}$. Примерно через 8-12 ч после приема анатаза (160 нм) в дозе 23 мг (~ 0,4 мг / кг массы тела) максимальная концентрация TiO_2 в крови у пяти добровольцев составила 0,04–0,05 мкг/мл.

Топ 10 продуктов питания, содержащих TiO₂ (при учете среднего содержания TiO₂ в продукте по данным Национального Нидерландского Пищевого Потребительского Комитета. В скобках указан процентный вклад продукта в потребление (Cathy Rompelberg et al., 2016)

	Дети (2-6 лет)	Подростки, взрослые (7-69 лет)	Пожилые (70+)
1	зубная паста (57%)	жевательная резинка (14%)	сухие сливки (13%)
2	леденцы с сахаром (4%)	сухие сливки (11%)	порошкообразное топленое молоко для кофе (8%)
3	шоколадные кондитерские изделия в сахарной обсыпке (3%)	майонез (7%)	жевательная резинка (4%)
4	жевательная резинка с сахаром (2%)	соус на основе чеснока и майонеза (5%)	капучино с кофеином (3%)
5	шоколад в сахарной глазури (2%)	Капучино (4%)	быстрорастворимый кофе (3%)
6	печенье с ароматизированным молочным наполнением (2%)	порошкообразное топленое молоко для кофе (3%)	капучино (3%)
7	печенье с молочным наполнением (2%)	замороженный «глазированный торт» (3%)	соус на основе чеснока и майонеза (2%)
8	зефир (2%)	быстрорастворимый кофе (3%)	кондитерские изделия со сливками (2%)
9	печенье с кофейной глазурью (2%)	капучино с кофеином (3%)	соус на основе майонеза (2%)
10	жевательная резинка без сахара (2%)	кофе с молоком и сахаром (из автомата) (2%)	майонез (2%)

Наибольшая концентрация TiO_2 - 109,9 мкг/л была выявлена в крови одного добровольца через 8 ч после приема 46 мг (~ 0,75 мг / кг массы тела) анатаза (160 нм). При введении анатаза (380 нм) в тех же концентрациях уровень анатаза в крови был гораздо ниже. В другом исследовании девять добровольцев получали TiO_2 в разных формах (анатаза, 15 нм; рутил, 100 нм; микронная форма, 5 мг/кг, однократно, перорально) (Jones K. et al., 2015). Атомно-эмиссионная ИСП-спектроскопия показала, что фоновая концентрация TiO_2 в крови на 3-й день эксперимента составила 0,014 мкг/мл. Другие семь добровольцев принимали анатаз (100 мг/кг массы тела, 260 нм) в виде желатиновых капсул (Pele L.C. et al., 2015). Наночастицы TiO_2 были обнаружены в крови, причем наивысшая концентрация составила ~ 10 мкг/мл и обнаруживалась через 6 ч после приема исследуемого препарата. Таким образом, эти данные свидетельствуют не только о том, что после перорального приема НЧ поступают в кровь, но и демонстрируют, что по крайней мере часть этих НЧ появляется в крови в виде цельных частиц.

Т а б л и ц а 2

Подсчет приема TiO_2 в различных возрастных группах, произведенный в сопоставимых исследованиях (Cathy Rompelberg et al., 2016)

Прием TiO_2 (мг/кг массы тела в день)	Описание	Источник
Дети		
0.59	2-6 лет, Нидерланды, P50 (значение точки), средняя концентрация TiO_2	Winkler H.C. et al., 2018
1.4	2-6 лет, Нидерланды, P50, уровень 4	Sprong et al., 2016
12.0-13.0	<10 лет, Нидерланды, P50, средние измеренные уровни TiO_2 , если предположить, что 5-20% продукта состоит из	Huybrechts et al., 2010
9.31 (3.89 – 13.8)	<10 лет, средний уровень ЕС, P50, средние измеренные уровни TiO_2 при допущении, что 5- 20% продукта состоит из покрытия (диапазон, найденный более чем в девяти странах)	Huybrechts et al., 2010

1-2	<11 лет, США	Weir et al., 2012
2-3	<11 лет, Великобритания	Weir et al., 2012
Подростки, взрослые		
0.08	7-69 лет, Нидерланды, P50 (значение точки), средняя концентрация TiO ₂	Winkler H.C. et al., 2018
0.7	7-69 лет, Нидерланды, P50, уровень 4	Sprong et al., 2015
0.2-0.7	≥11 лет, США	Weir et al., 2012
1	≥11 лет, Великобритания	Weir et al., 2012
0.8-3.3	Более 6 возрастных групп, Германия, P50	Bachler et al., 2015
Пожилые люди		
0.03	70+, Нидерланды, P50 (значение точки), средняя концентрация TiO ₂	Winkler H.C. et al., 2018
0.5	70+, Нидерланды, P50, уровень 4	Weir et al., 2012

Управление по санитарному надзору и качеством пищевых продуктов и медикаментов в США (FDA) одобрила TiO₂ в качестве пищевой добавки с условием, что масса данного компонента не должна превышать 1% от массы готового продукта. Однако, до сих пор не разработаны ПДК НЧ TiO₂ в продуктах питания, несмотря на появление сведений о наличии различий в физико-химических свойствах микро и наночастиц TiO₂, а, следовательно, и о разной степени их токсичности.

Американская конференция правительственных промышленных гигиенистов (ACGIH) установила ПДК для TiO₂ FPs - 10 мг/м³ для нормального 8-часового рабочего дня и 40-часовой рабочей неделе (ACGIH. Documentation of the threshold limit values for chemical substances. 7. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 2001. Titanium dioxide). Допустимый предел воздействия - для FP TiO₂ составляет 15 мг/м³ (Kitchin K.T. et al., 2010). В ноябре 2005 года Национальный институт безопасности и гигиены труда США (NIOSH) предложил рекомендованный предел воздействия для НЧ TiO₂ - 0,3 мг/м³, что в 10 раз ниже, чем для FP TiO₂ (NIOSH. Current Intelligence Bulletin 63. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health; 2011. Occupational Exposure to

Titanium Dioxide). В Японии, ПДК НЧ TiO_2 оценивается в $1,2 \text{ мг/м}^3$ при 8 часовом рабочем дне и 40 часовой рабочей неделе (Morimoto Y. et al, 2010).

Таким образом, основным путем профессионального воздействия НЧ TiO_2 является ингаляция. Непреднамеренная ингаляция также возможна при применении противомикробного спрея, содержащего НЧ TiO_2 . Оральное воздействие может происходить через пищевые продукты, содержащие добавки НЧ TiO_2 . Кожный контакт может возникать при применении косметики и солнцезащитных средств. Внутривенная инъекция НЧ TiO_2 может возникать при использовании их в медицине в составе лекарственных препаратов. На сегодняшний день сведений о воздействии НЧ TiO_2 на потребителей или на окружающую среду явно недостаточно, в связи с чем необходимо проводить исследования результатов воздействия продуктов, содержащих НЧ TiO_2 на протяжении всего жизненного цикла.

Токсикокенетика. Токсикокинетика - это описание скорости, с которой вещество (НЧ TiO_2) поступает в организм через различные пути воздействия, и его судьба после попадания в организм. Уровень или концентрация НЧ TiO_2 в клетках и тканях организма зависит от скорости (или кинетики) поглощения, распределения, метаболизма и экскреции НЧ TiO_2 . Основные пути проникновения НЧ - ингаляция, пероральный, контакт с кожей и внутрибрюшинная или внутривенная инъекция.

Желудочно-кишечная абсорбция. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) может быть важным путем поступления НЧ TiO_2 , поскольку носители лекарственных средств, пищевые продукты, вода и напитки могут содержать НЧ TiO_2 (Lomer M.C. et al., 2002; Hagens W.I. et al., 2007). В области наномедицины поглощение НЧ через желудочно-кишечный тракт было предметом недавних исследований по разработке эффективных носителей, которые усиливают пероральный прием лекарств и вакцин (Hillyer J.F., Albrecht R.M., 2001). Показано, что микроразмерная форма TiO_2 (рутил, 500 нм, 12,5 мг/кг) систематически транслоцируются в другие ткани из ЖКТ крысы (Jania P. et al., 1994). Было высказано предположение, что поглощение частиц TiO_2 в ЖКТ происходит через

пейеровы бляшки ввиду обнаружения высокой концентрации TiO_2 в лимфоидных тканях. Показано, что НЧ TiO_2 поглощается из ЖКТ (25, 80 и 155 нм, 5 г/ г ВВ, оральная доза для приема внутрь, у мышей) (Wang J. et al., 2007). НЧ TiO_2 могут абсорбироваться через ЖКТ через окружающие его лимфоидные ткани. Однако, поскольку доза, используемая в этом исследовании, была высокой, вопрос о степени абсорбции при соответствующих воздействиях на человека находится под вопросом.

Кожная абсорбция. Кожная абсорбция НЧ TiO_2 представляет интерес, поскольку многие потребительские продукты, такие как косметические и солнцезащитные средства, могут содержать НЧ TiO_2 . В некоторых работах (Pflucker F. et al., 2001; Schulz J. et al., 2002; Gamer A.O. et al., 2006; Newman M.D. et al., 2009; Sadrieh N. et al., 2010) изучалось проникновение НЧ TiO_2 в кожные покровы, результаты которых показали, что НЧ TiO_2 не проникают в интактную кожу человека. Тан и соавт. (Tan M.H. et al., 1996) исследовали эпидермальное проникновение НЧ TiO_2 , входящих в состав солнцезащитного крема, в эпидермис с использованием техники *tape stripping*. При нанесении крема, содержащего 8% НЧ TiO_2 (10-50 нм) на кожу добровольцев 2 раза в день в течение 2-6 недель (возрастной диапазон 59-82 лет) было показано, что уровни НЧ TiO_2 в эпидермисе и дерме были выше, чем уровни НЧ TiO_2 у контрольной группы. Тем не менее, объем выборки не достаточен для утверждения обнаруженного факта. Беннат и Мюллер-Гойманн (Bennat C., Muller-Goymann C.C., 2000) показали, что НЧ TiO_2 проникают в волосистую часть кожи головы при нанесении эмульсии в виде «масло-в-воде». Они оценивали проникновение в кожу НЧ TiO_2 (20 нм), нанесенных на кожу человека либо в виде водной суспензии, либо в виде эмульсии типа «масло-в-воде» с использованием метода *tape stripping*. Результаты показали, что НЧ TiO_2 могут проникать внутрь поверхности через волосяные фолликулы или поры. Однако судьба проникнувших НЧ не известна. Было также обнаружено, что НЧ TiO_2 не оказывает влияния на канцерогенез кожи из-за отсутствия способности проникать через эпидермис (Xu J. et al., 2011; Sagawa Y. et al., 2012).

Ингаляция наночастиц. Вдыхание является одним из основных путей для попадания НЧ TiO_2 в организм человека, особенно в условиях производства. В многочисленных исследованиях использовали ингаляцию в качестве пути воздействия для определения токсикокинетики и цито- или генотоксичности НЧ TiO_2 . Предельно допустимая концентрация для FPs в воздухе составляет 50 мкг/м^3 для среднестатистического (нормального) человека (70 кг) (Simko M., Mattsson M.O., 2010).

Данных о воздействии НЧ TiO_2 путем ингаляционного воздействия на человека в настоящее время нет. Однако имеются количественные данные, полученные в исследованиях на грызунах (Kuempel E.D. et al., 2006). Мухлфелд и соавт. (Muhlfeld C. et al., 2007) предположили, что небольшая доля НЧ TiO_2 (20 нм, 1 и 24 часа) транспортируются из просвета дыхательных путей взрослых самцов крыс WKY/NCrl BR в интерстициальную ткань и затем высвобождаются в системный кровоток.

Сагер и др. (Sager T.M. et al., 2008) показали, что значительная часть осажденных НЧ TiO_2 (21 нм) мигрировала в интерстициальное пространство на 42 день после интратрахеальной инстилляцией у крыс. НЧ TiO_2 мигрировали в альвеолярный интерстиций в значительно большей степени, чем FP TiO_2 после либо ингаляционного воздействия (Oberdorster G. et al., 1994), либо интратрахеальной инстилляцией (Sager T.M. et al., 2008). Другое исследование показало, что через 28 дней после инстилляцией небольшая часть НЧ TiO_2 из легких попала в кровоток и достигла внелегочных тканей, таких как печень и почки (Li Y. et al., 2010). Исследования Ван и др. (Wang J. et al., 2008) показали, что интраназально введенные НЧ TiO_2 мышам (80 нм рутила, 155 нм анатазы, 500 мкг/мл, 2, 10, 20 и 30 дней) могут через обонятельный нерв транслоцироваться в головной мозг.

Несмотря на то, что ингаляция, интратрахеальная инстилляцией и интраназальные исследования в отношении легочной абсорбции невелики, они предполагают, что НЧ TiO_2 могут транслоцироваться из легких через в кровоток в органы и ткани организма и из носовой полости в сенсорные нервы в нервную

систему. Однако, существующие на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что скорость миграции НЧ в системный кровоток низкая.

1.2 Токсические свойства наночастиц

Очень высокая удельная поверхность, в расчете на единицу массы, а, следовательно, высокая реакционная способность и небольшие размеры НЧ могут придавать им нежелательные, в том числе и токсические свойства за счет индукции образования активных форм кислорода, а также возможности беспрепятственного прохождения через биологические мембраны. Таким образом, несмотря на ряд преимуществ для использования их в биомедицинских приложениях, их уникальные свойства могут стать причиной их токсического влияния на биологические структуры (Аляхнович Н.С., Новиков Д.К., 2016; Powers K. W. et al., 2007). Исследования *in vitro* показали, что наночастицы размером менее 10 нм потенциально опасны для легких из-за большой площади поверхности и возможности легкого проникновения в ядро клетки (Qiao H. et al., 2015). Гораздо меньшее внимание уделяется форме НЧ, возможно, в связи с тем, что большинство НЧ являются сферическими. В целом эндоцитоз клетками сферических НЧ более успешен, чем палочковидных, и относительно менее токсичен. Например, золотые наностержни обладают большим потенциалом при гипертермии рака, чем обычные сферические золотые НЧ, так как они могут вызывать гибель клеток рака молочной железы, в том числе и из-за своей формы (Qiu Y. et al., 2010).

Токсичность НЧ также зависит от присутствия химических компонентов на их поверхности. Некоторые оксиды металлов, такие как ZnO, оксид марганца (Mn_3O_4) или оксид железа (Fe_3O_4) сами по себе достаточно токсичны (Frick R. et al., 2011; De Matteis V., Rinaldi R. 2018). Наноматериалы, изготовленные из указанных оксидов металлов, могут оказать цитотоксическое влияние на органы и ткани организма, которые могут быть устранены путем модификации их поверхности. Однако, побочные эффекты часто очень полезны в терапии раковых клеток (De Matteis V., Rinaldi R., 2018). Другим химическим компонентом, хорошо

исследованным в контексте токсичности наночастиц, является серебро (Ag), так как этот металл широко используется из-за доступности в окружающей среде. Цитотоксические эффекты НЧ Ag заключаются в индукции АФК и окислительного стресса, повреждении ДНК, апоптоза (Ahamed M. et al., 2010).

Наиболее распространенным способом введения НЧ является внутривенное введение. Как только НЧ достигают сосудистой системы, они распределяются по различным органам и тканям. Физико-химические свойства НЧ определяют закономерности их распределения. Тем не менее, представляется очевидным, что размер и поверхность являются ключевыми факторами для более эффективного и длительного их биораспределения. В этом смысле более мелкие наночастицы (1-20 нм) проникают в органы быстрее, чем более крупные, а модификация поверхности гидрофильными полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ) увеличивает время их кровообращения. Что касается биологического клиренса, то почечная экскреция представляет собой основной путь элиминации экзогенного материала, такого как НЧ (Almeida J. P. M. et al., 2011). Тем не менее, в то время как НЧ находятся в кровотоке, они могут быть очищены другими путями, такими как дезинтеграция через абсорбцию белка или опсонизирующее удаление мононуклеарной фагоцитарной системой (МПС) (Gustafson H. N. et al., 2015). Металлические НЧ имеют тенденцию накапливаться в селезенке, печени и лимфе и способны сохраняться месяцами из-за их неспецифического поглощения МПС (Lin Z. et al., 2015).

1.2.1 Наночастицы и иммунная система

Искусственно созданные наноматериалы все чаще используются в производстве многих потребительских товаров и для различных медицинских целей, что приводит к возрастанию количества людей, подвергающихся их воздействию. Для оценки безопасности использования различных наноматериалов необходимо изучить их неблагоприятное влияние на иммунную систему, функция которой заключается в устранении патогенов и раковых клеток. Даже

незначительные изменения, возникшие в иммунной системе под воздействием НЧ, могут привести к нарушению защитной функции или неадекватному иммунному ответу, приводящему к аллергии, аутоиммунным реакциям и повреждению собственных тканей организма. В связи с этим требуется адекватная оценка взаимодействия всех новых искусственно созданных наноматериалов и наночастиц с иммунной системой до начала использования в промышленности, биологии и медицине. Результаты взаимодействия наночастиц и иммунной системы безусловно должны быть полезны, поскольку они широко используются в том числе и в медицинских целях, например, для вакцинации или терапии при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. В случае, когда НЧ признаются как собственные клетки или при недостаточном иммунном распознавании, их применение представляет большой интерес с точки зрения возможности их использования для доставки лекарственных средств.

При разработке и создании наноматериалов необходимо учитывать три важные реакции иммунной системы в ответ на воздействие НЧ. Во-первых, иммунно-опосредованное отторжение, которое может инициировать защитную иммунную реакцию, приводящую к устранению НЧ. Во-вторых, это иммуотоксичность - патологические изменения тканей иммунокомпетентных органов в результате воздействия наноматериалов и как следствие этого снижение эффективности иммунного ответа. Еще одна возможная реакция - это иммуносовместимость, когда НЧ не вызывают нарушение функции иммунной системы и не влияют на иммунный ответ (Boraschi D. et al., 2012)

В настоящее время хорошо известно, что такие свойства, как размер НЧ, поверхностный заряд, гидрофобность/гидрофильность и стерические эффекты покрытия частиц, могут определять совместимость НЧ с иммунной системой (Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E., 2007; Dobrovolskaia M.A. et al, 2008; Aggarwal P. et al, 2009). Например, НЧ могут быть сконструированы путем их присоединения к поли (этиленгликолю) (ПЭГ) или другим типам полимеров для обеспечения гидрофильной среды, тем самым защищая их от иммунного распознавания (Moghimi S.M., 2002). Однако, имеются данные, указывающие на образование

ПЭГ-специфических антител после введения покрытых ПЭГ липосом (Ishida T. et al, 2007; Wang X. et al., 2007). Следовательно, эти антитела могут приводить к ускоренному выведению ПЭГ-липосом из крови и способствовать изменению фармакокинетического профиля последующих вводимых доз ПЭГ-липосом (Ishida T. et al, 2006; 2007). Поэтому следует отметить, что образование специфических антител к НЧ может влиять на эффективность и безопасность терапии на их основе. Наночастицы также могут быть сконструированы таким образом, чтобы вызывать иммунный ответ посредством прямой иммуностимуляции антигенпредставляющих клеток или доставки антигена в конкретные клеточные структуры (Kalkanidis M. et al., 2006).

Поскольку НЧ часто сначала захватываются фагоцитирующими клетками иммунной системы (например, макрофагами), могут возникать нежелательные последствия взаимодействия между наночастицами и иммунной системой, такие как иммуностимуляция или иммуносупрессия, которые могут способствовать появлению воспалительных реакций или аутоиммунных нарушений или увеличивать восприимчивость организма к инфекциям и раку. Как уже упоминалось выше, основной функцией иммунной системы является защита организма хозяина от посторонних веществ; однако непреднамеренное распознавание иммунными клетками наночастиц как чужеродных может привести к многоуровневому иммунному ответу против наночастиц и в конечном итоге вызвать интоксикацию организма и/или отсутствие терапевтической эффективности. Например, под воздействием углеродных нанотрубок (УНТ) у животных наблюдалось образование гранул в легких, коже и плевре (Witzmann F.A., Monteiro-Riviere N.A., 2006; Poland C.A. et al., 2008).

Иммуносупрессия может быть либо непреднамеренной, либо искусственно вызванной. С одной стороны, иммуносупрессия может снизить защиту организма от инфекции и раковых клеток, а с другой стороны, повысить терапевтические эффекты лечения аллергических и аутоиммунных заболеваний и предотвратить отторжение трансплантата. В одном из немногих исследований по иммуносупрессии продемонстрировано, что ингаляция УНТ подавляет функцию

В-клеток, а TGF- β , продуцируемый альвеолярными макрофагами, является ключевым звеном механизма реализации иммуносупрессии (Mitchell L.A. et al., 2009). Результаты других работ показали, что НЧ могут использоваться для доставки иммунодепрессантов (Stinchcombe T.E. et al., 2007). Например, у мышей с артритом при внутривенном введении НЧ поли (D, L-лактид-ко-гликолид) (PLGA) с целью доставки глюкокортикоидов в воспаленные суставы была достигнута полная ремиссия воспалительного ответа, при этом эффективность такой терапии была обусловлена целенаправленным и контролируемым высвобождением стероидов из НЧ PLGA (Higaki M., 2005). Другим примером является химиотерапевтический препарат, одобренный управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, Абраксан, коллоидная суспензия, в которой НЧ связаны с сывороточным альбумином человека. У пациентов с раком молочной железы композиция НЧ паклитаксела приводила к снижению заболеваемости нейтропенией 4-й степени (форма миелосупрессии, которая приводит к уменьшению числа нейтрофилов), в отличие от препарата первого поколения паклитаксела, Таксола, содержащего в качестве вспомогательного вещества Кремофор EL (Stinchcombe T.E. et al., 2007). Еще одним примером служат липосомы, наполненные клодронатом, которые использовались для подавления макрофагов экспериментальных свиней и, таким образом, для защиты животных от травм легких, вызванных эндотоксином (Gasa J.G. et al., 2003).

Иммуносупрессия часто бывает вызвана токсическим действием веществ на Т-клетки. Например, показано, что некоторые иммунодепрессанты (такие как тетрахлордибензо-*p*-диоксин, кадмий, кортикостероиды и радиация) действуют на Т-клетки, вызывая их повреждение и нарушение функций (Wiedmeier S.E. et al., 1988; Lafuente A. et al., 2003). В то время как супрессивное действие кадмия на тимус хорошо известно (Lafuente A. et al., 2003), отсутствуют данные о влиянии НЧ кадмия (например, квантовых точек) на тимус. Очевидно, что в эта область требует проведения дополнительных исследований.

Индукция иммунной толерантности наночастицами может рассматриваться как форма искусственно вызванной иммуносупрессии. Например, было показано, что водорастворимое производное фуллерена (полигидрокси C₆₀) ингибирует реакции гиперчувствительности I типа к аллергенам как *in vitro* в первичных тучных клетках человека и базофилах, так и *in vivo* при анафилаксии у мышей (Ryan J.J. et al., 2007). Аналогичным образом, наночастицы PLGA, хитозана, поли (молочная кислота), поли (метилвиниловый эфир-ко-малеиновый ангидрид), связанные с аллергенами, проявляли себя как эффективные супрессоры аллергии I и II типа к природным и пищевым аллергенам у подопытных животных и *in vitro* (Roy K. et al., 1999; Schöll I. et al., 2004; Balenga N.A. et al., 2006; Gómez S. et al., 2007; Gómez S. et al., 2008). Результаты недавних исследований указывают на то, что синтетические пептидные дендримеры могут блокировать аллергический энцефаломиелит в экспериментальных условиях (Wegmann K.W. et al., 2008).

В некоторых исследованиях была предпринята попытка лечения аутоиммунных заболеваний с использованием НЧ (Basarkar A., Singh J., 2009). Например, коллаген типа II, связанный с НЧ PLGA, подавлял воспаление у подопытных мышей с ревматоидным артритом. Было показано, что терапия аутоиммунного увеоретинита с помощью НЧ бетаметазон-поли (молочной кислоты) в эксперименте на собаках приводила к улучшению течения этого заболевания (Sakai T. et al., 2006; Choi E.W. et al., 2008).

В последние годы активно исследуется активация воспаления, связанная с воздействием НЧ. Так, НЧ TiO₂ и SiO₂ активируют под-подобные рецепторы воспаления в миелоидных клетках и приводят к секреции ИЛ-1 β в первичных кератиноцитах человека, при этом активация воспаления не сопровождалась фагоцитозом НЧ TiO₂ (Yazdi et al., 2010). Продемонстрировано (Yang M. et al., 2016), что НЧ серебра индуцируют воспалительный процесс, активацию каспазы-1 и последующее высвобождение биологически активного ИЛ-1 из моноцитов крови человека.

Реакция врожденного иммунитета на патогены заключается в том числе и в производстве АФК, однако их чрезмерное образование может привести к

неблагоприятным воспалительным реакциям и токсическим эффектам. Образование АФК считают основным механизмом, посредством которого НЧ могут влиять на иммунные функции. Увеличение образования АФК под действием наноматериалов способствует активации врожденного иммунного ответа за счет индукции воспаления. Показано, что воздействие НЧ TiO_2 провоцирует 10-20-кратное увеличение уровня АФК в мононуклеарных клетках периферической крови и эндотелиальных клетках пупочной вены человека после 48-часовой экспозиции в условиях *in vitro* (Schanen B.C. et al., 2009). Авторы обнаружили, большинство клеток, продуцирующих АФК, были CD14^+ моноцитами, указывая на главную роль фагоцитов в воспалении (Schanen B.C. et al., 2009). Кроме того, авторы наблюдали увеличение количества ИЛ- 1β , на основании чего можно предположить, что активация воспаления в ответ на образование АФК была вызвана предшествующим воздействием НЧ TiO_2 . Эти данные подтверждают связь между активацией воспаления и воздействием НЧ, которая в конечном счете может привести к воспалительным заболеваниям, включая аутоиммунные.

Несмотря на многообещающие перспективы использования НЧ для разработки вакцин и аналогичных методов лечения опухолей, существует опасение, что те же свойства наноматериалов, которые делают их уникальными, могут приводить к снижению эффективности адаптивного иммунного ответа. Например, было показано, что НЧ усугубляют болезненные состояния, связанные с адаптивным иммунитетом, например, такие как аллергическая астма. Хуссаин М. с соавт. (2013) показали, что наночастицы TiO_2 и Au повышают чувствительность дыхательных путей в модели астмы у мышей, спровоцированной толуолдиизоцианатом (Hussain M. et al., 2013). К тому же, обнаружено, что МУНТ усиливали фиброз легких у мышей через 14 дней совместного введения с овалбумином, а также приводили к увеличению ИЛ-5 (мРНК), тромбоцитарного фактора роста (PDGF-AA), числа нейтрофилов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа через один день после ингаляции (Ryman-Rasmussen J.P. et al., 2009). Эти исследования показывают, что НЧ могут усиливать адаптивные иммунные

реакции, которые создают условия, способствующие усилению манифестации Th2-связанных фенотипов заболеваний, таких как аллергическая астма.

Было показано, что помимо активации адаптивного иммунного ответа НЧ могут оказывать и угнетающее влияние на эту систему. Митчелл Л.А. и др. (2009) продемонстрировали, что у мышей, подвергшихся воздействию МУНТ (1 мг/м³) в ингаляционных камерах, обнаружено угнетение иммунного ответа со снижением синтеза антител Т-клетками (Mitchell L.A. et al., 2009). При исследовании влияния ежедневного (30 дней) воздействия промышленного наноматериала на основе МУНТ (30 мг/кг) на пищеварительную систему мышей (Масютин А.Г. и др., 2016) методом световой и электронной микроскопии исследовали образцы тканей тонкого кишечника и печени. В ходе исследования было показано, что МУНТ вызывают множественные очаги некротических изменений в тонком кишечнике и смешанную паренхиматозную дистрофию в печени. Это дает основание полагать, что, попадая в пищеварительный тракт, они приводят к повреждению ворсинок кишечника, вероятно, путем механического воздействия на энтероциты. Высказано предположение, что МУНТ могут вызывать дистрофию, действуя опосредованно, через запуск воспалительных реакций и продукцию АФК (Масютин А.Г. и др., 2016).

Иммунная система включает в себя разнообразные структуры, в том числе ассоциированные с пищеварительной, дыхательной и некоторыми другими системами и для того, чтобы лучше понять иммунотоксическое влияние наноматериалов, необходимо знать их взаимодействие с клетками иммунной системы. Различные типы иммунных клеток могут проявлять различную чувствительность к одному и тому же типу НЧ. К примеру, широко используемые в косметических средствах и солнцезащитных кремах НЧ Au являются токсичными для моноцитов, но не влияют на жизнеспособность лимфоцитов (Hanley C. et al., 2009). NK-клетки являются более чувствительными к НЧ Au, чем Т и В-лимфоциты, но менее чувствительны, чем моноциты (Hanley C. et al., 2009). Эти результаты были частично подтверждены в другом исследовании, результаты которого показали, что НЧ ZnO обладают низкой токсичностью по отношению к

мононуклеарным клеткам периферической крови, но были крайне цитотоксичны для дендритных клеток (Andersson-Willman B. et al., 2012). Механизм токсичности объясняется растворимостью НЧ ZnO, ведущей к повышению концентрации ионов Zn внутри клеток и последующей активацией митохондриального пути апоптоза (Као Y.Y., et al., 2012). Было обнаружено, что НЧ TiO₂ оказывал цитотоксический эффект *in vitro* и иммуносупрессию в *in vivo* исследованиях (Moon E.Y. et al., 2011); Andersson-Willman B. et al., 2012). Внутривенное введение НЧ TiO₂ мышам подавляют функции Т- и В-, НК-клеток, снижает активность макрофагов, при этом при подкожной имплантации клеток меланомы B16F10, рост опухоли значительно увеличивался (Moon E.Y. et al., 2011); Andersson-Willman B. et al., 2012).

Известно, что после воздействия НЧ происходит активация макрофагов, включающая в себя продукцию АФК, активацию воспаления, а также секрецию провоспалительных цитокинов. Исследования показали, что эффективность фагоцитоза НЧ макрофагами при интраназальном введении зависит от их размера (Manolova V. et al., 2008; Kunzmann A. et al., 2011) и формы, однако механизм этого процесса до конца не изучен. Так, показано, что фагоцитоз НЧ в форме волокна (углеродные нанотрубки) приводит к образованию супероксидных анионов и провоспалительных медиаторов, таких как TNF- α (Brown D.M. et al., 2007). При изучении взаимодействия биологически активных НЧ Ag с альвеолярными макрофагами обнаружено, что токсичность этих НЧ также зависит от размера: экспозиция НЧ Ag (15 нм) в течение 24 часов приводит к дозозависимой цитотоксичности и увеличению продукции АФК (Carlson C. et al., 2008). Наночастицы Au, поглощенные макрофагами RAW264.7, ингибируют продукцию провоспалительных цитокинов и ослабляют передачу сигналов TLR9 в зависимости от размера НЧ (Tsai C. J. et al., 2012).

Одним из основных путей воздействия на организм факторов окружающей среды и профессиональной деятельности является ингаляция, поэтому знания о взаимодействии НЧ с легочными макрофагами, включая альвеолярные и тканевые резидентные макрофаги, имеют важное значение. Альвеолярные макрофаги – первые клетки иммунной системы, сталкивающиеся в легких с вдыхаемыми

патогенами и частицами. Альвеолярные макрофаги способны быстро очищать легкие хозяина от большого количества инородных частиц и играют важную роль в регуляции иммунных реакций в легких (Braciale T. J. et al., 2012). Важность альвеолярных макрофагов в поглощении и очищении от вдыхаемых НЧ продемонстрирована в исследовании, проведенном на крысах, в котором показано, что более 90% ингаляционных НЧ Au, были поглощены альвеолярными макрофагами в течение первых 24 часов (Takenaka S. et al., 2012). Аналогичные результаты эффективного фагоцитоза различных НЧ макрофагами были получены и в исследовании *in vitro* (Ruge C. A. et al., 2011; Braciale T.J. et al., 2012; Kapralov A.A. et al., 2012). Показано, что неселективное поглощение макрофагами происходило в течение нескольких минут (Haase A. et al., 2011), что позволило предположить их ведущую роль в опосредовании легочных эффектов при ингаляционном воздействии НЧ.

В других исследованиях показано, что дендритные клетки (ДК), способные поглощать экзогенные антигены посредством фагоцитоза и представлять их на главном комплексе гистосовместимости (МНС) класса I или II для распознавания CD8 + или CD4 + Т-клетками соответственно, обладают высокой фагоцитарной способностью по отношению к НЧ Au (Christian V. t al., 2010). Фагоцитоз антигена или НЧ с помощью ДК является актинозависимым процессом, опосредованным рецепторами. В условиях *in vitro* было показано, что ДК-производные моноцитов легко захватывают квантовые точки (КТ) посредством рецептор-опосредованного клатрин-зависимого эндоцитоза (Blander J.M., Medzhitov R., 2006). Активация ДК на фоне воздействия НЧ ZnO, TiO₂ и SiO₂ вызывает морфологическую трансформацию с развитием длинных дендритов и повышенную экспрессию МНС-II, CD80 и CD86, которые облегчают представление антигена Т-лимфоцитам (Heng B. et al., 2011; Winter M. et al., 2011). Активированные ДК способны активировать наивные Т-клетки, за счет выделения ИЛ-12 в больших количествах и взаимодействия этих поверхностных молекул с лигандами CD40 и CD28 на поверхности Т-клеток. В совокупности эти наблюдения показывают, что

некоторые НЧ могут способствовать созреванию и активации ДК, что приводит к активации лимфоцитов.

Рядом исследователей на различных моделях обнаружено, что НЧ провоцируют развитие пневмонии, при этом преобладающим типом клеток в легких и в бронхоальвеолярном лаваже после ингаляции или интратрахеальном введении НЧ являются нейтрофилы (Ma-Nock L. 2009). Нейтрофилы периферической крови человека – наиболее чувствительные к различным воздействиям и мобильные элементы системы неспецифической резистентности организма. В ходе миграции к месту инфекции и воспаления нейтрофилы непрерывно подвергаются адгезии к эндотелию сосудов, расширению и сжатию, деформации и восстановлению. Показано, что нейтрофилы являются надежными маркерами воспаления в результате воздействия НЧ TiO_2 и МУНТ (Bonner J.C. et al., 2013). При интратрахеальном введении НЧ оксида железа (Van M. et al, 2012) в бронхоальвеолярной жидкости увеличивается число нейтрофилов, причем их содержание было значительно выше, чем при ингаляции этого соединения в микроразмерном состоянии. Подобный, но дозозависимый эффект наблюдался и при пероральном введении НЧ TiO_2 (Gustafsson Å. et al., 2011), интратрахеальном введении НЧ ZnO (Sayes C.M. et al., 2007). Также было показано, что хроническое введение искусственно созданных материалов отрицательно влияет на содержание нейтрофилов в периферической крови. Например, количество нейтрофилов в крови уменьшалось при внутрижелудочном введении НЧ TiO_2 в течение 90 дней (Sang X. et al., 2012). В качестве вероятного механизма было высказано предположение о нарушении кроветворения в костном мозге или их миграции из циркулирующей крови в желудочно-кишечный тракт.

В исследовании Ариановой Е.А. и соавт. (2012) изучено возможное влияние НЧ TiO_2 (рутила) на показатели иммунитета крыс. Эксперимент проведен на 40 крысах - самцах Вистар, разделенных на 4 группы. Ежедневно крысы 1-й и 2-й групп получали внутрижелудочно через зонд деионизованную воду, 3-й и 4-й групп - водную дисперсию НЧ в дозе 100 мг на 1 кг массы тела. На 1-й, 3-й и 5-й дни эксперимента крыс 2-й и 4-й групп внутрибрюшинно иммунизировали 100 мкг

овальбумином куриного яйца (ОВА). На 21-й день вводили дополнительно еще 10 мкг ОВА. В ходе исследования оценивали концентрацию специфических IgG-антител, цитокинов -интерлейкинов (ИЛ) -6 и -10, фактора некроза опухоли α (ФНО- α), экспрессию антигенов CD45RA, CD3, CD4, CD8, CD161a, фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов, апоптоз лимфоцитов, гематологические показатели крови. В результате проведенных исследований было установлено, что внутрижелудочное введение животным НЧ TiO₂ приводит к достоверному усилению у них гуморального иммунного ответа на модельный пищевой антиген ($p < 0,05$). При анализе лейкоцитарной формулы выявлено достоверное снижение уровня незрелых клеток при воздействии НЧ на фоне иммунизации. Установлено, что прием НЧ приводит к достоверному снижению относительного числа В-лимфоцитов у иммунизированных животных, а также к достоверному увеличению фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов периферической крови. Индекс стимуляции фагоцитоза достоверно повышается при приеме НЧ по сравнению с контролем (неиммунизированные животные). Влияние НЧ рутила на уровень продукции цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α), гематологические показатели крови, апоптоз не выявлено как у интактных, так и у иммунизированных животных. Таким образом, показано, что введение НЧ рутила в желудок влияет на некоторые показатели специфического и неспецифического иммунитета как иммунизированных, так и интактных крыс (Арианова Е.А. и др., 2012).

Поскольку подавление иммунной системы может снизить сопротивляемость организма к инфекциям и повысить риск развития онкологических заболеваний, выявление нежелательных иммуносупрессивных свойств инженерных наноматериалов является важной задачей в целях установления уровня их опасности. Общеизвестно, что физико-химические свойства НЧ определяют их взаимодействие с иммунной системой (Dobrovolskaia M.A. et al., 2012; Ilinskaya A.N. et al., 2013). Однако, иммуносупрессивные свойства НЧ до конца не изучены (Chen Y.W. et al., 2004; Mitchell L.A. et al., 2009; Yamashita K. et al., 2009; Shen C.C. et al., 2011; 2012). Отчасти это можно объяснить методологическими проблемами

и отсутствием системного подхода. Иммуносупрессия не является острой токсичностью, которая может быть легко контролируемой в лабораторных условиях. Оценка функциональных изменений иммунной системы предполагает длительное, систематическое, многопараметрическое *in vivo* исследование, оценивающее различные аспекты иммунитета. Многие исследования *in vitro*, демонстрирующие иммуносупрессивные свойства исследуемых наноматериалов, сосредоточены на ограниченном числе клеточных процессов, чаще всего продукции цитокинов и экспрессии поверхностных маркеров и не дают достаточных сведений для понимания иммуносупрессивного потенциала НЧ. Например, наночастицы, индуцирующие производство противовоспалительного цитокина TGF- β , не обязательно оказывают иммуносупрессивное действие. Хотя TGF- β подавляет пролиферацию лимфоцитов, в присутствии некоторых цитокинов (например, ИЛ-6 и ИЛ-1) индуцирует активацию Т-хелперов 17 (Th17), которые вызывают воспаление при различных аутоиммунных заболеваниях (Abbas K.A., 2012). Важно также отметить, какой тип клеток производит TGF- β , так как этот цитокин может быть выделен самыми различными клетками, выполняющими различные функции. К сожалению, ни в одном из исследований, описывающих продукцию TGF- β в результате воздействия искусственно созданных наноматериалов, не было предпринято попыток определения типа клеток, синтезирующих этот цитокин. Еще более усложняется ситуация, когда некоторые наночастицы могут подавлять одну иммунную функцию, стимулируя другую (Lucarelli M., 2004). Высказано предположение, что такие разнообразные реакции происходят потому, что НЧ могут проникать в клетки через различные пути и мешать работе иммунных клеток посредством самых различных механизмов.

Например, известно, что миелосупрессия — это состояние, при котором снижается активность костного мозга, при этом в крови уменьшается число эритроцитов, лимфоцитов и тромбоцитов. Подавление активности костного мозга может привести к опасным для жизни состояниям, таким как анемия, тромбоцитопения и снижение резистентности к патогенам и раку. Показано, что некоторые НЧ могут быть токсичными для клеток костного мозга. Так, НЧ оксида

сурьмы и кобальта токсичны для гемопоэтических предшественников (Bregoli L. et al., 2009). Среди семи протестированных НЧ (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Sb_2O_3 , Au, TiO_2 , Co и Ag), только НЧ Co и Sb_2O_3 в концентрациях 100 и 25 мг подавляют формирование предшественников колоний эритроидного и гранулоцитарного-моноцитарного ряда в первичной культуре гемопоэтических стволовых клеток человека (Bregoli L. et al., 2009).

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что аналогично иммуностимуляции, подавление и ингибирование иммунной функции определяется физико-химическими свойствами НЧ. Однако для дальнейшего развития этой области наноиммунологии необходимы систематические исследования взаимосвязи между структурой и активностью. Исследования должны быть сосредоточены на механизмах иммуносупрессии, опосредованной наночастицами, и на выявлении ключевых элементов (доза, способ введения, физико-химические свойства и состав), вызывающих иммуномодулирующее действие. Понимание того, какой иммуносупрессивный эффект оказывает НЧ в одной модели и иммуностимулирующий в другой модели имеет решающее значение. Это поможет исследователям в выборе подходящих носителей наночастиц и явно обеспечит прогресс в быстро развивающейся области - наноиммуотоксикологии.

1.2.2 Гепатотоксические эффекты различных наночастиц

Наночастицы меди являются одними из первых, разработанных наночастиц, которые широко используются в промышленности благодаря таким ценным свойствам как высокая электропроводность, пластичность, теплопроводность. Кроме того, они применяются в качестве антимикробного средства в биомедицине (Гусев А. И., 2007). Однако недавние исследования показали, что накопление НЧ меди в печени вызывает ряд неблагоприятных эффектов: повышение активности индикаторных ферментов печени, патологические изменения ее ткани, повреждение ДНК и апоптоз (Богословская О.А. и др., 2009; Симонов П.В. 2015).

Ежедневное пероральное введение НЧ меди (30 дней) приводит также к изменению микроэлементного статуса печени: происходит увеличение концентрации Fe, Zn, Mg, Na, Co, Al, Li, K, V, I, Se, B, P, As, Sn, Cd, снижение: Ca, Si, Sr, Pb, Cr; тогда как концентрации Ni, Hg не отличаются от контроля. На фоне 12-кратного введения НЧ меди в организм, когда суммарная доза наночастиц меди приближается к ЛД100, происходит увеличение концентрации всех элементов в печени, кроме йода, селена (Сизова Е.А. и др., 2012).

Наночастицы серебра (Ag) являются одним из наиболее часто используемых наноразмерных соединений в промышленности, производстве и биомедицине. Как уже было отмечено выше, серебро обладает уникальными антимикробными и противогрибковыми свойствами, что является основной причиной широкого использования НЧ Ag в производстве бытовой техники (холодильники, воздухоочистители, кондиционеры, стиральные машины и т.д.), средств личной гигиены, а также в текстильной и пищевой промышленности. Коммерческие продукты, содержащие НЧ серебра являются одними из наиболее популярных (Бузулуков Ю. П. и др., 2014). На сегодняшний день многие пищевые добавки содержат коллоидное серебро. Потребление НЧ Ag в составе продуктов питания составляет по некоторым оценкам от 0,4 до 27 мкг/сутки (Hadrup N., Lam H.R., 2013). Вот почему потенциальная токсичность НЧ Ag может стать серьезной проблемой общественного здравоохранения в будущем (Bartlomiejczyk T. et al., 2013; Marin S. et al., 2015).

Показано, что некоторые наносистемы на основе серебра могут провоцировать гепатотоксические эффекты у мышей, повышение уровня АЛТ, АСТ, некроз гепатоцитов, образование гранулем, абсцесс и увеличение числа синусоидальных клеток Купфера (Ramadi K.V. et al., 2016). Подобное негативное влияние НЧ может быть связано с активацией иммунной системы, опосредованной провоспалительными медиаторами, такими как интерлейкин 1 и фактор некроза опухоли альфа. Еще одно важное исследование потенциальной гепатотоксичности НЧ Ag было проведено Хейдрнежад М.С. и др. (2015) на экспериментальной модели (мыши BALB/c), результаты которого свидетельствуют о том, что

пероральное введение НЧ Ag вызывает значительное повышение АЛТ и АСТ, а также морфологические изменения печеночной ткани (Heydrnejad M.S. et al., 2015). Предполагается, что значительную роль в механизмах токсического поражения печени под влиянием НЧ Ag может играть аутофагия (аутофагоцитоз) как физиологический процесс самодеструкции. Показано, что введение НЧ Ag животным может привести к увеличению аутофагических структур в клетках печени и содержания маркера аутофагии — белка LC3-II (Lee T.Y. et al., 2013). Процесс аутофагии может быть связан с изменениями в состоянии энергетического баланса (концентрация АТФ), что может увеличить вероятность вступления клеток печени в апоптоз. Еом и Чой (2010) описали увеличение активности таких ферментов как малондиальдегида и глутатиона, а также уменьшение содержания каталазы и глутатионпероксидазы. Также указанными авторами путем определения -H2AX, специфического маркера разрыва двухслойной ДНК, было показано повреждение ДНК в клетках печени (Eom H.J., Choi J., 2010).

На экспериментальной модели крыс Sprague-Dawley показано, что окислительный стресс играет основную роль во всех гепатотоксических эффектах НЧ Ag. Например, в недавнем исследовании Патлolla А.К. и др. (2015) обнаружили, что кратковременное пероральное введение относительно высоких доз НЧ Ag (50, 100 500 мкг/кг) приводит к увеличению образования активных форм кислорода (Ebabe Elle et al., 2013; Patlolla A.K. et al., 2015). Тем не менее, следует отметить, что в исследовании Ебабе Елле и соавт. (2013) в печени существенных изменений уровни активности малонового альдегида и супероксиддисмутазы не наблюдалось.

Результаты воздействия НЧ Ag на внутриклеточную среду печеночной ткани остаются до конца не изученными. Предполагается, что НЧ Ag благодаря своим специфическим химическим свойствам свободно проникают в клетку, после чего они превращаются в ионы Ag. Это накопление Ag в его ионной форме является токсичным как для клеточной ДНК, так и для органелл и может активировать различные сигнальные пути, ведущие к апоптозу или некрозу. Однако сами НЧ Ag, проявляя цитотоксические и/или генотоксические свойства, могут индуцируют

иммунный ответ и увеличение производства химических медиаторов (то есть цитокинов), которые косвенно могут вызвать воспаление и повреждение печени.

В настоящее время в фундаментальных и клинических исследованиях используются различные формы НЧ Au (сферические частицы золота, наностержни и нанопроволоки). Коллоидное золото используется в течение сотен лет как дополнительное средство при лечении многих заболеваний. Эти НЧ привлекают к себе внимание как потенциально эффективные носители лекарственных средств, которые могут использоваться в терапии рака (Arvizo R. et al., 2012; Jain S. et al., 2012). Специфические физические свойства НЧ Au позволяют им быть неотъемлемой частью терапевтических систем клеток-мишеней, которые могут снизить токсичность и побочные эффекты противоопухолевых препаратов. Поэтому любое новое понимание модулирующего эффекта НЧ Au на функции печени представляет несомненный интерес в исследованиях их фармакологического действия. Взаимодействие между этими наночастицами и клетками организма зависит от их диаметра, формы и поверхностного заряда. Так, введение НЧ Au (30 нм) в остром эксперименте привело к значительному снижению метаболизма в печени, и в частности к увеличению продуктов ПОЛ. При этом положительно заряженные НЧ накапливались в гепатоцитах, тогда как незаряженные НЧ – в купферовских клетках печени (Gaiser V.K. et al., 2013). В другой работе авторы продемонстрировали, что пероральное введение НЧ Au сопровождалось относительно низкими показателями их аккумуляции в ткани печени (Bednarski M. et al., 2015). Кроме того, Рамбанаси С. и др. (2016) не обнаружили признаков открытой гепатотоксичности НЧ Au у крыс: пероральное введение коллоидной суспензии НЧ Au (14 нм) не сопровождалось гистопатологическими изменениями ткани печени и сдвигами в активности ферментов (Rambanapasi S. et al., 2016). Эти результаты противоречат результатам исследований Сенгупта Дж. и др. (2013), в которых продемонстрированы существенные изменения морфофункциональных характеристик различных тканей, возникающих на фоне воздействия указанных НЧ (Sengupta J. et al., 2013). Следует отметить, что многие вопросы, касающиеся потенциального воздействия

НЧ Au на физиологию печени, остаются нерешенными. Например, отсутствуют данные о взаимодействиях НЧ Au и иммунной системы, особенно в ткани печени.

Наночастицы железа, как правило, нестабильны и реагируют с водой и кислородом, образуя ионы железа. Наночастицы оксида железа состоят из магнетита (Fe_3O_4) или маггемита (Fe_2O_3). Они обладают суперпарамагнитными свойствами, которые обуславливают их широкомасштабное применение в диагностике (высококочувствительной биомолекулярной магнитно-резонансной томографии, различных биодатчиках) и терапии. Суперпарамагнит может связываться с многочисленными органическими соединениями, что может стать решением проблемы адресной доставки лекарственных соединений в патологические клетки/ткани. Однако, потенциальная токсичность НЧ железа является основным ограничивающим фактором для использования их в клинической практике, так как обнаружено, что в экспериментальных моделях животных наноматериалы на основе оксида железа вызывают повышение концентрации ферментов, связанных с повреждением печени. Так, Kumari и др. (2013) показали, что пероральное введение НЧ Fe_2O_3 крысам приводит к увеличению уровня АСТ, АЛТ и лактатдегидрогеназы (Kumari M., 2013). Суперпарамагнитные НЧ на основе оксида железа сверхмалых размеров (PUSPIO), покрытые полиэтиленгликолем-8000, вызывают рост активности АСТ и значительно увеличивают скорость перекисного окисления липидов в сыворотке крови и печени (Rajan B., Sathish S., 2015). Внутритрахеальное введение наночастиц Fe_2O_3 (размер 20 нм) может вызывать видимые изменения в структуре ткани печени: баллонную дистрофию и инфильтрацию мононуклеарных клеток (Vasili A. et al., 2015).

В исследовании Бгатовой Н.П. и соавт. (2017) проведено сравнительное изучение влияния различных форм солей лития на развитие структурных изменений, приводящих к гибели клеток гепатокарциномы - одной из агрессивных и устойчивых к лекарственной терапии опухолей человека. С помощью световой, электронной микроскопии, а также проточной цитофлуометрии, показаны структурные признаки развития апоптоза и аутофагии в клетках гепатокарциномы

при культивировании с различными формами солей лития. Обнаружено, что более выраженное действие на клетки гепатокарциномы-29 оказывали наноразмерные формы карбоната и цитрата лития. При этом наноразмерная форма цитрата лития преимущественно индуцировала апоптоз, а наноразмерная форма карбоната лития - наряду с апоптозом аутофагическую гибель клеток гепатокарциномы.

Однако не все результаты исследования введения НЧ железа свидетельствуют об их гепатотоксичности. Например, в исследовании Еасо С.Л. и Моханан П.В. (2016) внутривенное введение декстрана, стабилизированного НЧ железа, не вызывало значительных изменений в реакции ПОЛ. Кроме того, не было обнаружено существенного изменения уровней АЛТ, АЛТ, щелочной фосфотазы и билирубина (Еасо S.L., Mohanan P.V., 2016). В другой работе (Мильто И.В., Суходоло И.В., 2012; Васюков Г.Ю. и др., 2016) изучалось влияние наноразмерных частиц магнетита в различные сроки после однократного и многократного внутривенного введения на морфофункциональное состояние печени и других органов. В печени крыс после однократного введения НЧ магнетита в ранние сроки (1, 7 и 14 сутки) в перипортальных и промежуточных отделах печёночных долек встречались единичные некротизированные гепатоциты. Начиная с 7 суток, гепатоциты промежуточных и перипортальных отделов печеночных долек находились в состоянии баллонной дистрофии. Артерии в портальных трактах были спазмированы, центральные и поддольковые вены полнокровны. Синусоиды в центральных и промежуточных отделах долек были расширены. К концу эксперимента (21 и 40 сутки) выраженность описанных выше гемодинамических нарушений и органических повреждений снижалась. При многократном введении НЧ описанные выше изменения более выражены и нарастают к 14 суткам, после чего стабилизируются и сохраняются в течение всего эксперимента. Положительную реакцию Перлса в печени давали только звёздчатые макрофаги (клетки Купфера), которые лежали перисинусоидально. Суммарная доза магнетита в группе с многократным введением составила на 7 сутки-300 мг/кг (3 инъекции), на 14 сутки-600 мг/кг (6 инъекций), на 21 сутки-1 г/кг (10 инъекций) и на 40 сутки-2 г/кг (20 инъекций).

Усиление дисциркуляторных и стабилизация некротических изменений в печени крыс к 14-м суткам (600 мг (Fe_3O_4)/ кг массы тела) демонстрирует, что адаптация паренхиматозных клеток к воздействию НЧ магнетита происходит быстрее, нежели стабилизация гемодинамических изменений в строме. Компенсаторно-приспособительные реакции, проявляющиеся снижением выраженности дисциркуляторных изменений, развивались в строме лишь к 21-м суткам. Скопление Перлс-позитивных клеток Купфера в печени к 7-м суткам перипортально – проявление их миграции от синусоидов к желчевыводящим путям портальных трактов с последующим проникновением в их просвет. Эти наблюдения подтверждают наличие механизма выведения наноразмерных частиц из организма в составе желчи. Отсутствие изменений гепатоцитов, пневмоцитов, мононуклеарных фагоцитов, а так же аэрогематического барьера указывает на отсутствие выраженного токсического действия исследуемого модифицированного наноматериала на легкие и печень (Мильто И.В., Суходоло И.В., 2012; Васюков Г.Ю. и др., 2015; 2016).

В другом исследовании методом трансмиссионной электронной микроскопии изучена печень крыс после однократного внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита (0.1 г (Fe_3O_4)/кг массы тела) (Мильто И.В. и др., 2012). Показано наличие частиц магнетита в клетках Купфера и гепатоцитах. Продемонстрировано различие в накоплении частиц клетками двух данных типов. Проведена морфометрия магнетитсодержащих гранул клеток Купфера и агломератов наночастиц в гепатоцитах. Описана ультраструктура гранул клеток Купфера, на основе которой сделано предположение о механизме проникновения наноразмерных частиц магнетита внутрь клетки. Установлено, что полной элиминации наноразмерных частиц магнетита после одной инъекции из организма животного за 40 сут не происходит (Мильто И.В. и др., 2012).

Эти и другие расхождения в результатах оценка гепатотоксичности НЧ железа показывают, что это вопрос остается не до конца изученным и требует проведения дополнительных исследований. Существует острая необходимость детального исследования уровня генерации АФК, активации ферментов и

морфофункциональных изменений ткани печени, поскольку НЧ железа считаются перспективным материалом в области физиологии, фармакологии и онкологии.

Печень – главный орган-мишень и для наночастиц ZnO. Поскольку печень метаболизирует лекарственные средства через свою цитохромную ферментативную систему P450 (CYP450), было высказано предположение, что клиническая доза НЧ ZnO может приводить к неблагоприятным эффектам, так как они накапливаются в печени и снижают скорость элиминации других препаратов (Spaggiari D. et al., 2014).

Несмотря на то, что микрочастицы ZnO признаны безопасными, многочисленные исследования свидетельствуют, что пероральное введение НЧ ZnO может привести к повреждению и дисфункции печени, сопровождающееся повышением ферментов АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы (Yang X, et al. 2015; Русакова Е.А. и др. 2016; Zhang W. et al., 2018). В работе Есмаеиллоу М. и соавт. (2013) показано, что у животных, которым перорально вводили НЧ ZnO (300 или 600 мг/кг), значительно повысился уровень щелочной фосфатазы и γ -глутамилтрансферазы, что по мнению авторов наиболее вероятно связано с повреждением гепатоцитов печени наночастицами. Это подтверждается данными морфологических исследований, свидетельствующими о необратимых изменениях ткани печени у животных на фоне перорального введения НЧ (300 и 600 мг/кг).

Наночастицы оксида кремния (SiO_2) широко используются в наномедицине, в частности, для доставки лекарств и генов, в фотодинамической терапии, молекулярной визуализации, а также в качестве фармацевтических добавок и терапии рака (Coll C. et al., 2011; Chen Q. et al., 2013; Yang M. et al., 2016; Зайцева Н.В. и др., 2016). Кроме того, НЧ SiO_2 применяются в пищевой промышленности в качестве пищевой добавки, при этом среднесуточное потребление человеком может достигать 1,8 мг/кг (Colvin V. 2003; Vivero-Escoto J. et al., 2010; Benzra M. et al., 2011). Таким образом, они могут проникнуть в организм различными путями. Исследования показывают, что печень является основным органом-мишенью при внутривенном введении НЧ SiO_2 (Yu Y. et al., 2017; Almansour M. et al., 2018). Показано, что НЧ SiO_2 накапливаются в клетках Купфера, а также в гепатоцитах и

фибробластах. Кроме того, большое количество НЧ SiO_2 было обнаружено в нейтрофилах крови. Ультраструктурные изменения в печени крыс при внутривенном введении НЧ SiO_2 заключались в уменьшении клеток в размерах, уплотнении цитоплазмы, более компактном расположении органелл, конденсации хроматина по периферии, преобразовании формы ядра из округлой в форму полумесяца, накоплении липидных капель в цитоплазме, вакуолизации и наличии большого количества апоптотических клеток (Yu Y. et al., 2017).

В спецификации JECFA на диоксид кремния отсутствует информация о размере его частиц, что допускает использование в качестве пищевой добавки высокодисперсного аморфного SiO_2 , полученного газофазным гидролизом тетрахлорсилана (Зайцева Н.В. и др., 2016). Данный материал, известный как «Аэросил», характеризуется размером удельной площади поверхности 300-380 $\text{м}^2/\text{г}$ и размером своих относительно слабо агломерированных частиц 6-30 нм, то есть является наноматериалом. На биологической модели исследованы морфологические изменения тканей органов и систем при пероральном введении наноразмерных частиц SiO_2 (Зайцева Н.В. и др., 2016). Крысы-самцы линии Вистар получали на протяжении 92 суток наноразмерный SiO_2 с удельной площадью поверхности 300 $\text{м}^2/\text{г}$ и размером первичных наночастиц по данным электронной, атомно-силовой микроскопии и динамического рассеяния света в интервале 20-60 нм. Светооптическое морфологическое исследование органов крыс выявило относительно слабо выраженные воспалительные явления в структуре паренхиматозных органов (печень, почки), не демонстрирующие определенной зависимости от дозы наночастиц. Наиболее выраженными были изменения морфологии подвздошной кишки, состоящие в массивной лимфомакрофагальной и эозинофильной инфильтрации ворсинок, без видимого нарушения структуры их эпителиального пласта, что косвенно указывает на отсутствие нарушений барьерной функции кишечного эпителия. При максимальной из доз (100 $\text{мг}/\text{кг}$ массы тела) усиление иммунной реакции в стенке подвздошной кишки было наиболее значительным. Полученные результаты указывают на возможные риски

для здоровья человека при использовании SiO_2 с удельной площадью поверхности $300 \text{ м}^2/\text{г}$ и выше в составе пищевой продукции в качестве пищевой добавки.

Как уже было отмечено выше, широкое применение в различных сферах деятельности человека находят и НЧ других металлов, такие как титан, цинк, платина, медь, алюминий и др. Исследования потенциальной токсичности этих НЧ как в *in vivo*, так и *in vitro* моделях показали их способность вызывать окислительный стресс. Часто сообщения об их влиянии на скорость образования АФК не убедительны, а иногда даже противоречивы. Кроме того, влияние этих НЧ на уровень индикаторных ферментов печени неясно, и порой повышение АСТ и АЛТ не обязательно означает негативное влияние НЧ на печень (т. е. не имеет риска цирроза или печеночной недостаточности). На сегодняшний день существует недостаток сведений о потенциальных хронических гепатотоксических эффектах многих металлических НЧ (Звездин В.Н., Акафьева Т.И., 2013; Raunovic J. et al., 2017).

С использованием методов протеомики изучено влияние поступления в желудочно-кишечный тракт НЧ TiO_2 в кристаллической форме анатазы на состав белков микросом печени крыс (Тананова О.Н. и др., 2012). Животные получали водную дисперсию НЧ в дозе от 0,1 до 10 мг/кг массы тела внутривентриально через зонд ежедневно на протяжении 28 дней. Микросомальную фракцию выделяли из печени методом дифференциального центрифугирования. Состав белков микросом анализировали методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Идентификацию белковых пятен осуществляли с использованием MALDI-TOF масс-спектрального анализа. Установлено, что под воздействием НЧ TiO_2 независимо от использованных доз во всех группах животных на электрофореграммах появлялись 53 новых белковых пятна и исчезали 19 белковых пятен по сравнению с контролем. Дополнительно в группах животных, получавших высокие дозы НЧ, отмечено появление 25 новых белковых пятен при исчезновении 3 белковых пятен по сравнению с контрольной группой и с животными, получавшими низкую дозу НЧ. Масс-спектральный анализ позволил выявить среди белков, экспрессируемых под воздействием НЧ в микросомах печени животных,

ряд форм полипептидов, присутствующих в международной базе данных. Один из идентифицированных доминантных пиков был представлен изоформой Ми 2 фермента глутатион-S-трансферазы ($M=41,55$ кД; $pI=8,0$) (Тананова О.Н. и др. 2012).

Интраперитонеальное введение НЧ TiO_2 (анатаза, 5 нм) мышам в течение 14 дней показало, что с увеличением дозы, их накопление в печени увеличивается (Rothen-Rutishauser В., 2007). Биохимические сдвиги свидетельствовали о дозозависимом нарушении функции печени (повышение уровня трансаминаз, отражающее цитолитические процессы и повышение уровня щелочной фосфатазы, характерное для холестаза). В другом исследовании (Liu Н. Ма L., Zhao J., 2008) патологические изменения в ткани печени через 7 дней после введения НЧ TiO_2 в концентрации 38,88 мг/кг заключалось в фиброзе вокруг центральных вен, а после введения НЧ в концентрации 51,84 мг/кг на фоне жировой дистрофии выявлялся некроз гепатоцитов с нейтрофильной инфильтрацией, свидетельствующей о воспалительном процессе и наличие гепатоцитов с удвоением ядра, отражающих активацию пролиферативных процессов.

Таким образом, стоит отметить, что взаимодействие между наночастицами и биологическими системами не совсем понятно. Это особенно касается влияния оксидов металлов на гепатоциты и другие клетки печени. Несмотря на то, что в определенных условиях использование НЧ считается безопасным, многочисленные исследования показали, что некоторые НЧ способны вызывать гепатотоксические эффекты. Ввиду прогрессирующего использования различных НЧ в различных областях медицины важность изучения токсического влияния НЧ на структурно-функциональные особенности печени представляется актуальной задачей.

1.2.3 Нейротоксические эффекты наночастиц

Вопросы нейротоксичности НЧ привлекают особое внимание ввиду того, что в отличие от других тканей нейроны не обладают выраженной способностью к

регенерации (von Bohlen und Halbach O., 2007), а деструктивные процессы, как последствия любого повреждающего действия, являются необратимыми. Как уже было отмечено выше, в организм человека НЧ могут попасть различными путями - ингаляционно, трансдермально, перорально, мигрируя в различные органы и ткани, где они могут накапливаться и вызывать самые разные повреждения. Полученные в последние годы данные о накоплении НЧ металлов и оксидов металлов, таких как диоксид титана, оксида цинка, оксида железа, диоксида кремнезема, серебра в различных структурах головного мозга крыс и мышей при разных способах введения являются одним из признаков несостоятельности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что подтверждается результатами многочисленных экспериментальных исследований (Tang J.L. et al., 2009; Lankveld D.P.K. et al., 2010; Yeh T.K. et al., 2012; Cho W.S. et al., 2013; Krawczyńska A. et al., 2015).

Как уже было отмечено выше, НЧ оксидов металлов с размерами частиц в диапазоне от 1 до 100 нм обладают необычными физическими и химическими свойствами, благодаря которым они широко используются в различных сферах производства для улучшения качества многих промышленных, фармацевтических и медицинских изделий (Song B. et al., 2016). В тоже время вызывает опасение, что очень высокая удельная поверхность (в расчете на единицу массы), а, следовательно, высокая реакционная способность и небольшие размеры НЧ увеличивают риск повышения продукции свободных радикалов и активных форм кислорода и возможности беспрепятственного прохождения через биологические мембраны. Следовательно, НЧ оксидов металлов обладают совершенно иным биологическим действием на живые организмы в отличии от макроскопической формы этих веществ. Результаты исследований *in vivo* показали, что при внутривенном, пероральном, интраназальном и внутрибрюшинном введении животным НЧ проникают во многие органы организма, вызывая их повреждение, в том числе и головной мозг через гематоэнцефалический барьер и обонятельный тракт. Результаты многочисленных исследований, проведенных на животных моделях продемонстрировали прямые доказательства того, что НЧ могут достигать и накапливаться в паренхиме головного мозга, включая стриатум и гиппокамп. Као

с соавт. (Kao Y.Y. et al., 2012) обнаружили транслокацию НЧ ZnO в мозг при интраназальном введении крысам линии Sprague Dawley. Пероральное введение трансферрин-содержащих НЧ Au мышам приводит к их проникновению путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и аккумуляции в ткани мозга (Wiley D.T. et al., 2013). Накопление НЧ оксидов железа, титана, цинка было обнаружено в мозге животных при разных способах введения (Chen J.Y. et al., 2011; Han D.D. et al., 2011; Wu J. et al., 2013). Ограниченная скорость выведения из мозга приводит к постепенному накоплению НЧ в этом органе, а это, в свою очередь, может привести к повреждению нервных клеток и нарушает функции мозга. Таким образом, аккумуляция НЧ в головном мозгу может вызывать значительные нейротоксические эффекты (Medina C. et al., 2007). Например, было обнаружено, что НЧ ZnO способствует снижению способности к обучению и памяти у крыс (Han D.D. et al., 2011). Ху соавт. (Hu R.P. et al., 2011) выявили накопление НЧ TiO₂ при внутрижелудочном введении НЧ TiO₂ в гиппокампе мыши при пероральном введении, что привело к усилению процессов апоптоза, ухудшению пространственной памяти.

Хотя большинство исследованных НЧ оказывает дозозависимое нейротоксическое влияние, некоторые из них проявляют защитные функции по отношению к ЦНС. Так, например, было обнаружено, что фуллеренол выполняет нейропротективную функцию, предотвращая повреждение гиппокампа в результате окислительного стресса (Tsai M.C. et al., 1997). В этих исследованиях *in vitro* показано, что карбоксилфуллерены способны устранять как супероксид-анион, так и перекись водорода (H₂O₂), и являются эффективными ингибиторами перекисного окисления липидов.

Ву и др. (Wu J. et al., 2013) показали, что накожное нанесение НЧ TiO₂ в течение 60 дней приводило к накоплению НЧ в мозге мышей. Аналогично, аккумуляция НЧ TiO₂ в ЦНС наблюдалась при внутривенном и интраназальном способах введения (Wang J. et al., 2008; Geraets L. et al., 2014; Disdier C. et al., 2015).

Проницаемость плацентарного барьера является еще одной проблемой, поскольку нервная система обладает значительной пластичностью на ранних этапах развития и влияние экотоксикантов в эмбриональный период может оказать существенное влияние на функции ЦНС (Siddiqui M.A. et al., 2013). Так, ранее было показано (Shimizu M. et al., 2009), что подкожное введение самкам мышей НЧ TiO_2 во время беременности приводит к определенным повреждениям репродуктивных органов, вызывает изменение экспрессии генов, связанных с развитием мозга, гибель нейронов, оксидативный стресс и повышение активности митохондрий в головном мозге в перинатальный период развития потомства. В других исследованиях обнаружено (Engler-Chiurazzi E.B. et al., 2016), что TiO_2 с размером частиц 70 и 35 нм при внутривенном введении беременным самкам мышей также провоцирует осложнение беременности. При этом НЧ были обнаружены в плаценте, печени и головном мозге эмбрионов. Наблюдение за развитием потомства крыс, которым в пренатальный период развития интраназально вводили НЧ TiO_2 , выявило нарушение поведения и когнитивных функций крысят в возрасте пяти месяцев (Yamashita K. et al., 2011). При исследовании влияния внутрижелудочного введения НЧ TiO_2 беременным крысам в дозе 100 мг/кг на пролиферативную активность клеток головного мозга потомства показано, что в нейронах гиппокампа значительно снижается число Ki-67-имунопозитивных клеток. В этой же работе результаты теста Морриса свидетельствуют о том, что НЧ TiO_2 вызывают ухудшение памяти и способности к обучению у потомства. Таким образом, несмотря на существование биологических барьеров, которые в целом достаточно эффективно защищают организм от проникновения чужеродных антигенов, наночастицы, по-видимому, преодолевают плацентарный барьер и оказывают нейротоксический эффект при введении во время беременности (Mohammadipour A. et al., 2014).

В литературе последних лет активно обсуждаются возможные механизмы миграции различных наночастиц в головной мозг через обонятельные пути, минуя ГЭБ. Экспериментально доказано, что при интраназальном введении, наночастицы, мигрируя через аксоны, входящие в состав обонятельного и

тройничного нервов, способны депонироваться в обонятельной луковице, стриатуме, гиппокампе, стволе мозга, мозжечке и лобной коре (Hunter D.D., Undem V.J., 1999; Elder A. et al., 2006; Elder A., Oberdorster G., 2006; Maysinger D. et al., 2007). Так, значительное содержание НЧ TiO_2 было выявлено при их интраназальном введении (80 нм, рутил и 155 нм анатаз; 500 мкг, через день в течение 30 дней) в коре головного мозга, таламусе, обонятельной луковице и гиппокампе (особенно в СА1 и СА3 регионах) самок мышей (Wang J. et al., 2008). При этом было показано, НЧ транслоцировались в головной мозг через обонятельный тракт. В качестве возможного механизма рассматривается эндоцитоз частиц чувствительными нервными окончаниями эпителия дыхательных путей, и в частности системами обонятельного и тройничного нервов. По мнению многих исследователей, обонятельный тракт может быть критическим порталом проникновения НЧ в ЦНС человека, особенно при их высоких концентрациях в окружающей среде и воздухе рабочей зоны при длительном воздействии, связанном с профессиональной деятельностью. В совокупности, указанные выше данные свидетельствует о транслокации наночастиц в организм человека и высокой уязвимости к воздействию НЧ глубоких структур головного мозга, и в частности гиппокампа, даже за короткое время экспозиции (Wang J.X. et al., 2007; Hu R.P. et al., 2010).

Согласно данным исследований последних лет, среди таких основных механизмов влияния НЧ на нейроны, как апоптоз, воспалительная реакция, повреждение органелл клетки, сигнальных путей и нарушение регуляции синаптической пластичности, окислительный стресс (ОС) занимает особое положение (Long T.C. et al., 2006; Hu R.P. et al., 2010; Massaad C.A., Klann E., 2011; Marazziti D. et al., 2012; Li J. et al., 2013; Feng X.L. et al., 2015). Клетки ЦНС особенно восприимчивы к ОС ввиду высокого потребления кислорода, слабой антиоксидантной способности и необратимой терминальной дифференцировки нейронов. В последние годы частота встречаемости людей, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона и первичными опухолями головного мозга

неуклонно растет. Точная причина этих заболеваний до сих пор неизвестна, хотя предполагают, что в обострении этих заболеваний могут играть роль как НЧ, так и другие ксенобиотики (Win-Shwe T.T., Fujimaki H., 2011). Несмотря на то, что на сегодняшний день отсутствуют доказательства взаимосвязи между воздействием НЧ на организм человека и заболеваниями ЦНС, клинические исследования, проводимые с использованием животных демонстрируют эту возможную связь. Например, Мирсаттари С.М. и соавт. (Mirsattari S.M., 2004) сообщили о случае с 71-летним мужчиной, у которого развился эпилептический приступ, и он впал в кому после ежедневного приема коллоидного серебра в течение 4 месяцев. Высокие уровни НЧ Ag были обнаружены в плазме, эритроцитах пациента. К сожалению, плазмоферез не дал положительного эффекта и спустя 5,5 месяцев эксперимент закончился летальным исходом. Результаты другого исследования показали, что нейротоксическое действие НЧ TiO_2 могут появиться в результате нарушения гомеостаза микроэлементов, ферментов и медиаторных систем (Hu R.P., 2010). Показано, что НЧ Ag при подкожном введении индуцируют повреждение ГЭБ, астроцитов и являются причиной дегенерации нейронов у крыс (Tang J.L., 2009).

Окислительный стресс и нарушение функций митохондрий рассматривается в настоящее время как один из важнейших и возможных факторов развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и других психоневрологических расстройств (Tobe E.H., 2013). Хотя на сегодняшний день нет однозначной концепции молекулярных основ патогенеза этих заболеваний, считается, что одной из причин, приводящей к гибели нервных клеток и, как следствие этого, к когнитивным нарушениям, является образование различных внутриклеточных белковых агрегатов (Brieger K. et al., 2012). Например, согласно амилоидной гипотезе патогенеза болезни Альцгеймера агрегаты бета-амилоидного пептида вызывают гибель нейронов и воспалительные процессы в ЦНС. Причины образования таких агрегатов многообразны, в том числе окисление белков в результате повышенного образования АФК, воздействия на клетки генетических и токсических факторов. Так, в экспериментах *in vitro* показано, что

некоторые НЧ, в том числе и НЧ TiO_2 (20 нм) ускоряют фибринолиз и образование агрегатов бета-амилоидного пептида в нейронах ЦНС, тем самым это рассматривается как отягчающий фактор возникновения указанных патологий. Считается доказанным, что ОС, вызванный воздействием металлических НЧ, играет доминирующую роль в механизмах нейротоксичности. Лонг Т.С. и др. (Long T. C. et al., 2006; Long T.C. et al., 2007; Li H., 2013) в своих исследованиях *in vitro* впервые показали, что НЧ TiO_2 могут индуцировать дозозависимое повышение уровня H_2O_2 в клетках BV2 (иммortalизованной клеточной линии микроглии мозга), в которых с помощью просвечивающей электронной микроскопии были обнаружены набухшие митохондрии, что указывает на нарушение их функции и, следовательно, энергетического обмена. Подобные эффекты были обнаружены Ванг Дж. и др. (2008) и при исследованиях *in vivo* (Wang J. et al., 2008). При различных способах введения крысам НЧ TiO_2 наблюдалось повышение уровней АФК, малонового диальдегида (МДА), подавление синтеза эндогенных антиоксидантов — аскорбатпероксидазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы (Shrivastava R. Y. et al., 2014; Yin J. et al., 2014; Ma L. et al., 2010). Таким образом, НЧ TiO_2 способны вызывать дисбаланс между процессами образования и ликвидации свободных радикалов: повышенное производство АФК, индуцированное воздействием НЧ, превосходит способности биологических антиоксидантов противостоять токсическому окислительному стрессу, что в конечном счете приводит к дисфункциям в ЦНС.

Результаты ряда работ показали, что большинство изученных НЧ, попадая в нервные клетки, накапливаются в митохондриях, что ведет к повреждению их мембраны, нарушению в работе дыхательной цепи и, как следствие этого, увеличению производства АФК (Vokov D.A. et al., 2015). Применительно к НЧ TiO_2 установлено, что они вызывают повышение генерации АФК в клетках микроглии, также нарушая работу митохондрий (Shimizu M. et al., 2009), изменяя электрогенные характеристики их мембраны с последующим увеличением доли маркеров апоптоза Bax/Bcl-2, что указывает на сопряженность процессов

нарушения функционирования митохондрий и возможностью вступления клеток в апоптоз (Engler-Chiurazzi E.V. et al., 2016).

Воспалительный ответ, вызванный НЧ по мнению многих авторов является еще одним важным механизмом нейротоксичности. Обнаружено, что НЧ TiO_2 вызывают нейровоспалительный ответ, о чем свидетельствует повышение уровня противовоспалительных цитокинов, высвобождаемых активированной микроглией мозга мышей (Su M. et al., 2015). При этом показана высокая пролиферативная активность глии и некроз нервной ткани в области гиппокампа. Выявлено нарушение экспрессии генов, связанных с сигнальными путями нейротропина, такими как фактор роста нервов (NGF) и нейротрофический фактор мозга (BDNF). Согласно данным других авторов интраназальное введение в течение 90 дней НЧ TiO_2 вызывало в гиппокампе мышей повышение экспрессии toll-like рецептора (TLR2), TLR4, ядерного фактора-каппа В (NF- κ B) и фактора некроза опухоли- α (TNF- α) (Ze Y. et al., 2014). Обнаружено, что интратрахеальное введение указанных НЧ приводит к повышению экспрессии интерлейкина- 1β (IL- 1β), TNF- α и IL-10 в головном мозге мышей и повреждению астроцитов (Liu Y. et al., 2013) согласуется с результатами исследований (Su M et al., 2015), которые показали, что НЧ TiO_2 вызывают апоптоз в нейронах гиппокампа крыс, провоцируя повышение уровни Ca^{2+} , цитохрома с, Вах, каспазы-3 и каспазы-12. В другом независимом исследовании обнаружено уменьшение жизнеспособности клеток, индукция апоптоза в клеточных линиях микроглой N9 (Li X. et al., 2009) и U87 астроцитомы человека на фоне воздействия НЧ TiO_2 (Lai J.C. K. et al., 2008).

1.2.4 Органы репродуктивной системы при воздействии наночастиц

Широкое применение наноматериалов в промышленности, производстве потребительских продуктов и медицине вызывает озабоченность в связи с относительно потенциальной токсичностью НЧ и их негативным влиянием на организм человека. В частности, существенную проблему представляет потенциально не безопасное влияние наноматериалов на репродуктивную систему

живых организмов. Женский организм особенно уязвим к токсическому воздействию НЧ, так как затрагивается вся репродуктивная система, а размер самих частиц позволяет им проникать через плацентарный барьер и оказывать влияние и на формирование плода. Кроме того, различные типы НЧ оказывают негативное воздействие на мужские половые клетки. Степень неблагоприятного воздействия зависит от модификации наночастиц, их состава, концентрации, пути введения и вида животного. В связи с этим понимание механизмов воздействия НЧ на рост и размножение живых организмов имеет важное значение. В многочисленных исследованиях на моделях *in vivo* и *in vitro* изучено влияние НЧ на первичные и вторичные органы-мишени, на мужскую и женскую репродуктивную системы на организменном, клеточном и молекулярном уровнях (Guo L.L. et al., 2009; Zhao X. et al., 2013; Jia F. et al., 2014; Hong F. et al., 2017; Zhang L. et al., 2018; Karimipour M. et al., 2018; Мильто И.В. и др., 2018).

Влияние НЧ на женскую репродуктивную систему. Различные ксенобиотики оказывают токсическое воздействие как на репродуктивную функцию, так и на эмбриогенез (Hillier S. G., 1994; Anway M. D. et al., 2005; Armenti A. E. et al., 2008; Song B. et al., 2009). Аналогичным образом, НЧ представляют потенциальную угрозу для женского организма, наиболее восприимчивого к воздействию различных антропогенных загрязнителей, и их токсические эффекты изучаются на разных моделях (Tsuchiya T. et al., 1996; Wang J. et al., 2011). Вопросы токсического воздействия НЧ на репродуктивную систему относятся к одной из наиболее острых проблем человечества (Adler S. et al., 2010).

Для изучения влияния негативного влияния НЧ на биологические системы используются многочисленные модели *in vitro*. Однако присутствие НЧ в таких моделях мешает системам детекции, либо аналитическим материалам, что приводит к противоречивым или необъективным результатам, в связи с чем в последние годы уделяют больше внимания моделям *in vivo* (Bahadar H. et al., 2016). Наиболее часто объектами исследования становятся крысы, мыши и кролики (Bahadar H. et al., 2016; Kong L. et al., 2016).

В последние годы появились данные о накоплении НЧ в органах репродуктивной системы особей женского пола. Так, НЧ Au (1,4 нм, 5 мкг/животное) приводит к накоплению этих НЧ в стенке матки, причем аккумуляция НЧ значительно выше была в органах беременных крыс и увеличивалось пропорционально росту размера и веса матки с плодом (Semmler-Behnke M. et al., 2014). Аналогичные результаты были получены в исследованиях НЧ оксида железа (10, 20, 30 и 40 нм) (Yang L. et al., 2015). Ингаляция НЧ оксида кадмия (CdO) с диаметром 11 или 15,3 нм приводила к накоплению НЧ в матке, которое не зависело от использованной дозы (Blum J.L. et al., 2012). Ежедневное же воздействие более высокой концентрации НЧ CdO (230 мкг/м³) в сравнении с более низкой дозой (100 мкг/м³) индуцировало увеличение веса матки у беременных мышей. Стоит отметить, что испытанные дозы НЧ были ниже, чем существующая на сегодняшний день предельно допустимая концентрация вещества в воздухе рабочей зоны промышленных производств. Сведения о потенциальном токсическом воздействии этих НЧ безусловно важны для решения вопросов экологической безопасности и особенно в отношении наиболее восприимчивых к воздействию ксенобиотиков групп населения, таких как беременные женщины и развивающийся плод.

Что же касается других органов репродуктивной системы женского организма, то на сегодняшний день известно об их негативном влиянии и на яичники. Исследование влияния НЧ TiO₂ (5 г/кг массы тела, 25 и 80 нм, 14 дней) показало, что пероральное их введение в организм половозрелых мышей не приводит к патологическим изменениям ткани яичников (Wang J. et al., 2007). В то время как продолжительное воздействие (90 дней) сопровождается негативными изменениями в этих органах, заключающимися в изменении экспрессии генов, связанных с синтезом эстрогена и прогестерона (Gao G. et al., 2012). В модели *in vitro* в фолликулах, выделенных из яичников крыс, также показана потенциальная токсичность высоких доз НЧ TiO₂, проявляющаяся в уменьшении размеров фолликулов и в дозозависимом нарушении скорости созревания ооцитов (Juan H. et al., 2009). Подобные эффекты воздействия наночастиц TiO₂ на яичники крыс и

мышей описаны в самых различных исследованиях *in vitro* и *in vivo* (Wang J. et al., 2007; Juan H. et al., 2009; Gao G. et al., 2012). Следовательно, необходимо проводить дальнейшие исследования дозозависимых эффектов НЧ TiO_2 с целью информирования женского населения о потенциальной токсичности НЧ в случае непреднамеренного их использования, например, в составе солнцезащитных кремов, косметических и протезных имплантатах, а также комплексных фармацевтических препаратов для лечения различных заболеваний кожи (Wiesenthal A. et al., 2011; Shi H. et al., 2013).

Яичники являются органом мишенью для НЧ Au, в связи с чем они рассматриваются как потенциальные компоненты противораковых лекарственных средств в терапии злокачественной опухоли яичников (Kafshdooz L. et al., 2016). Известно, что НЧ никеля (90 нм, 15 или 45 мг/кг массы) при введении взрослым крысам уменьшают массу яичников, повышают в них интенсивность апоптоза, вызывают эозинофильную инфильтрацию, воспаление, а также индуцируют сосудистую дилатацию и агрегацию (Kong L. et al., 2014).

Наночастицы также влияют и на другие аспекты женского репродуктивного здоровья. Имеются данные, что различные НЧ могут изменять экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в стероидогенезе, имеющие решающее значение для синтеза эстрогена и/или прогестерона. Например, как упоминалось выше, длительное внутрижелудочное введение взрослым мышам TiO_2 -аминопартина (5-6 нм, 10 мг/кг) вызывает не только повреждение яичников, но и приводит к изменениям в экспрессии генов в путях эстрогенсинтеза и метаболизма прогестерона, включая цитохром P450 17A1 (Cyp17a1) и семейство альдокеторедуктазы 1, член C18 (Akr1c18) (Gao G. et al., 2012). При длительном воздействии НЧ TiO_2 увеличивается экспрессия гена Cyp17a1, который кодирует цитохром P450 17A1, что приводит к увеличению уровня эстрадиола (Gao G. et al., 2012). Экспрессия гена Akr1c18, который кодирует альдокеторедуктазу семейства 1 члена C18 (20-альфа-гидроксистероиддегидрогеназа, 20-альфа-HSD), также увеличивается. Представленные данные согласуются с наблюдаемым уменьшением уровня прогестерона у мышей, которым вводили НЧ TiO_2 , поскольку

20-альфа-HSD ассоциируется с метаболизмом прогестерона (Gao G. et al., 2012). В этом исследовании также было продемонстрировано, что продолжительное введение высоких доз НЧ TiO_2 приводило к изменению экспрессии генов, связанных с апоптозом, а также генов, ассоциированных с воспалительным и иммунным ответами, пролиферацией клеток, переносом ионов и окислительным стрессом (Gao G. et al., 2012). Таким образом, изменения уровней стероидных гормонов, окислительный стресс, воспаление яичников и повышение активности апоптоза в клетках репродуктивной системы могут способствовать повреждению яичников, снижению фертильности и вероятности наступления беременности (Gao G. et al., 2012).

Результаты воздействия высоких доз НЧ TiO_2 и как следствие, воспаление и апоптоз согласуются с данными исследования *in vitro* и *in vivo*, в которых были изучены эффекты влияния высоких доз НЧ Ag (Kim S. et al., 2004). Воздействие указанных НЧ *in vitro* на фолликулы яичника мыши приводило к активации митохондриального пути апоптоза, в то время как экспрессия противовоспалительных цитокинов *in vivo* увеличивалась вместе с уменьшением числа гамет (Han J.W. et al., 2016). Таким образом, установлено, что чрезмерное воздействие НЧ TiO_2 и Ag оказывает катастрофические последствия, провоцируя индукцию апоптоза и/или острые воспалительные реакции в яичниках.

Хроническое внутрижелудочное введение НЧ TiO_2 сопровождалось повышением уровня эстрадиола в крови, тогда как ингаляционное воздействие НЧ CdO (230 мкг/м^3) приводило к уменьшению уровня 17β -эстрадиола, увеличению синтеза мРНК для рецепторов эстрогена $\text{ER}\alpha$ и $\text{ER}\beta$ в матке и сопровождалось увеличением массы матки беременных мышей. Снижение уровня имплантации, наблюдаемое у мышей, получавших НЧ оксида кадмия (230 мкг/м^3) (Blum J. L. et al., 2012), согласуются с хорошо известной способности кадмия действовать как агонист эстрогена и снижать вероятность наступления имплантации.

В других исследованиях показано, что выхлопные газы дизельного топлива содержащие НЧ, также могут оказывать токсическое воздействие на репродуктивную систему. Так, НЧ выхлопных газов, вводимые беременным

крысам с 1-19 дней беременности, уменьшали экспрессию мРНК фермента цитохрома P450 с боковой цепью и 3β -гидроксистероиддегидрогеназы, которые являются ключевыми для синтеза прогестерона из холестерина во время лютеинового стероидогенеза у крыс, а также рецептора лютеинизирующего гормона (Chun-Mei L. I. et al., 2013).

Таким образом, неблагоприятные эффекты НЧ на органы репродуктивной системы женского организма зависят от их типа, размера, дозы и пути введения. Однако представляет интерес и последствия трансплацентарного переноса НЧ в связи с потенциально токсическими последствиями для развивающегося эмбриона и плода.

Плацента вырабатывает гормоны, которые регулируют обмен веществ между матерью и плодом и поддерживают нормальное протекание беременности и эмбриональное развитие, а также защищают плод от потенциально опасных агентов. Однако плацентарный барьер, избирательно проницаем, например, для питательных веществ, антител и гормонов, и частично непроницаем для всех токсичных агентов, ксенобиотиков, сигаретного дыма (Tong V. T. et al., 2013; Ananth C. V., et al., 1996; Olivero O. A. et al., 1997; Perera F. P. et al., 2003; Menon R. et al., 2011; Robbins J. R., Bakardjiev A. I., 2012; Whidbey C. et al., 2013; Adebambo O. A. et al., 2015; Muoth C. et al., 2016) Показано, что НЧ могут оказывать негативное воздействие на развивающийся плод благодаря их трансплацентарному переносу от матери к потомству (Hou C. C. et al., 2017). Небольшие размеры НЧ, накопление в репродуктивных органах обуславливают прохождение ими плацентарного барьера. Для изучения этой проблемы были использованы различные модели плаценты, в том числе модели эмбриогенеза грызунов и рыбок данио (*Danio rerio*), перфузионные модели плаценты человека. Подобные исследования подтверждают, что НЧ Au, TiO_2 , SiO_2 , углерода (C) могут легко проходить через плацентарный барьер (Semmler-Behnke M. et al., 2007; Takeda K. et al., 2009; Chu M. et al., 2010; Sumner S. C. et al., 2010; Refuerzo J. S. et al., 2011; Yamashita K. et al., 2011). Эффекты этих НЧ зависят от размера: НЧ размером менее 240 нм проникают через плацентарный барьер в модели перфузии плаценты *ex vivo*

human (Wick P. et al., 2010). Однако, в связи с использованием различных доз, видов НЧ и разной продолжительностью их введения возникают трудности в интерпретации полученных результатов и их сопоставлении.

В исследовании Ямасита К. и соавт. (2011) была разработана система для оценки трансплацентарного переноса кремнезема (Si) (70 нм) и НЧ TiO₂ (35 нм) после инъекции в хвостовую вену беременных мышей в течение двух дней подряд. Результаты исследования показали, что происходит прикрепление НЧ к трофобластам плаценты, их перенос, что в конечном счете ведет к снижению на 20-30% веса матки, увеличению частоты резорбции плодов, уменьшению их веса и размера, опосредованной дисфункцией плаценты (Yamashita K. et al., 2011). Однако, фуллерены (0,7 нм) и НЧ Si (300 и 1000 нм) не проникали в плацентарный трофобласт и не вызывали подобных неблагоприятных последствий. Кроме того, возникающие на фоне введения НЧ негативные эффекты были устранены путем модификации поверхности НЧ Si аминными или карбоксильными группами. Следует отметить, что дозы НЧ Si и TiO₂, используемые в исследовании, описанном выше, были очень высоки (на 800 мкг/крысу), что может некорректно отражаться на полученных результатах. Такие дозы являются репрезентативными для доклинических исследований на животных моделях с целью проверки эффективности доставки лекарственного средства в комплексе с НЧ Si, но они намного превосходили те дозы, которые сопоставимы с концентрацией их в составе солнцезащитных кремов или косметических средств, содержащих НЧ TiO₂ (Yamashita K. et al., 2011). Более низкие дозы, использованные в этом исследовании (200 или 400 мкг/мышь) не влияли на развитие плода, в отличие от наблюдаемых эффектов введения НЧ в дозе 800 мкг/мышь. Исследование, направленное на изучение механизма проницаемости плацентарного барьера НЧ золота (1,4 нм-5 мкг; 18 нм-3 мкг; 80 нм-27 мкг) при внутривенном введении беременным и небеременным крысам показало, что НЧ проникают через плацентарный барьер, обнаруживаются в околоплодной жидкости (Semmler-Behnke M. et al., 2014). При этом более НЧ меньших размеров обнаруживались в более высоких концентрациях. Транслокация, по-видимому, происходила через

транстрофобластические и/или трансцеллюлярные каналы. Однако в плодах НЧ обнаружены не были. Подобные результаты были получены и другими авторами (Rattanapinyopituk K. et al., 2014), которые предположили перенос НЧ через плацентарный барьер путем клатрин- и кавеолин- независимого эндоцитоза.

Преимущественное проникновение в плаценту НЧ небольших размеров была доказана на других животных моделях. При введении в хвостовую вену беременных крыс линии Wistar радиоактивно меченых НЧ Au (5 нм, 20 мкг), НЧ были обнаружены у плодов на 19 гестационный день, тогда как частицы больших размеров – на более позднем сроке (Semmler-Behnke M. et al., 2014). При этом НЧ были локализованы в плаценте в дозе, которая в 100-300 раз превышает их накопление в плодах, что указывает на то, что НЧ могли пересечь желточный мешок и хориоаллантаальную плаценту для проникновения в плод (Takahashi Y. et al., 2010). Однако в другом аналогичном исследовании у мышей через 1, 4 и 24 часа после внутрибрюшинного или внутривенного введения НЧ золота (2-40 нм) они не были обнаружены в организме беременных мышей C57BL/6 (Sadauskas E. et al., 2007). Подобные противоречивые результаты исследований свидетельствуют об отсутствии консенсуса в решении вопроса безопасности применения НЧ во время беременности и требует проведения дальнейших исследований.

Что касается других типов наноматериалов, то аналогичные эффекты были обнаружены и в отношении флуоресцентных КТ (CdTe / CdS QDs, CdTe), которые используются для флуоресцентной микроскопии и молекулярной диагностики *in vitro* в прикладных диагностических и биомедицинских исследованиях (Chu M. et al., 2010).

Проблемой в изучении плаценты крыс или мышей является трудность экстраполяции результатов на людей, поскольку физиология и анатомия плаценты человека уникальны (Wick P. et al., 2010). В некоторых работах показано, что через плаценту человека НЧ проникают гораздо легче, чем через плаценту грызунов более высокие концентрации (Wick P. et al., 2010; Rattanapinyopituk K. et al., 2014).

Была предпринята попытка оценки проницаемости плацентарного барьера человека для НЧ, используя модель перфузии плаценты человека плацебо *ex vivo*

(Wick P. et al., 2010). Флуоресцентные полистирольные гранулы (50, 80, 240 и 500 нм, 25мкг/мл) перфузировали в довольно высокой дозе, которая была сопоставима с той, что используется в клинической практике (Thiesen V., Jordan A., 2008; Wick P. et al., 2010). Наночастицы размером менее 240 нм успешно транслоцировались через плаценту, однако не имели заметного влияния на жизнеспособность или структуру плаценты. Результаты аналогичного исследования, проведенного с использованием НЧ Au, покрытых ПЭГ (30 нм) в модели перфузии плаценты человека плацебо *ex vivo* (Myllynen P. K. et al., 2008), показали, что эти НЧ не проникают плацентарный барьер. Следует отметить некоторые ограничения модели экспрессии перфузии плаценты человека *ex vivo*, т.к. она ограничена периодом времени в несколько часов из-за последующей деградации ткани, и поэтому не может быть использована для оценки тех событий, которые происходят в результате хронического воздействия НЧ в естественных условиях. Кроме того, они дают картину плаценты только на заключительной стадии беременности, когда барьер между матерью и эмбрионом значительно уменьшается. В более ранний период беременности частота перфузии могла быть ниже (Wick P. et al., 2010). Тем не менее, результаты подобных исследований подчеркивают необходимость рассмотрения потенциальной токсичности каждого вида НЧ и их способности пересекать плацентарный барьер на разных стадиях гестации. Действительно, возвращаясь к исследованиям на животных, результаты одного из них, в котором НЧ Au были введены в хвостовую вену мышей (0,9 и 7,2 мг/кг), показывают, что степень воздействия на плод зависит от стадии гестации, включая стадии созревания плаценты (Yang H. et al., 2012). На самом деле, на ранних стадиях беременности, до 11,5 дней, НЧ, в основном, накапливались в тканях плода, тогда как накопление вне эмбриональных тканей увеличивалось после этого периода. Показано также, что имеет значение и поверхностный состав НЧ, так как наночастицы ферритина и полиэтиленгликоля накапливаются как в эмбриональных, так и в экстра-эмбриональных тканях с большей скоростью, чем наночастицы (Yang H. et al., 2012).

К настоящему времени накопились убедительные данные, свидетельствующие о том, что различные НЧ оказывают токсическое воздействие на развивающийся плод. В исследованиях Йамашита К. et al. (2011), например, наблюдалось накопление TiO_2 и SiO_2 (800 мкг/кг) у плодов крыс, о чем свидетельствует повышенная частота резорбции плодов и уменьшение их размера на 16, 17 дни гестации (Yamashita K. et al., 2011). Другие исследования с использованием НЧ Au аналогичного размера, напротив, не привели к накоплению золота у плодов крыс или к какому – либо негативному воздействию на плод, несмотря на то, что НЧ преодолевали плацентарный барьер и обнаруживались в матке (Rattanapinyopituk K. et al., 2014; Semmler-Behnke M. et al., 2014). В этих исследованиях дозы НЧ были в 100-1000 раз меньше, чем дозы TiO_2 и SiO_2 , используемые Йамашита К. С соавт. (2011). Эти данные подчеркивают сложность определения потенциальной угрозы для здоровья, которые действительно представляют различные типы НЧ, в связи с трудностью определения уровня реальной дозы воздействия на организм человека. В условиях стремительного развития нанотехнологий и появления новых форм наноматериалов часто отсутствует понимание, какие свойства наиболее важны для определения токсичности. Недостаток знаний о поведении наноматериалов в разных системах и отсутствие теоретических моделей, включая биологические, обесценивает прогнозирование их поведения. Санитарно-гигиеническая и токсикологическая характеристика наноматериалов должна основываться на многочисленных тестах *in vitro* и *in vivo*, включая длительные эксперименты на животных.

Тем не менее, широкомасштабное использование НЧ и их биосовместимость означает, что исследования, предполагающие потенциальную токсичность некоторых НЧ для плода, нельзя игнорировать, особенно в контексте терапевтического использования НЧ у беременных женщин или потенциально высокого уровня воздействия в связи с профессиональной деятельностью. Повышенная частота резорбции плодов наблюдается не только при высоких дозах TiO_2 или SiO_2 (Yamashita K. et al., 2011). Так, показано, что при внутривенном введении С60 (200-300 мг / кг) беременным или кормящим крысам, НЧ проникают

через плацентарный барьер и оказывают токсическое воздействие на развитие эмбрионов (Sumner S. C. et al., 2010; Snyder R. W. et al., 2015).

Существуют убедительные данные о неблагоприятном воздействии пренатального введения НЧ на развитие головного мозга и ЦНС у плодов. При подкожной инъекции НЧ TiO_2 (300 нм, 100 мкг/на животное) на 3, 7, 10 и 14 дни гестации (всего 400 мкг) у потомства в возрасте 4 дней и 6 недель методом рентгеновской спектроскопии в обонятельной луковице и в коре лобной и височной областей мозга обнаружено присутствие НЧ диаметром 100-200 нм, что сопровождалось стенозом кровеносных сосудов в гиппокампе и коре головного мозга (Takeda K. et al., 2009). В аналогичных исследованиях введение НЧ TiO_2 (25-70 нм, 100 мкг) беременным мышам на 6, 9, 12, 15 и 18 гестационные дни (общая доза 500 мкг) приводило к увеличению уровня допамина и его метаболитов в префронтальной коре и неостриатуме (Takahashi Y. et al., 2010). Более того, у потомства самцов в полосатом теле, обонятельной луковице и коре головного мозга были обнаружены изменения в экспрессии гена допамина на 16 день эмбриогенеза и 7, 14 день постэмбрионального развития. Результаты исследований позволили авторам сделать вывод о том, что НЧ TiO_2 переносятся от беременных самок к их потомству, проникают через плацентарный барьер и оказывают повреждающее воздействие на головной мозг и гениталии у потомства мышей в возрасте 6 недель. Между тем, интратрахеальное введение беременным мышам C57BL/6JomTac на 7, 10, 15 и 18 дни гестации (268 мкг/животное) вызывает изменения поведения потомства (Jackson P. et al., 2011). Эти исследования подчеркивают уязвимость мозга плода к токсическому воздействию различных типов НЧ, и прежде всего гематоэнцефалического барьера.

Показано, что НЧ также могут вызывать аномалии развития репродуктивной системы плода. Электронно-микроскопическое исследование позволило выявить, что при подкожном введении НЧ TiO_2 (диаметр <300 нм при 100 мкг/животное) на 3, 7, 10 и 14 дни гестации, всего 400 мкг) НЧ проникают в интерстициальные клетки Лейдига, клетки Сертоли и сперматиды потомства мужского пола (Takeda K. et al., 2009). Обнаружено также, что воздействие НЧ TiO_2 временно подавляет

пролиферацию клеток Лейдига (Hong F. et al., 2016) и приводит к апоптозу клеток Сертоли у мышей (Ritz C. et al., 2011). Кроме того, обнаружено, что указанные НЧ способны вызывать изменение морфологических характеристик семенников и снижение суточного объема спермы (Takeda K. et al., 2009). В другом исследовании, аналогичным образом, воздействие НЧ выхлопных газов дизельного топлива увеличивают количество мутаций в мужских половых клетках (Boisen A. M. Z. et al., 2012). Что касается женских гамет мыши, наноразмерная сажа (Printex90) и НЧ TiO_2 не индуцирует возникновение мутации в женских половых клетках мыши (Boisen A. M. Z. et al., 2012; Zhao X. et al., 2013). Однако, данные все же необходимо подтвердить, оценив параллельно эффекты как у самок, так и самцов, поскольку еще одно исследование показало, что повреждение яичников связано с воздействием нано- TiO_2 (Di Bona K. R. et al., 2015). Высокие дозы НЧ Fe_2O_3 (100 мг/кг) при перитонеальном введении беременным самкам мышей также имеют неблагоприятные последствия для репродуктивного здоровья как самок, так и самцов (Tsukue N. et al., 2002).

В других исследованиях введение НЧ выхлопных газов крысам в течение всего срока беременности приводит к уменьшению веса органов репродуктивной системы самцов и уровня тестостерона, прогестерона, кортикостерона и фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови, а также стероидогенного острого регуляторного белка и 17β -гидроксистероиддегидрогеназы (Watanabe N., 2005).

Таким образом, результаты, полученные в экспериментах с использованием животных свидетельствуют о том, что нельзя исключать долгосрочные неблагоприятные эффекты различных НЧ на фертильность и репродуктивную функцию у потомства беременных женщин, подвергшихся воздействию НЧ. Это является еще одной причиной для проведения дополнительных исследований с целью выяснения неблагоприятных эффектов различных типов НЧ и определения безопасных доз их применения.

Влияние НЧ на мужскую репродуктивную систему. Воздействие наночастиц также оказывает влияние и на мужскую репродуктивную систему, включая

нарушения в сперматогенезе, начиная с периода появления гамет в извитых семенных канальцах семенников. Кроме того, происходит сокращение объема производимой спермы (Boisen A. M. Z. et al., 2012), что связано с изменением экспрессии генов, участвующих в сперматогенезе (Lan Z., Yang W. X., 2012; Hong F. et al., 2015 a, b). Проблемы могут начаться на этапе эмбриогенеза, если НЧ поступают внутриутробно. Например, как упоминалось ранее, при подкожном введении НЧ TiO_2 (400 мкг, <300 нм) беременным мышам НЧ обнаруживаются в клетках Сертоли, сперматиде извитых семенных канальцах и интерстициальных клетках Лейдига у самцов потомства в возрасте 4 дней и 6 недель (Takeda K. et al., 2009). Это сопровождается уменьшением числа клеток Сертоли, изменением морфологии яичек, заключающееся в появлении зон опустошения в ИСК и уменьшения объема суточного производства спермы (Takeda K. et al., 2009). Эпидидимальная подвижность сперматозоидов также изменяется у 6-недельного мужского потомства. Таким образом, воздействие на плод ухудшает развитие и функции мужской репродуктивной системы уже на стадии образования гамет.

Накопление НЧ в семенниках показано на некоторых моделях животных, но на основе доступных данных трудно определить токсические эффекты НЧ на структурно-функциональные характеристики семенников. Внутривенное и/или внутрибрюшное введение НЧ Si (покрытых либо хлоридом натрия, либо иодидом натрия) в дозе 0-225 мг / кг массы тела белым мышам Куньмина (Chen Y. et al., 2003) приводит к накоплению в семенниках уже через 96 ч после введения. Однако нет сведений о появлении патологически измененных клеток или об увеличении смертности животных (Chen Y. et al., 2003). Аналогично, внутрибрюшинное введение магнитных НЧ с покрытием из диоксида кремния, содержащего изотиоцианат родамина В (MNPs @ SiO_2 RITC, водорастворимый, толщина 50 нм, 0, 25, 50 или 100 мг / кг) мышам в возрасте 6 недель в течение 4 недель приводит к накоплению НЧ в семенниках животных без видимого токсического эффекта (Kim S. et al., 2004). Результаты введения флуоресцентных НЧ диаметром 39,4 нм в 1 мг/л для яиц рыбы медака показали, что НЧ обнаруживаются в семенниках (Leclerc L. et al., 2015). Однако не было обнаружено патологических изменений в ядрах

клеток, симптомов токсического отравления или повышенной смертности даже при более высоких дозах, в том числе в последующих поколениях (Хуе Z. et al., 2005; Leclerc L. et al., 2015). Напротив, недавнее исследование внутримышечного введения НЧ SiO мышам не выявило наличие НЧ (70 нм) в яичках даже через 45 дней после введения (Hong F. et al., 2016).

Вместе с тем, есть достоверные данные о том, что другие виды НЧ могут вызывать токсическое воздействие путем накопления в семенниках и отрицательно влияют на качество спермы, а значит, и фертильность особей мужского пола. Исследования, проведенные с использованием фруктовых мух, свидетельствуют о том, что накопление НЧ Ag в семенниках влияет на количество стволовых клеток (Lafuente D. et al., 2016). Субхроническое пероральное воздействие НЧ Ag, покрытых поливинилпириловым пропиленом (ПВП) также приводит к изменению морфологии семенников и сперматозоидов (Hong F. et al., 2016). Воздействие НЧ TiO₂ также негативно сказывается на репродуктивной системе животных мужского пола (Ritz C. et al., 2011). Важно отметить, что относительная растворимость и проникновение через тканевые барьеры могут быть важным фактором в индуцировании токсичности. Растворимые наночастицы, такие как Ag, могут выводиться из организма с помощью обычных метаболических путей и, таким образом, иметь относительно меньшую токсичность, тогда как нерастворимые частицы и те, у которых длительный период полураспада, будут оказывать пролонгированное действие на организм. Недавние исследования показывают, что у самцов мышей снижение фертильности и интенсивности апоптоза/некроза сперматогенных клеток и клеток Сертоли в ответ на введение TiO₂ связано с воспалительными и иммунными реакциями в семенниках (Ritz C. et al., 2011).

Изучена структура семенников половозрелых крыс в течение 120 сут после однократного внутривенного введения модифицированных хитозаном (магнитные наносферы) и липидами (магнитолипосомы) наноразмерных частиц магнетита (Мильто И.В. и др., 2018). Введение суспензий немодифицированных и модифицированных хитозаном и липидами наноразмерных частиц магнетита не вызывает альтерации сустентоцитов, сперматогенных клеток и интерстициальных

эндокриноцитов, однако приводит к развитию обратимых гемодинамических изменений в семенниках. С помощью гистохимической реакции Перлса в интерстициальной соединительной ткани семенников выявлены клетки, которые поглощают и накапливают наночастицы магнетита. Установлена динамика индекса сперматогенеза и количества перлс-позитивных клеток в семенниках крыс в течение эксперимента. Показано, что исследуемые модифицированные наноразмерные частицы магнетита не проникают через гематотестикулярный барьер крыс (Мильто И.В. и др., 2018).

Изучено влияние НЧ Au на репродуктивную функцию самцов крыс (Филатов Б.Н. и др., 2015). Комплексную характеристику функционирования половых желез самцов на фоне воздействия НЧ Au авторы оценивали по состоянию сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев семенников и функциональной активности гамет, полового поведения, являющегося отражением нейрогуморальной регуляции в системе “гипоталамус-аденогипофиз-семенники”, способности самцов к оплодотворению. В результате установлено, что НЧ Au оказывают негативное влияние на репродуктивную функцию самцов лабораторных животных. Зарегистрированные отклонения (тератозооспермия, агглютинация сперматозоидов и сниженная способность к оплодотворению) не являются следствием нарушения гормонального статуса поскольку способность животных к спариванию была сохранена. В этой связи представляется очевидным факт наличия у оцениваемых соединений цитотоксических свойств. Результаты аутометаллографических исследований свидетельствуют, что препарат НЧ Au не проникает в сами семенники. В то же время нельзя исключить их попадания и возможного накопления в хвостовой части придатков гонад, содержащих зрелые половые клетки. По всей видимости, попадая в придатки, вещество оказывало негативное влияние на гаметы, изменяя их морфологию и вызывая агглютинацию, что в дальнейшем естественным образом сказывалось на способности самцов к полноценному оплодотворению.

В связи с выше сказанным, существует настоятельная необходимость проведения сравнительных исследований для окончательной оценки последствия

накопления различных типов НЧ в семенниках при их введении в различных дозах и режимах, особенно в контексте риска профессиональных заболеваний для мужчин.

Потенциальная токсичность НЧ на репродуктивную систему исследуется и путем анализа зародышевых клеток. Результат такого воздействия также зависит от типа используемых НЧ. В исследовании непосредственного воздействия НЧ Au (9 нм, 44 мкг / мл) на сперму нормального здорового мужчины (Wiwanitkit V. et al., 2009) НЧ аккумуляровались в жгутиках сперматозоидов, а также акросоме, что приводит к незрелости 25% сперматозоидов эякулята. Были также изучены эффекты прямого смешения поливинилового спирта (PVA) с покрытием из фосфата Fe_3O_4 с спермой быка (Ben-David Makhluф S. et al., 2006). Результаты такого прямого воздействия показали, что НЧ, попадая в сперму прикрепляются к митохондриям в жгутике и в области акросомы, однако не было выявлено очевидного их влияния на реакцию и моторику сперматозоидов. В другой работе изучена репродуктивная токсичность НЧ Au размером 5 и 20 нм на самцах белых крыс. При аутометаллографическом исследовании НЧ Au обнаруживали в соединительнотканной оболочке семенников. Иммуногистохимическое изучение экспрессии антигена PCNA показало его снижение в сперматоцитах I и II порядка (Почепцов А.Я. и др., 2012).

Стволовые клетки сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев мышей являются подходящей моделью в *in vitro* исследованиях сравнения репродуктивной токсичности различных НЧ (Braydich-Stolle L. et al., 2005). Сперматогонии типа А, выделенные из семенников 6-дневного самца мыши и бычьи сперматозоиды использовали для проверки способности НЧ с покрытием из магнетита-PVA проникать в стволовые клетки (Braydich-Stolle L. et al., 2005). При этом для оценки цитотоксичности исследовали функцию митохондрий, морфологию клеток, проницаемость мембран и интенсивность апоптоза. В подобных исследованиях был сделан важный вывод о том, что токсичность НЧ зависит от дозы НЧ. Одной из основных проблем в понимании того, как НЧ влияют на репродуктивную систему, является то, что в исследованиях используются

разные методы и подходы, которые порой не сопоставимы. Для решения этой проблемы необходимо тесное сотрудничество токсикологов для разработки и интерпретации результатов исследований.

С каждым годом количество исследований репродуктивной токсичности НЧ увеличивается, однако эта область знаний фактически находится на предварительном этапе изучения. Несмотря на то, что имеются данные, свидетельствующие о том, что некоторые НЧ оказывают негативный эффект на органы как мужской, так и женской репродуктивной системы, однако все исследования проводились с использованием самых разных доз НЧ и путей введения, что затрудняло прямые сравнения и формирование окончательных выводов. У самок животных объектом изучения являются матка и яичники, на которые оказывают влияние НЧ, включая, например, TiO_2 , Cd и Au, но в результатах исследований с точки зрения доказательства морфологических эффектов в литературе описаны противоречивые результаты. У самцов также существуют данные, свидетельствующие о том, что НЧ накапливаются в семенниках и оказывают неблагоприятное воздействие на морфологию органов репродуктивной системы. Эти результаты свидетельствуют о потенциальном риске токсического влияния наноматериалов на мужской организм в случае отсутствия предельно допустимых доз применения.

Тем не менее, механизмы, лежащие в основе нарушения сперматогенеза под влиянием НЧ остаются недостаточно изученным. С появлением специфичных маркеров, позволяющих адекватно идентифицировать не только сами клетки, но и их функциональное состояние, стало возможным исследование клеточных основ токсического воздействия наночастиц на органы и ткани. Применительно к сперматогенному эпителию семенников целесообразно использование маркера стволовых клеток – c-kit, экспрессия которого позволяет отслеживать количество стволовых клеток, расположенных на его базальной мембране. Одним из ключевых показателей эффективности сперматогенеза является скорость пролиферации клеток, входящих в его состав, что можно оценить, используя маркер пролиферации, например, ki-67. Эти подходы были использованы в нашей работе.

Таким образом, данные, представленные в обзоре литературы, свидетельствуют о неблагоприятных токсических эффектах различных НЧ на разнообразные структурно-функциональные характеристики изученных тканей организма. Эти негативные воздействия НЧ носят системный характер, а мишенями являются практически все клетки организма. Вместе с тем, в настоящее время явно недостаточно сведений о повреждающем действии НЧ на различные клеточные типы организма, и они носят фрагментарный, а зачастую противоречивый характер, что делает невозможным корректно описать механизмы их негативного действия на них.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование проведено на крысах линии Вистар обоего пола. Животных содержали в стандартных условиях вивария на сбалансированном пищевом рационе при свободном доступе к воде и пище. Животные были разделены на группы, каждая из которых включала 6 особей (табл. 3). При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Исследование одобрено Локальным Этическим комитетом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук (протокол № 2 от 25.04.2016). В работе использовали нанодисперсный TiO_2 рутильной модификации производства ЗАО «Промхимпермь», г. Пермь (рутильная форма, массовая доля TiO_2 не менее 99,9%). Суспензию TiO_2 получали разведением нанопорошка TiO_2 в дистиллированной воде. Агрегацию НЧ предотвращали обработкой суспензии НЧ TiO_2 в ультразвуковой ванне. Распределение НЧ TiO_2 по размерам определяли на анализаторе размеров частиц Shimadzu SALD-7101 (Shimadzu, Япония) методом лазерной дифракции (УФ-лазер) (Shimadzu, Япония): спектральное разрешение – 1 нм, диапазон от 10 нм до 300 мкм, длина волны излучения 375 нм). Средний размер НЧ TiO_2 составил 40-60 нм (рис. 2).

Поскольку изучение эффектов воздействия НЧ на различных моделях имеет достаточно долгую историю, то мы сочли возможным использовать разработанную другими исследователями (Bettini S. et al., 2017) схему введения НЧ (доза, сроки) для критической оценки полученных результатов при сравнении с данными современной литературы (табл. 3). Кроме того, выбранная нами концентрация была сопоставима с вычисленной на основании анализа потребления НЧ TiO_2 в составе различных продуктов питания (Winkler H.C. et al., 2018) среднесуточной дозой (пероральное поступление), которая составляет в зависимости от возраста от 2 до 13 мг/кг массы тела. Крысам контрольной группы в аналогичных условиях вводили

дистиллированную воду в том же объеме. Животных выводили из эксперимента через 14, 30 дней передозировкой диэтилового эфира.

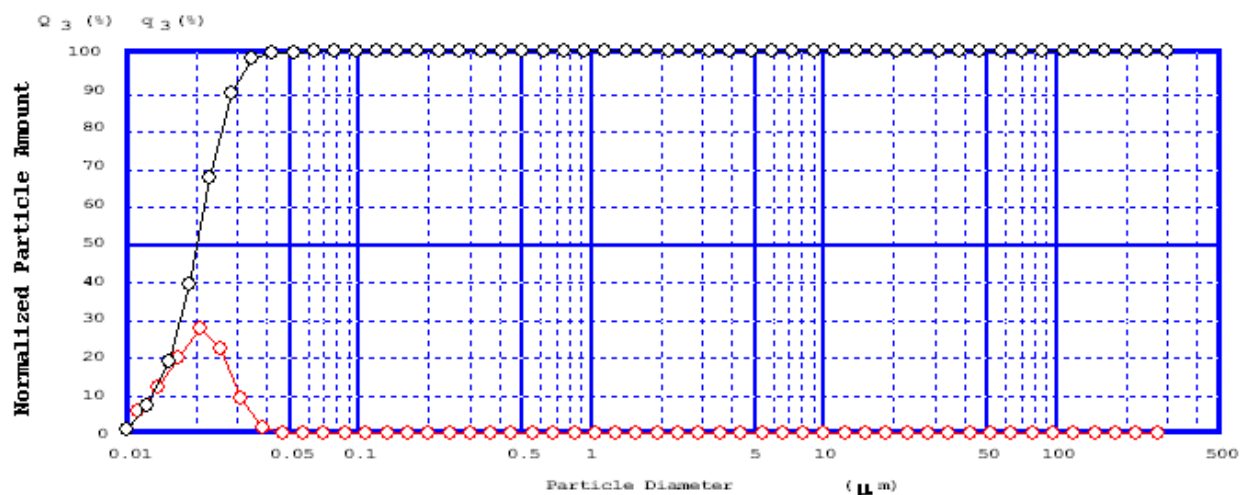
Т а б л и ц а 3

**Способы, сроки, дозы введения НЧ TiO₂ и количество животных
в различных сериях экспериментального исследования**

№ п/п	Серия экспериментального исследования	Способ введения, доза	Срок введ., сут.	Кол-во жив-х (доноров) контроль/опыт
1	Изучение морфологии лимфоидных органов, печени и клинико-лабораторных показателей крови крыс	перорально, 10 мг/кг массы тела	30	6/6
2	Исследование морфофункциональных изменений ЦНС	интраназально, 10 мг/кг массы тела	14 30	12/12
3	Изучение структурно-функциональных особенностей семенников крыс	перорально, 10 мг/кг массы тела	14 30	12/12
4	Изучение влияния НЧ TiO ₂ при пероральном введении самкам крыс во время беременности на эмбриональное развитие	перорально, 10 мг/кг массы тела	19	10/10
5	Изучение отдаленных эффектов антенатального воздействия НЧ TiO ₂ на раннее постнатальное развитие потомства, в первые 30 суток жизни	перорально, 10 мг/кг массы тела	19	98/93
	Общее число животных			271
6	Изучение нейтрофилов крови человека после воздействия НЧ TiO ₂ в условиях in vitro с помощью атомно-силовой микроскопии	in vitro, прямое воздействие, 0,75 мг/л		10/10
	Общее число доноров			20

Гистологические методы исследования. Кусочки тканей фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Из парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 5–6 мкм (микротом LEICA 4RM 2145, Германия), окрашивали

гематоксилином-эозином, толуидиновым синим, пикрофуксином по Ван-Гизону. Исследование гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопов Leica DMD 1-08 (Германия) и AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и программой анализа изображений AxioVision (C.Zeiss, Германия).



	Diam x (μ m)	Cum Q ₃ (%)	Diff q ₃ (%)		Diam x (μ m)	Cum Q ₃ (%)	Diff q ₃ (%)		Diam x (μ m)	Cum Q ₃ (%)	Diff q ₃ (%)
1	300.000	100.000	0.000	18	9.014	100.000	0.000	35	0.271	100.000	0.000
2	244.106	100.000	0.000	19	7.334	100.000	0.000	36	0.220	100.000	0.000
3	198.626	100.000	0.000	20	5.968	100.000	0.000	37	0.179	100.000	0.000
4	161.620	100.000	0.000	21	4.856	100.000	0.000	38	0.146	100.000	0.000
5	131.508	100.000	0.000	22	3.951	100.000	0.000	39	0.119	100.000	0.000
6	107.006	100.000	0.000	23	3.215	100.000	0.000	40	0.097	100.000	0.000
7	87.070	100.000	0.000	24	2.616	100.000	0.000	41	0.079	100.000	0.000
8	70.847	100.000	0.000	25	2.129	100.000	0.000	42	0.064	100.000	0.000
9	57.648	100.000	0.000	26	1.732	100.000	0.000	43	0.052	100.000	0.051
10	46.907	100.000	0.000	27	1.409	100.000	0.000	44	0.042	99.949	1.556
11	38.168	100.000	0.000	28	1.147	100.000	0.000	45	0.034	98.393	9.197
12	31.057	100.000	0.000	29	0.933	100.000	0.000	46	0.028	89.195	22.358
13	25.270	100.000	0.000	30	0.759	100.000	0.000	47	0.023	66.837	27.494
14	20.562	100.000	0.000	31	0.618	100.000	0.000	48	0.019	39.343	20.050
15	16.731	100.000	0.000	32	0.503	100.000	0.000	49	0.015	19.293	12.062
16	13.614	100.000	0.000	33	0.409	100.000	0.000	50	0.012	7.231	5.952
17	11.078	100.000	0.000	34	0.333	100.000	0.000	51	0.010	1.280	1.280

Рисунок 2. Распределение частиц по размеру для TiO₂

Электронная микроскопия. Кусочки тканей выделяли под контролем микроскопа МБС-10 (ЛОМО, СПб., Россия), фиксировали в растворе 2,5%-ного глютарового альдегида на фосфатном буфере Миллонига (рН 7,2-7,4) с дофиксацией в 1%-ном растворе OsO₄, обезвоживали и заливали в смесь смол Эпон-812 по общепринятой методике. Ультратонкие срезы, полученные с помощью ультратома EM UC 7 (Leica, Германия), контрастировали 2%-ным

водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963) и изучали в трансмиссионном микроскопе «JEM-1011» (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Иммуногистохимические исследования осуществляли на парафиновых срезах толщиной 6-8 мкм. Окраску проводили на автоматизированном стайнере для иммуногистохимии и гибридизации *in situ* Leica Microsystems Bond™ (Германия) с применением первичных поликлональных антител (табл. 4). Использовали поликлональную непрямую стрептавидин-биотиную систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первичных антител.

Т а б л и ц а 4

Первичные антитела для иммуногистохимического исследования

Антиген (краткая характеристика)	Клон; разведение; фирма-производитель
PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток	PC-10; 1:300; Santa Cruz Biotechnology, USA
p53 - ядерный маркер апоптоза	Fl-393; 1:300; Santa Cruz Biotechnology, USA
Ki-67 – маркер пролиферирующих клеток	1:75; DACO; MKI67; 1:300; Novus Biologica, USA
c-kit – маркер стволовых клеток	c-19; 1:300; Santa Cruz Biotechnology, USA
CD 68 –маркер макрофагов	ED-1; 1:300; Santa Cruz Biotechnology, USA
GFAP – маркер астроцитов	2E1; 1:300; Santa Cruz Biotechnology, USA
VEGFR-1(flt-1) – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста	C-17; 1:300; Novus Biologica, USA

Клинико-лабораторные исследования заключались в анализе 18 параметров крови, полученных с использованием автоматического ветеринарного гематологического анализатора Abacus Junion VET (DIATRON, Австрия). Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимза, с использованием иммерсионной системы микроскопа. Для оценки функциональных изменений печени в сыворотке крови определяли активность индикаторных ферментов аспартатаминотрансферазы (АсАТ),

аланинаминотрансферазы (АлАТ). Использовали наборы реактивов «Spenreact» (Spenreact, Испания) и полуавтоматический биохимический анализатор STAT FAX 4500 (Awareness Technology, США).

Исследование нейтрофилов периферической крови с помощью атомно-силовой микроскопии. *Пробоподготовка нейтрофилов.* Нейтрофилы выделяли по методу И.С. Подосинникова и соавт. (1981) из гепаринизированной (20 ед./мл) венозной крови условно здоровых доноров обоего пола в возрасте 20-22 лет (n=20) по стандартной методике в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,076$ г/см³, $\rho=1,117$ г/см³). После центрифугирования кольцо нейтрофилов собирали с помощью пипетки Пастера и разбавляли равным объемом забуференного раствора NaCl (0,45%). Для поддержания нормальной осмолярности клетки дважды суспендировали в фосфатно-солевом буфере PBS, центрифугировали в течение 10 минут и снова суспендировали в солевом растворе Хенкса (HBSS). Жизнеспособность клеток к началу эксперимента при окраске трипановым синим составляла 95-99%. Приготовленную суспензию НЧ TiO₂ способом, указанным выше, использовали для инкубации с нейтрофилами ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл, 30 мин, при 37°C) в конечных концентрациях, не влияющих на их жизнеспособность – 0,75 мг/мл. Жизнеспособность клеток в контроле и после воздействия наночастиц оценивали по результатам окраски пропидиумом йодидом (Sigma, США). Для этого клетки фиксировали на подложке этиловым спиртом (70%, 10 мин), затем отмывали и окрашивали 0,025%-ным раствором пропидиума йодида. После пятикратного отмывания подсчитывали долю окрашенных (погибших) на 100 клеток.

АСМ-исследования фиксированных нейтрофилов. С целью изучения структурных особенностей интактные нейтрофилы (контрольная группа) и клетки, подвергнутые воздействию НЧ TiO₂ (опытная группа), фиксировали на твердой подложке (стекло) с использованием фиксирующего агента глутарового альдегида (1,5%) согласно сертифицированной методике измерений фиксированных нейтрофилов, разработанной в лаборатории Научно-образовательного центра

«Физика твердотельных наноструктур» Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (Плескова С.Н. и др., 2005), которая предполагает контактный режим измерения как наиболее точно передающий топографические и размерные характеристики фиксированного биологического объекта. Сканирование поверхности 10÷12 клеток каждого образца крови проводили в полуконтактном режиме на воздухе, используя кремниевые зонды PPP-CONTRt (Nanosensors) с жесткостью 43 Н/м и резонансной частотой 185 кГц. Для визуализации сканируемых объектов использовали программу PicoView 1.20.

Исследование упругих свойств поверхности нативных нейтрофилов. Для оценки ригидности клеток использовали метод силовых кривых, получаемых в режиме спектроскопии АСМ (Плескова С.Н. и соавт., 2006). Исследования поверхности нативных клеток интактной и опытной группы проводили в жидкостной ячейке при комнатной температуре на АСМ Agilent 5500AFM с использованием кремниевых зондов PPP-CONTRt (Nanosensors) и коллоидных V-образных зондов CP-PNPL-SiO-C с прикрепленной сферой (диаметр 6,62 мкм). Оценка упругих свойств (определение эффективного модуля Юнга) клеток проводилась в рамках принятой модели контактной механики Герца. С целью получения адекватных результатов все измерения исследуемых клеток проводили в течение одного часа. В серии экспериментов сравнивали показатели упругости нейтрофилов, полученных из крови доноров до и после воздействия НЧ TiO₂.

Исследование биоэлектрической активности мозга (ЭЭГ).

Регистрировали ЭЭГ у крыс с помощью подкожных игольчатых электродов, представляющих собой иглу из нержавеющей стали (длина 12 мм, диаметр 0,6 мм). Внутри иглы располагалась золотая проволока (регистрирующая часть электрода, диаметр 0,4 мм), покрытая лаковой изоляцией. При регистрации ЭЭГ ненаркотизированную крысу фиксировали в руке экспериментатора, вводили подкожно два регистрирующих электрода в область правого полушария теменной и фронтальной части головы и референтный электрод в области носовой кости, а также фиксировали серебряные клипсовые мини-электроды (земляной и

дополнительный, для контроля артефактов) на левой передней лапе и правой задней лапе животного. Для лучшего контакта с кожей для клипсовых мини-электродов использовали электродный гель «Унигель». Регистрация ЭЭГ животных осуществлялась с использованием 8-канального электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-1В» для ветеринарии («Нейрософт», Иваново). Частота дискретизации составила 250 Гц. ЭЭГ регистрировали в течение 60 мин за сутки до начала эксперимента (контроль) и на 14-й, 30-й дни интраназального введения НЧ TiO_2 . Анализ ЭЭГ проводили при помощи программного обеспечения «Нейрон-Спектр.NET», позволяющего автоматически генерировать амплитудные и спектральные характеристики биопотенциалов и оценивать их с помощью вейвлет преобразования по всей длине записи или по отдельным эпохам. Вейвлет преобразование даёт хорошую локализацию как по времени, так и по частоте, что позволяет эффективнее исследовать частотно-временную динамику процессов. Вейвлет-преобразование сигнала состоит в его разложении по базису, сконструированному из обладающих определенными свойствами функций, посредством масштабных изменений и переносов. Непрерывное вейвлет преобразование W функции f задается формулой (Daubeshies I., 1992): $Wf(a, b) = 1/\sqrt{|a|} \int f(x) \psi \{(x-b)/a\} dx$, где a, b – коэффициенты масштабирования и сдвига соответственно. Коэффициент « b » отвечает за сдвиг по времени, а коэффициент « a » - за частотную характеристику. Для частотно-временного анализа часто используют вейвлет Морле, который определяется следующим выражением: $\psi(x) = C_1 \exp(-x^2/2) \cos(C_2 x)$, где C_1, C_2 – константы. Спектрограммы Морле сигнала ЭЭГ имеют вид системы хребтов, наиболее мощный из которых мы принимаем за доминирующий процесс.

На основе вейвлет-анализа были построены амплитудные и частотные вейвлетные спектрограммы для отрезков ЭЭГ продолжительностью 8 – 10 сек. При исследовании ЭЭГ крыс анализировали спектр мощности основных ритмов ЭЭГ в Δ - (1–4 Гц), θ - (4–8 Гц), α - (8–14 Гц), β_1 - (14–24 Гц) и β_2 - (24–32 Г) диапазонах.

Поведенческие тесты. Оценка уровня тревожности крыс проведена с помощью установки «приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК «Open Science», Россия). В течение 5 мин регистрировали показатели исследовательской активности: количество выходов в открытые рукава лабиринта, число стоек в открытых и закрытых рукавах; уровень тревожности животного: время, проведенное в открытых и закрытых рукавах установки (с), количество свешиваний с открытого рукава («оценка риска»). Для изучения эмоциональной реактивности животного (склонности к тревоге, страху, депрессии) использовали тест «черно-белая камера». В ходе эксперимента регистрировали следующие показатели: число и латентность (с) выглядываний из темного отсека в светлый, число выходов в светлый отсек, число пересеченных квадратов (локомоции) и вертикальных стоек, суммарная длительность (с) выглядываний и выходов в освещенную часть камеры.

Исследование эмбриотоксического и тератогенного действия НЧ TiO₂ проведено в соответствии с МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». Для получения животных с точно датированным сроком беременности использовали метод анализа содержимого вагинальных мазков. В течение двух эстральных циклов просматривали вагинальные мазки, окрашенные метиленовой синью. Отбирали самок в стадии проэструса и подсаживали на ночь в клетку к самцам (из расчета 1-2 самки на 1 самца); утром следующего дня проводили их обследование. Обнаружение в вагинальных мазках сперматозоидов принимали за первый день беременности. При их наличии производили маркировку крысы, определяли у нее массу тела.

В первой серии опытов изучена эмбриональная токсичность НЧ TiO₂, регистрируемая в антенатальном периоде развития. На 20-й день беременности производили эвтаназию самок передозировкой эфирным наркозом; вскрывали матку и извлекали из брюшной полости репродуктивные органы. Матку вместе с яйцеводами и яичниками помещали в чашку Петри с теплым физиологическим раствором. Вскрыв рога матки, под бинокулярной лупой подсчитывали число

живых и мертвых плодов, а также количество мест имплантации. В отсепарированных яичниках оценивали количество желтых тел. Критериями оценки эмбриотоксического и тератогенного действия наночастиц диоксида титана служили такие показатели как пред-, постимплантационная и общая эмбриональная смертность эмбрионов. Для определения предимплантационной смертности вычисляли разницу между количеством желтых тел и количеством мест имплантаций и определяли, какую долю составила эта цифра от числа желтых тел (%). Постимплантационная смертность вычислялась по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов, соотнесенной на число мест имплантаций (%). Для вычисления общей эмбриональной смертности находили разность между числом желтых тел беременности и количеством живых плодов и определяли, какую долю в процентах составила эта цифра от числа желтых тел беременности. Под бинокулярной лупой в чашке Петри плоды подвергали наружному осмотру, обращая внимание на состояние головы (особенно — лицевого черепа и глаз), позвоночника, хвоста, строение конечностей, наличие подкожных гематом.

Во второй серии опытов изучали отдаленные эффекты антенатального воздействия НЧ TiO_2 на развитие потомства крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза. Оценивали физическое развитие потомства крыс в течение первых 30 суток жизни по ряду интегральных и специфических показателей: число крысят в помете, число живых и мертворожденных, день отлипания ушной раковины, день появления первичного волосяного покрова, день прорезывания резцов, день открытия глаз, масса тела крысят (г) на 4-й, 7-й, 14-й и 21-й дни, гибель самок в период вскармливания.

Морфометрические методы. Для оценки морфометрических параметров и структурных особенностей клеточной поверхности нейтрофилов, фиксированных на стеклянной подложке, были построены кривые профилей сечения поверхности, на которых был определен диаметр и высота клетки относительно подложки (мкм). Для оценки степени шероховатости поверхности нейтрофилов была определена

глубина инвагинации (мкм), путем вычисления разности между минимальной и максимальной высотой клетки относительно подложки.

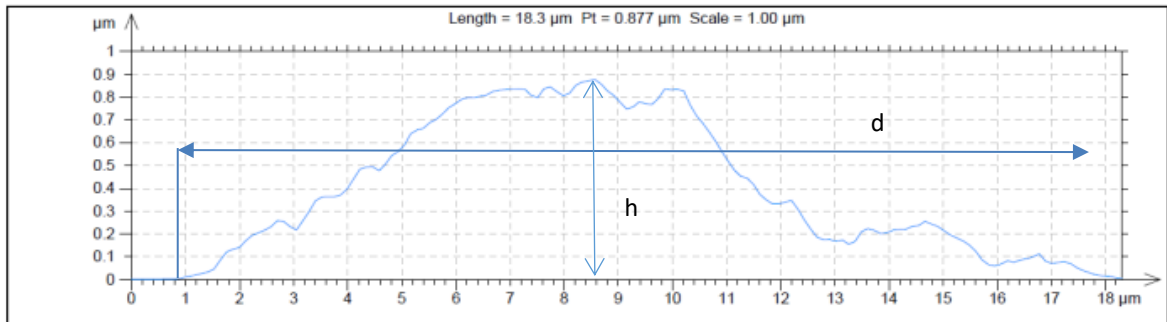


Рисунок 3. Кривая бокового профиля нейтрофилов. Обозначения: h – высота клетки относительно подложки, d – диаметр клетки

Морфометрические исследования органов иммунной защиты, семенников, гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса головного мозга осуществляли на светооптическом уровне. В ткани тимуса определяли относительную площадь (%), занимаемую корковым и мозговым веществом, абсолютное число клеток на площади 100 мкм^2 . В гистологических препаратах селезенки определяли площадь, занимаемую белой и красной пульпой, отдельными структурно-функциональными зонами белой пульпы, долю первичных и вторичных лимфоидных узелков, абсолютное число клеток на единицу площади (100 мкм^2) в различных зонах белой пульпы селезенки. В поверхностных шейных лимфатических узлах определяли долю первичных и вторичных лимфоидных узелков, их площади, абсолютное число клеток на 100 мкм^2 . Морфометрические исследования семенников заключались в оценке толщины сперматогенного эпителия (мкм), диаметра поперечного сечения извитых семенных канальцев (мкм) и площади ядер клеток Лейдига (мкм^2). В гиппокампе и центральном ядре амигдалы подсчитывали плотность на $0,001 \text{ мм}^3$ вещества мозговой ткани, средние площади (мкм^2) ядра и перикариона нейронов (по: Автандилов Г. Г., 1990; Боголепова И.Н., 1977).

Результаты иммуногистохимического окрашивания препаратов изученных тканей оценивали визуально под световым микроскопом Leica. Для идентификации

клеток использовали морфологические критерии. Положительную реакцию оценивали по коричневому окрашиванию ядра (для маркеров Ki-67, PCNA), цитоплазмы (для маркеров CD68, c-kit), ядра и цитоплазмы (маркеры p-53, rVEGF). Количество клеток, экспрессирующих изучаемые маркеры, выражали в виде среднего числа Ki-67-, p53- и CD68-, rVEGF-иммунопозитивных клеток или вычисляли процент позитивно окрашенных клеток (Ki-67, PCNA) к негативно окрашенным клеткам (на 100 просчитанных клеток). Подсчет иммунопозитивных клеток производили в 20 полях зрения каждого образца при увеличении x400. Для оценки уровня экспрессии маркера глиальных клеток кислого глиального фибриллярного белка (GFAP) измеряли среднюю интенсивность окрашивания (%) в 20 полях зрения при увеличении x400, используя возможности программного обеспечения «ImageJ» с предустановленным плагином «Color Deconvolution» (Ruifrok A., Johnston D., 2001) Методика основана на разложении микрофотографии на несколько фотографий, визуализированных в различных вариациях цветового спектра.

С целью изучения эмбриотоксического действия НЧ извлеченные из матки беременных крыс эмбрионы подвергали взвешиванию (г) и с помощью линейки и штангенциркуля определяли их кранио-каудальный размер (см).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных производили в пакете прикладных программ STATISTICA V.7.0 («StatSoftInc», США). Вид распределения признаков в группах оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка (Гланц С., 1998; Реброва О. Ю., 2000; Ланг Т.А., Сесик М., 2011). Сравнение данных, подчиняющихся закону нормального распределения, проводили с помощью параметрических методов (t-критерий Стьюдента), для множественных сравнений использовали многофакторный анализ ANOVA; противном случае – непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни для парных сравнений, метод Краскела-Уолиса – для множественных сравнений). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Лимфоидные органы крысы в условиях перорального введения наночастиц диоксида титана

3.1.1 Морфологическая характеристика тимуса

Изучение препаратов тимуса, окрашенных гематоксилином эозином, показало, что в контрольной группе он имеет типичное дольчатое строение, характерное для этого вида животных (рис. 3 а). В дольке тимуса на светооптическом уровне хорошо различается более темное корковое и центрально расположенное светлое мозговое вещество. Границы между корковым и мозговым веществом были четкими. В корковом веществе по плотности распределения лимфоцитов на единице площади гистологического среза различаются две части: наружная (субкапсулярная зона) и внутренняя (глубокая кора). Субкапсулярная зона тимуса представлена 4-8 рядами лимфобластов, среди которых выявлялись единичные митотически делящиеся клетки. Мозговое вещество тимуса представлено равномерно распределенными эпителиальными клетками, лимфоцитами. В нем выявлялись многочисленные тимические тельца, состоящие из 3-5 эпителиальных клеток.

У животных опытной группы определялась умеренная акцидентальная инволюция тимуса, характеризующаяся опустошением и сужением коркового вещества (рис. 3 б). В мозговом веществе тимуса преобладали эпителиальные клетки, выявлялись многочисленные тимические тельца из 3-7 и более эпителиальных клеток.

Морфометрический анализ тимуса опытной группы показал, что площади глубокой зоны коры и мозгового вещества дольки существенно изменяются по сравнению с аналогичными показателями животных интактной группы (рис. 4). Так, в тимусе опытной группы животных установлено уменьшение доли коркового вещества на 17,6% ($p < 0,05$). При этом в этой зоне тимуса отмечается значительное снижение плотности клеточной популяции за счет уменьшения количества

тимоцитов: число лимфоцитов на единицу площади в субкапсулярной зоне снижается на 26,7%, а в глубоком корковом веществе на 19,3% (рис. 5).

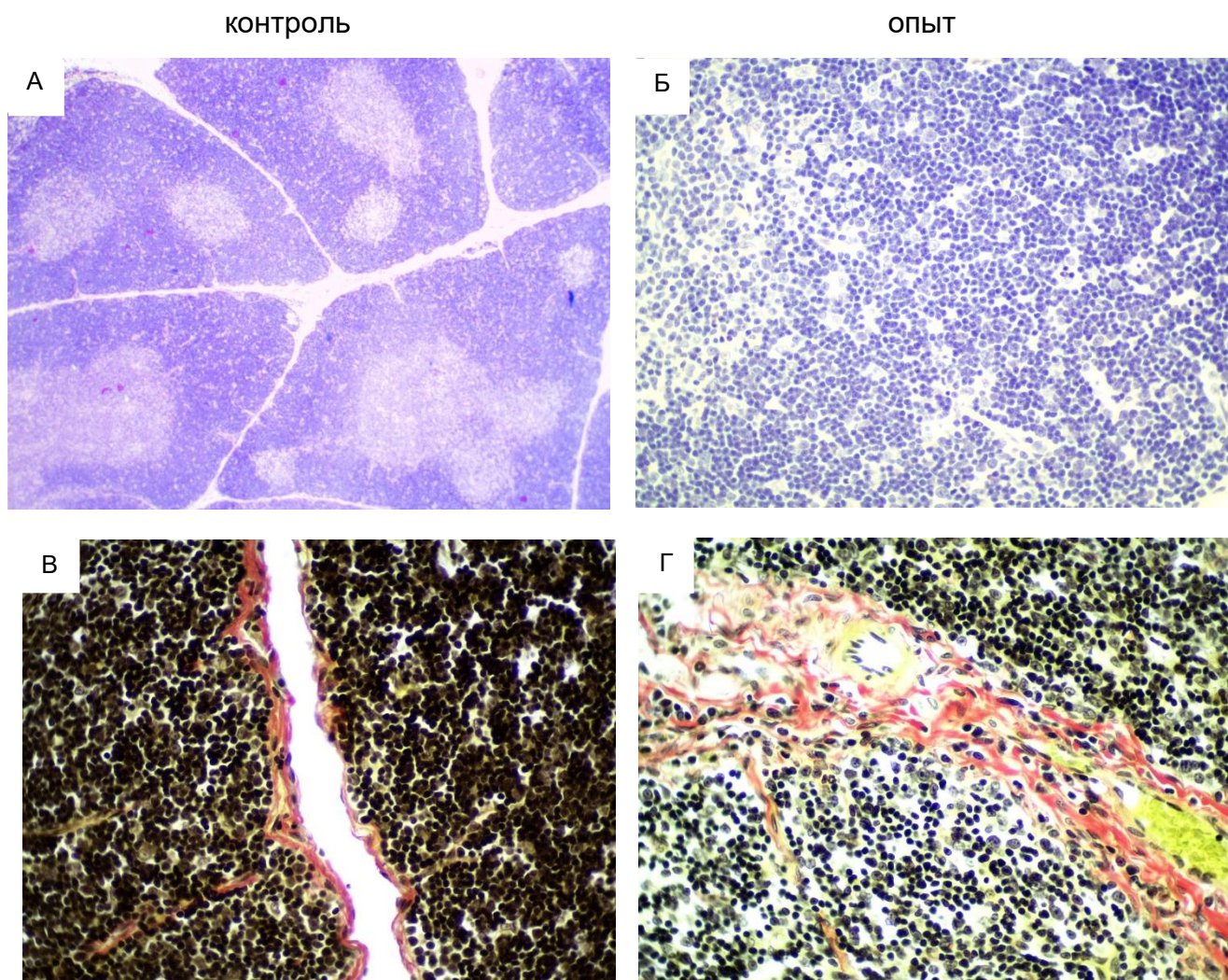


Рисунок 3. Тимус крыс контрольной и опытной групп животных. а, б — окраска гематоксилином-эозином. Ув. 40, 400. в, Г — Окраска по Ван Гизону. Ув. x100

Уменьшение плотности клеток за счет сокращения числа лимфоцитов в тимусе опытной группы животных вероятно связано с падением их пролиферативного потенциала, что нашло подтверждение в результатах оценки уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Иммуногистохимическое типирование позволило обнаружить, что в условиях воздействия НЧ TiO₂ наблюдается снижение числа Ki-67-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса ($p < 0,05$) (рис. 6, 7).

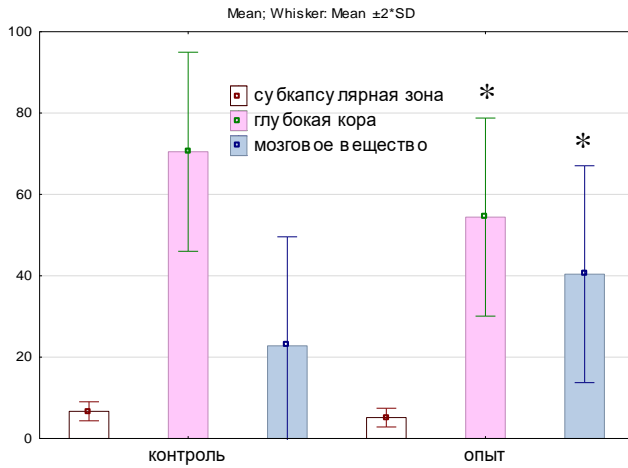


Рисунок 4. Относительная площадь морфофункциональных зон тимуса животных контрольной и опытной групп
* – здесь и далее на рисунках статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой

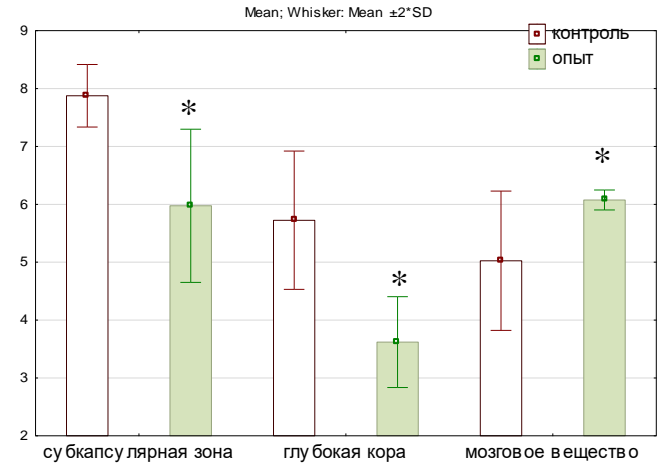


Рисунок 5. Абсолютное число клеток (на 100 мкм²) в морфофункциональных зонах тимуса животных контрольной и опытной групп

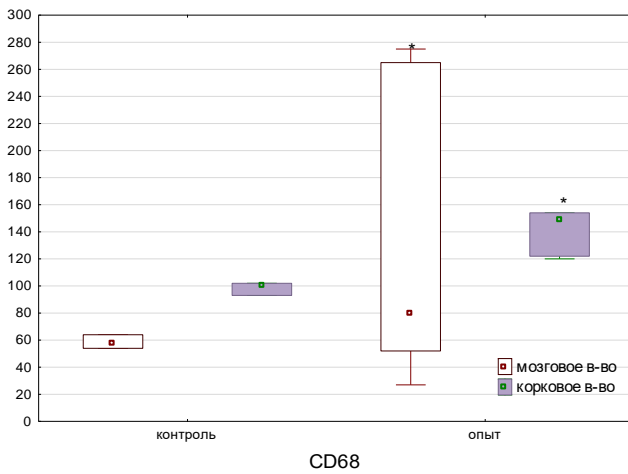
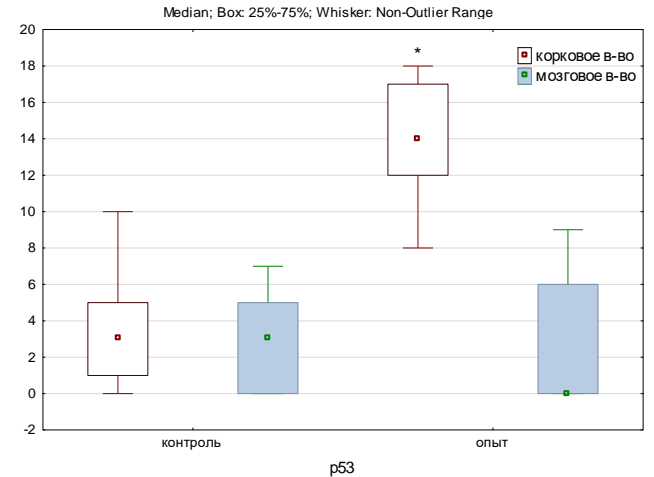
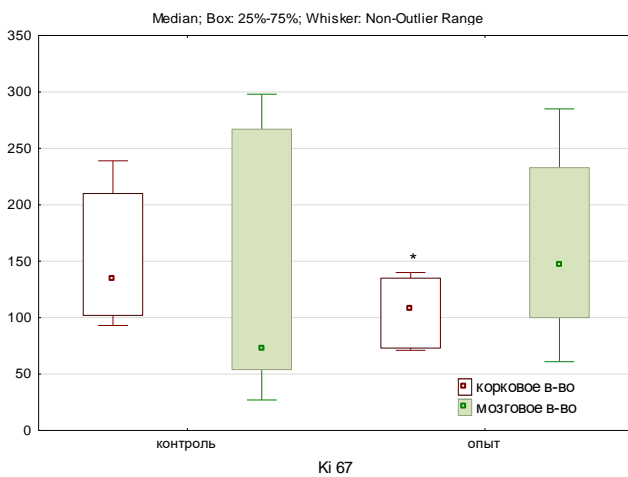


Рисунок 6. Среднее число Ki-67-, CD-68 – и p53-иммунопозитивных клеток на площади среза в тимусе крыс контрольной и опытной групп

На фоне воздействия НЧ TiO_2 количество клеток, экспрессирующих p53 в корковом веществе дольки тимуса опытной группы животных, значительно увеличилось по сравнению с аналогичным показателем интактных крыс, тогда как в мозговом веществе уровень экспрессии p53 остался примерно на прежнем уровне (рис. 6, 8), что нашло подтверждение в том числе и при изучении препаратов тимуса опытной группы животных, окрашенных гематоксилином эозином, где в дольках железы определялось увеличение клеток с признаками деструкции.

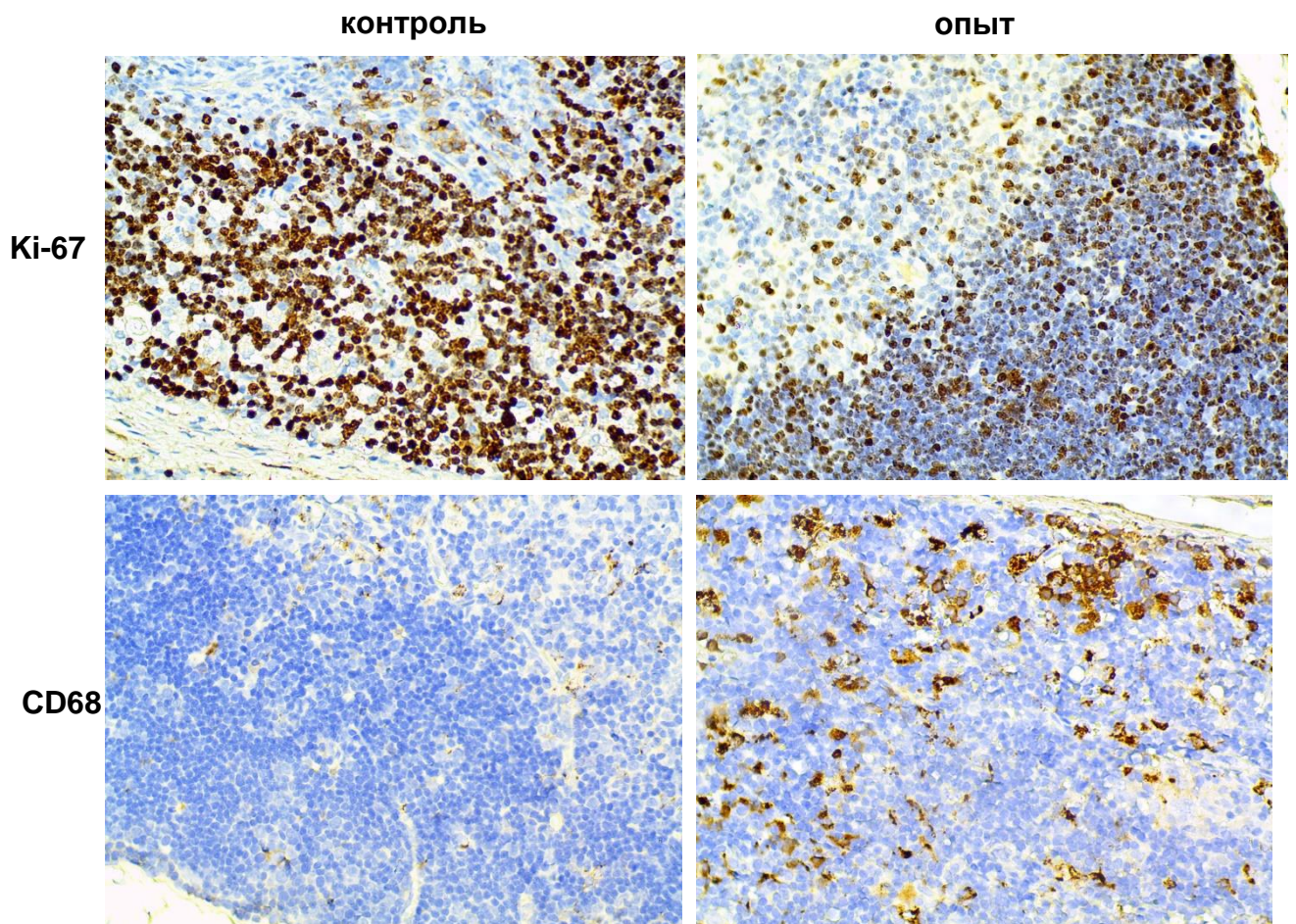


Рисунок 7. Тимус крысы контрольной и опытной групп животных. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к Ki-67, CD68. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув. x400

Важнейшим клеточным типом тимуса являются макрофаги, участвующие как в антигеннезависимой дифференцировке Т-лимфоцитов, так и в селекции плохо обученных клеток. Изменение количества макрофагов может свидетельствовать об эффективности функционирования тимуса. У животных опытной группы при иммуногистохимической оценке уровня экспрессии маркера макрофагов CD68 в тимусе выявлено увеличение количества макрофагов (рис. 6, 7): среднее число CD68-иммунопозитивных клеток в корковом веществе тимуса опытной группы увеличилось в 2,61 раза, а в мозговом веществе – в 1,35 раза.

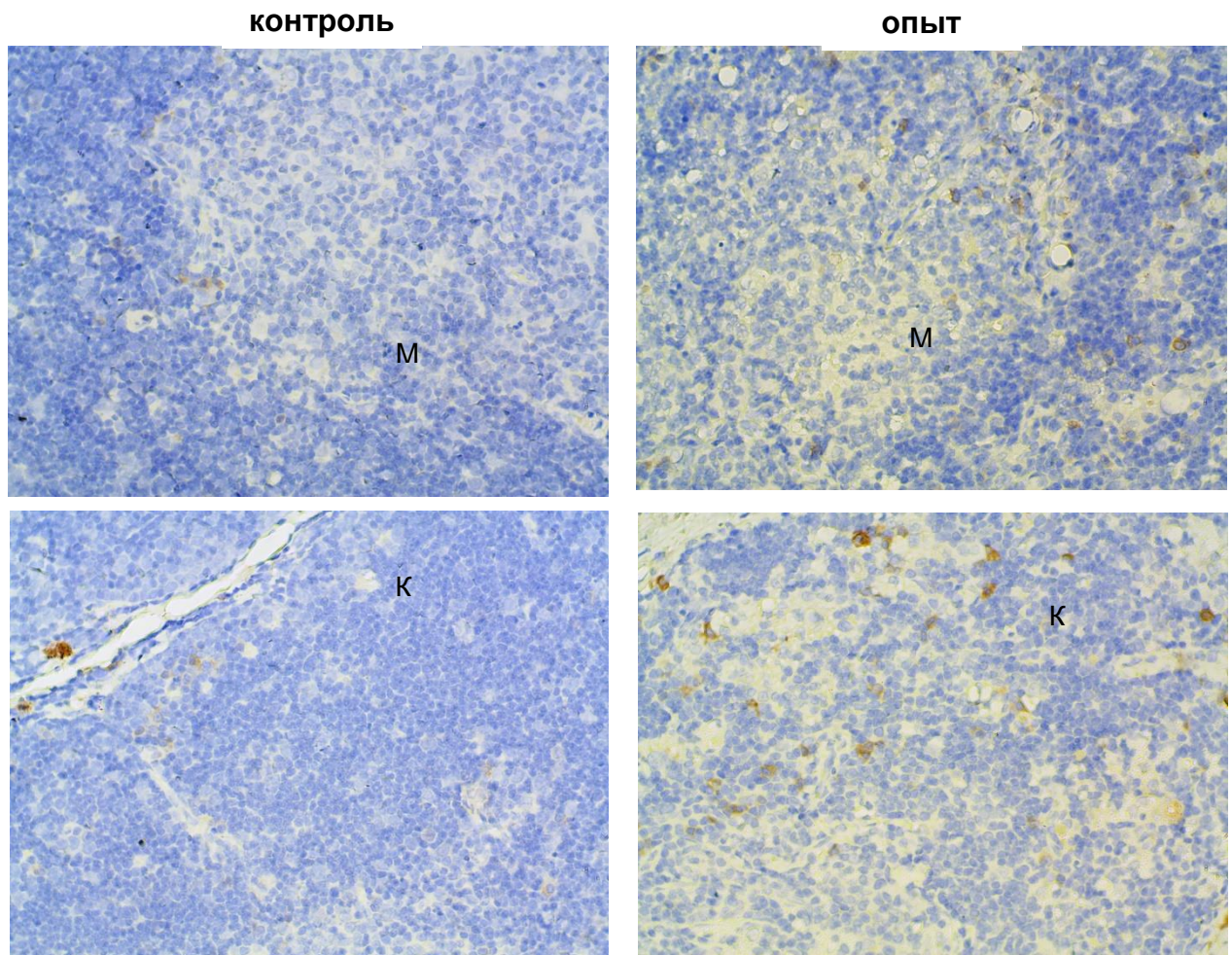


Рисунок 8. Тимус крысы контрольной и опытной группы животных. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к р53. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. К – корковое вещество, М – мозговое вещество. Ув. х400

Таким образом, нами установлено, что под воздействием НЧ TiO_2 в тимусе крыс определялись признаки акцидентальной инволюции со снижением объемной доли коркового вещества, усилением гибели лимфоцитов по пути апоптоза, снижением интенсивности пролиферации клеток, приводящее к падению численности лимфоцитов в тимусе с одновременным возрастанием содержания CD68^+ макрофагов. Уменьшение числа лимфоцитов в корковом веществе тимуса в конечном итоге может привести к сокращению их популяции и в периферической крови, что было показано нами при исследовании соотношения разных видов лейкоцитов (лейкоцитарного профиля) крови крыс на фоне перорального введения НЧ TiO_2 , результаты которого описаны ниже.

3.1.2 Морфологическая характеристика селезенки

Изучение препаратов, окрашенных гематоксилином эозином, показало, что селезенка крыс контрольной группы имело нормальное строение (рис. 9). Снаружи она покрыта равномерной по всему периметру капсулой, состоящей из плотной волокнистой соединительной ткани, эластических волокон и гладкомышечных клеток. От капсулы внутрь селезёнки, перпендикулярно, отходят трабекулы, представленные волокнистой соединительной и гладкой мышечной тканями.

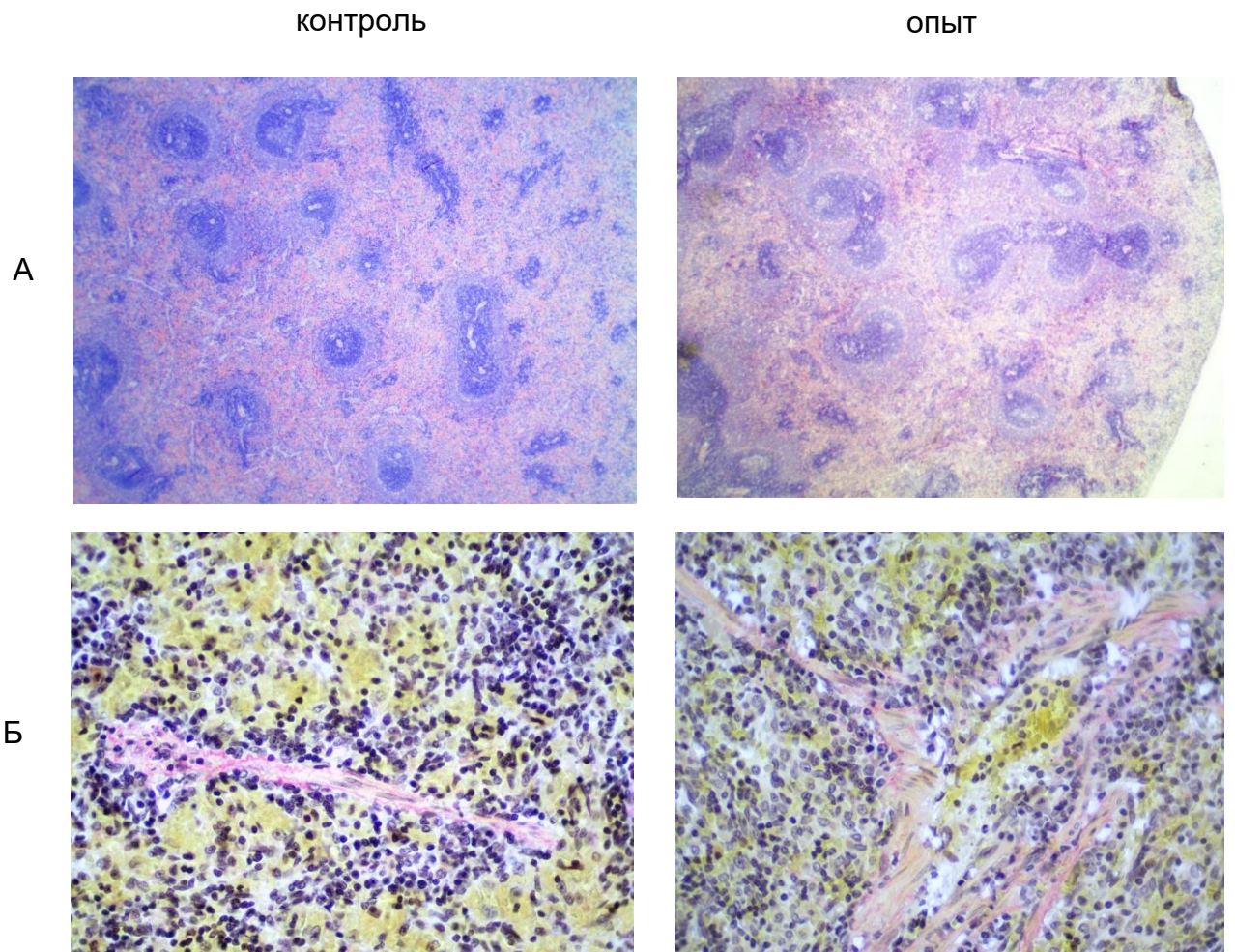


Рисунок 9. Селезенка крыс контрольной и опытной группы. а — окраска гематоксилином-эозином. Ув. х40; б — окраска по Ван-Гизону. Ув. х400

По данным морфометрического исследования относительные площади красной и белой пульпы составляли $28,54 \pm 1,06\%$ и $71,46 \pm 0,93\%$ соответственно (рис. 11). Структурные компоненты красной и белой пульпы хорошо определялись

благодаря разной плотности расположения в них клеточных элементов. Белая пульпа включала лимфоидную ткань в виде первичных и вторичных лимфоидных узелков (В-зона) с узкими герминативными центрами; периартериальные лимфодные муфты (ПАЛМ, Т-зона), которые окружали пульпарные артерии и маргинальную зону. Относительная площадь указанных зон представлена в табл. 5. Среди лимфоидных узелков преобладали узелки с центрами размножения (герминативные центры), занимающие $27,70 \pm 0,86\%$ площади среза. Красная пульпа селезенки крыс интактных животных также образована ретикулярной тканью с расположенными в ней форменными элементами крови, которые придают ей такой цвет, макрофагами и содержит большое количество кровеносных сосудов.

В селезенке животных опытной группы выявлены существенные морфологические изменения по сравнению с интактными животными (рис. 9, 10). У животных опытной группы белая пульпа была представлена лимфоидными узелками с широкими герминативными центрами. По периферии лимфоидных узелков, на границе белой и красной пульпы маргинальная зона была выражена слабее, чем у контрольной группы животных.

Морфометрический анализ ткани селезенки выявил увеличение площади, занимаемой белой пульпой по сравнению с контролем на $11,67\%$ ($p < 0,05$). В белой пульпе селезенки крыс экспериментальных животных обнаружено увеличение общего количества лимфоидных узелков на $47,22\%$ по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы животных ($p < 0,05$) (рис. 12). Вторичные лимфоидные узелки характеризовались опустошением герминативных центров и увеличением их относительной площади (рис. 13). В ПАЛМ в селезенки опытной группы животных уменьшилась плотность расположения клеток на единицу площади (рис. 14), что может косвенно свидетельствовать об уменьшении их поступления из тимуса. При исследовании мантийной зоны лимфоидных узелков селезенки экспериментальных животных было выявлено снижение абсолютного числа клеток на единицу площади, что, возможно, связано с угнетением пролиферации лимфоцитов (рис. 14).

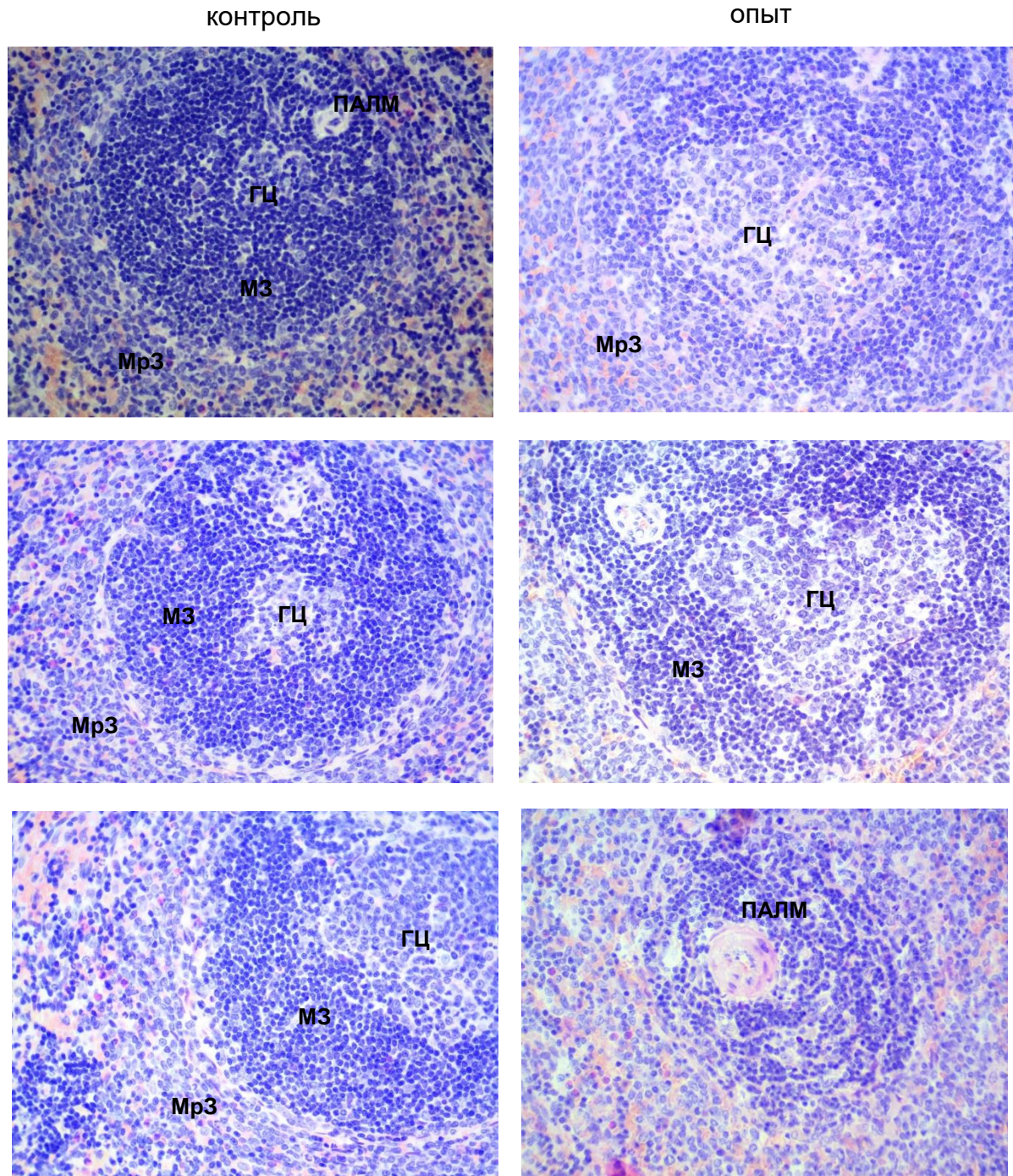


Рисунок 10. Лимфоидный узелок селезенки контрольной и опытной группы животных. Об.: ГЦ — герминативный центр, М3 — мантийная зона, Mr3 — маргинальная зона, ПАЛМ — периартериальная лимфоидная муфта. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. х400

**Относительная площадь зон белой пульпы селезенки
контрольной и опытной группы животных (M±Sd)**

Зоны	Контроль	Опыт
Лимфоидные узелки (% от площади среза):		
-первичные	4,54±0,67	4,93±0,25*
-вторичные	27,70±0,86	21,51±1,58*
Герминативные центры	5,88±0,61	11,54±0,73*
Мантйная зона	28,62±1,47	24,4±0,46*
Маргинальная зона	50,20±1,78	46,80±1,33*
ПАЛМ	14,05±0,64	16,36±0,52*

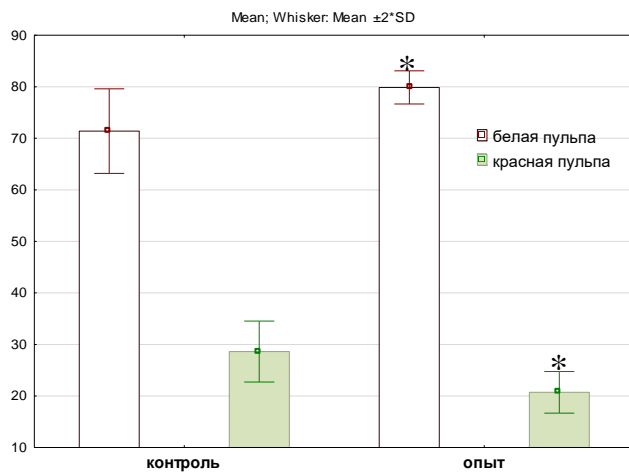


Рисунок 11. Соотношение белой и красной пульпы селезенки животных контрольной и опытной групп

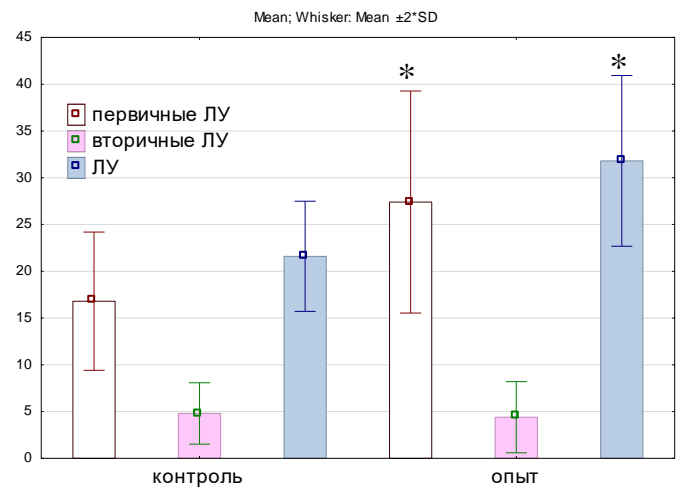


Рисунок 12. Среднее число первичных и вторичных лимфоидных узелков белой пульпы селезенки и их общее число (ЛУ) у животных контрольной и опытной групп

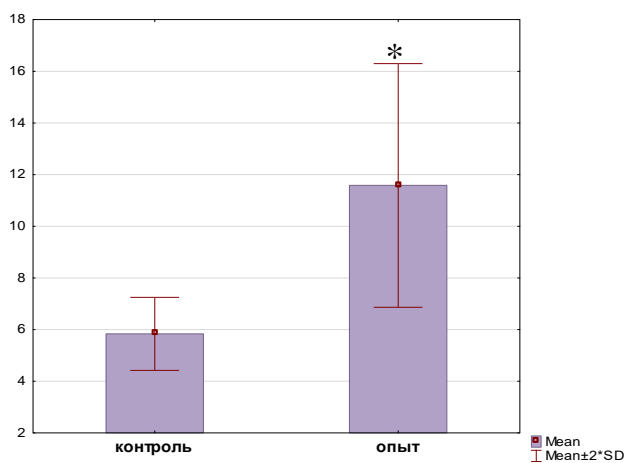


Рисунок 13. Относительная площадь герминативного центра лимфоидных узелков селезенки крыс контрольной и опытной групп

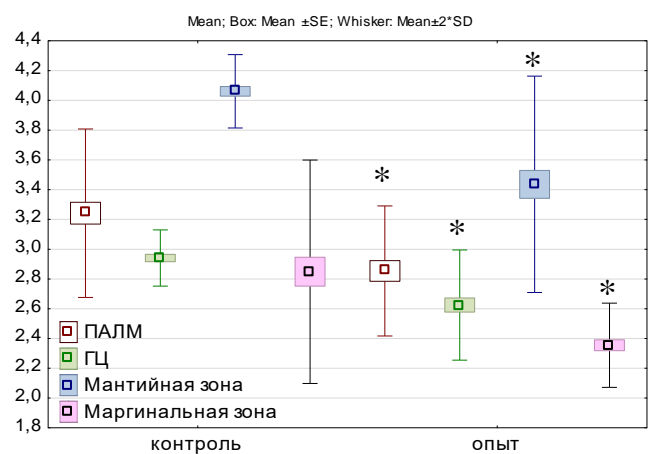


Рисунок 14. Абсолютное число клеток на единицу площади в зонах белой пульпы селезенки крыс контрольной и опытной групп

Площадь маргинальной зоны в селезенке опытных животных уменьшалась незначительно, а абсолютное число клеток, приходящихся на единицу площади снижалась на 17,54% ($p < 0,05$). Снижение плотности расположения клеток в этой зоне, возможно, является следствием уменьшения миграции незрелых лимфоцитов из тимуса в селезенку. Известно, что именно маргинальная зона участвует в иммунном ответе, являясь местом захвата антигенов и иммунных комплексов из крови, здесь происходит кооперация и взаимодействие этих клеток, активация В-лимфоцитов и их дальнейшая дифференцировка в плазматические клетки (Cesta M.F., 2006). Обнаруженное нами разрежение клеток в селезенке экспериментальных животных может в конечном итоге привести к нарушению их взаимодействия с антигенами, дифференцировки В-лимфоцитов, уменьшению числа плазматических клеток, продуцирующих антитела, а, следовательно, к снижению интенсивности гуморального иммунного ответа.

Проведенное нами иммуногистохимическое исследование активности пролиферативных процессов (рис. 15, 16) показало снижение Ki-67⁺ клеток во всех структурно-функциональных зонах белой пульпы селезенки после воздействия НЧ TiO₂ с одновременным увеличением содержания клеток, в которых выявлялся маркер апоптоза p53 (рис. 18, 19). При иммуногистохимическом окрашивании селезенки антителами к PCNA были получены аналогичные результаты, свидетельствующие о снижении пролиферативной активности клеток.

При иммуногистохимическом выявлении маркера мононуклеарной макрофагической системы CD68 в ткани селезенки контрольных животных было выявлено, что наибольшее число CD68⁺ клеток в поле зрения выявляется в красной пульпе. В белой пульпе селезенки животных контрольной группы содержание CD68⁺ клеток относительно не велико. Нами обнаружено, что под влиянием НЧ TiO₂ уровень экспрессии CD68-иммунопозитивных клеток в красной пульпе селезенки крыс опытной группы увеличивается на 32,17%, тогда как в герминативном центре и маргинальной зоне значительно уменьшается ($p < 0,05$) (рис. 16, 17).

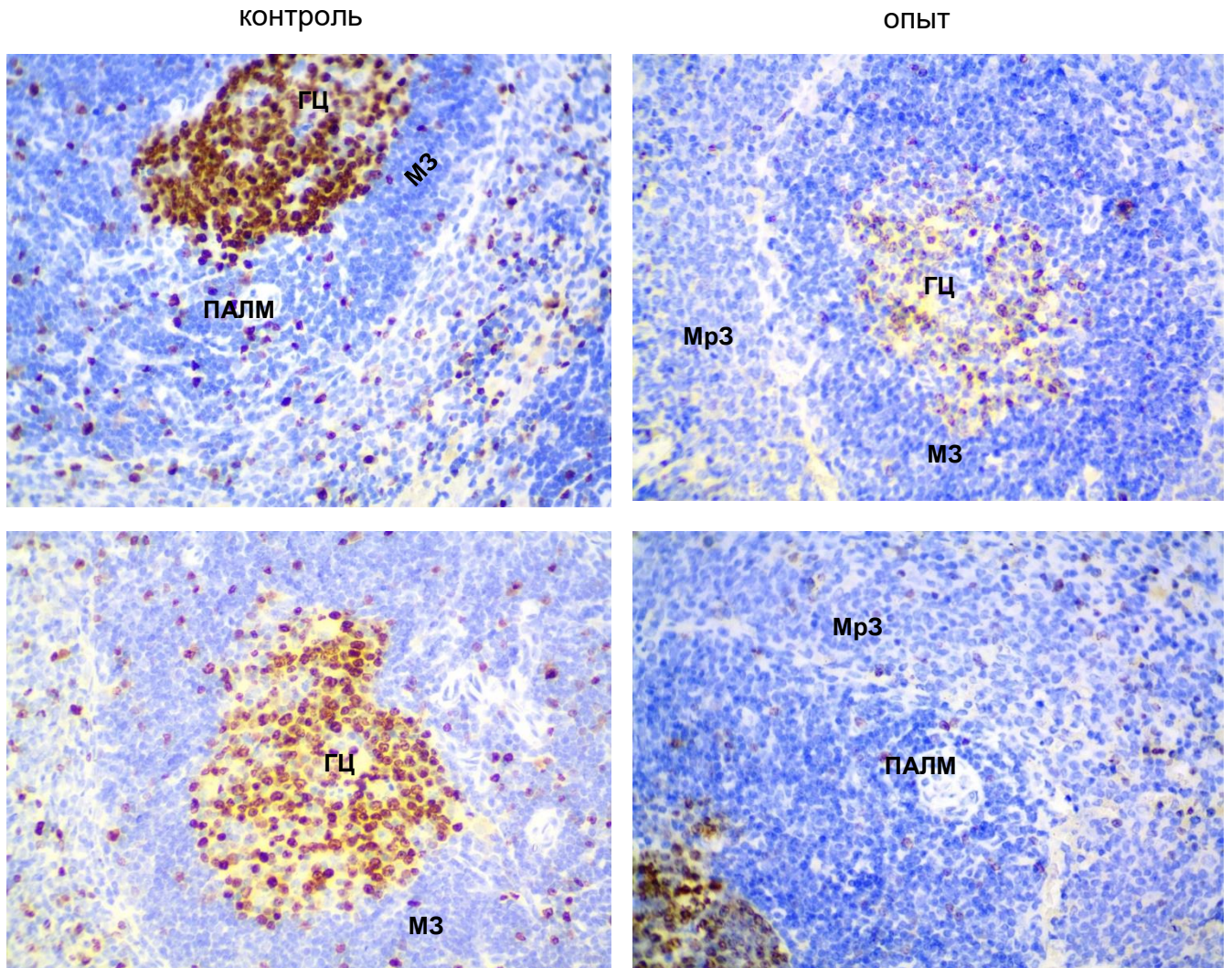


Рисунок 15. Селезенка крыс контрольной и опытной группы. Об.: ГЦ- герминативный центр лимфоидного узелка, МЗ – мантийная зона, МрЗ – маргинальная зона, ПАЛМ – периартериальная лимфоидная муфта. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (Ki – 67). Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.х400

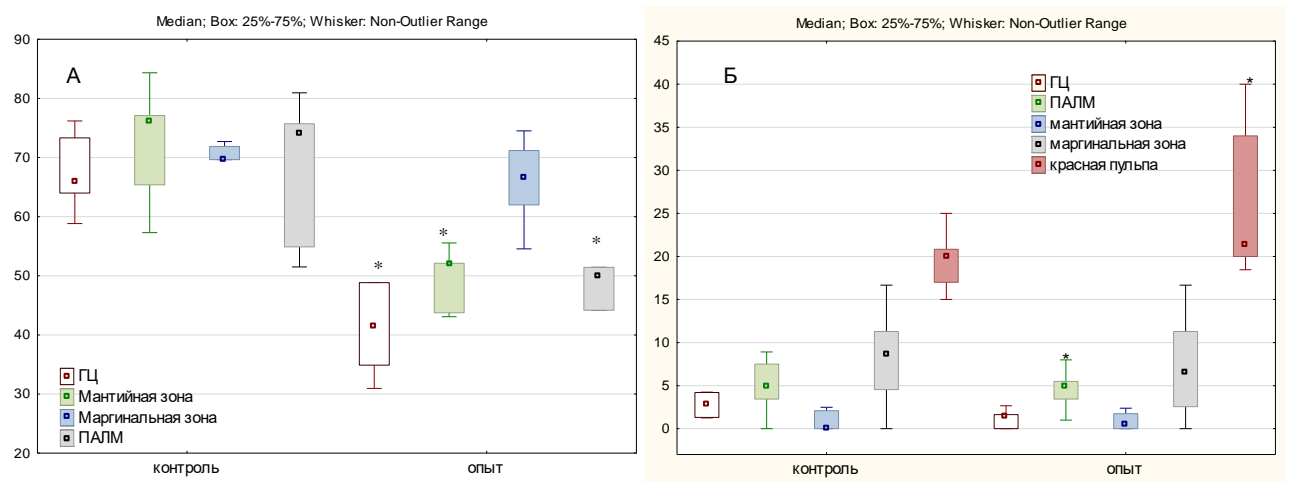


Рисунок 16. Доля Ki-67 (а), среднее число CD68- (б) иммунопозитивных клеток на единицу площади в селезенке животных контрольной и опытной групп

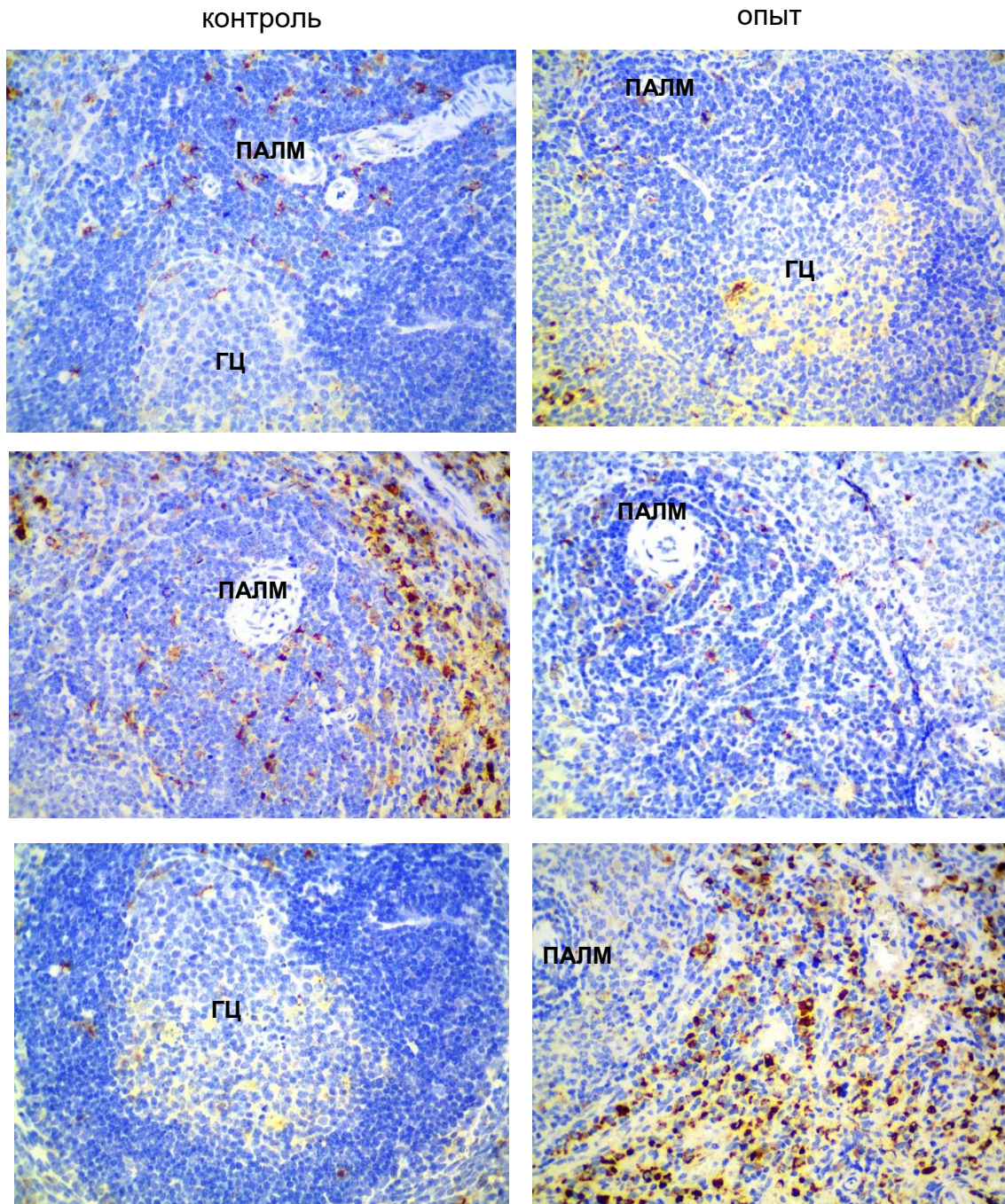


Рисунок 17. Селезенка крыс контрольной и опытной группы. Об.: ГЦ — герминативный центр лимфоидного узелка, ПАЛМ — периартериальная лимфоидная муфта. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к маркеру макрофагов CD68. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.х400

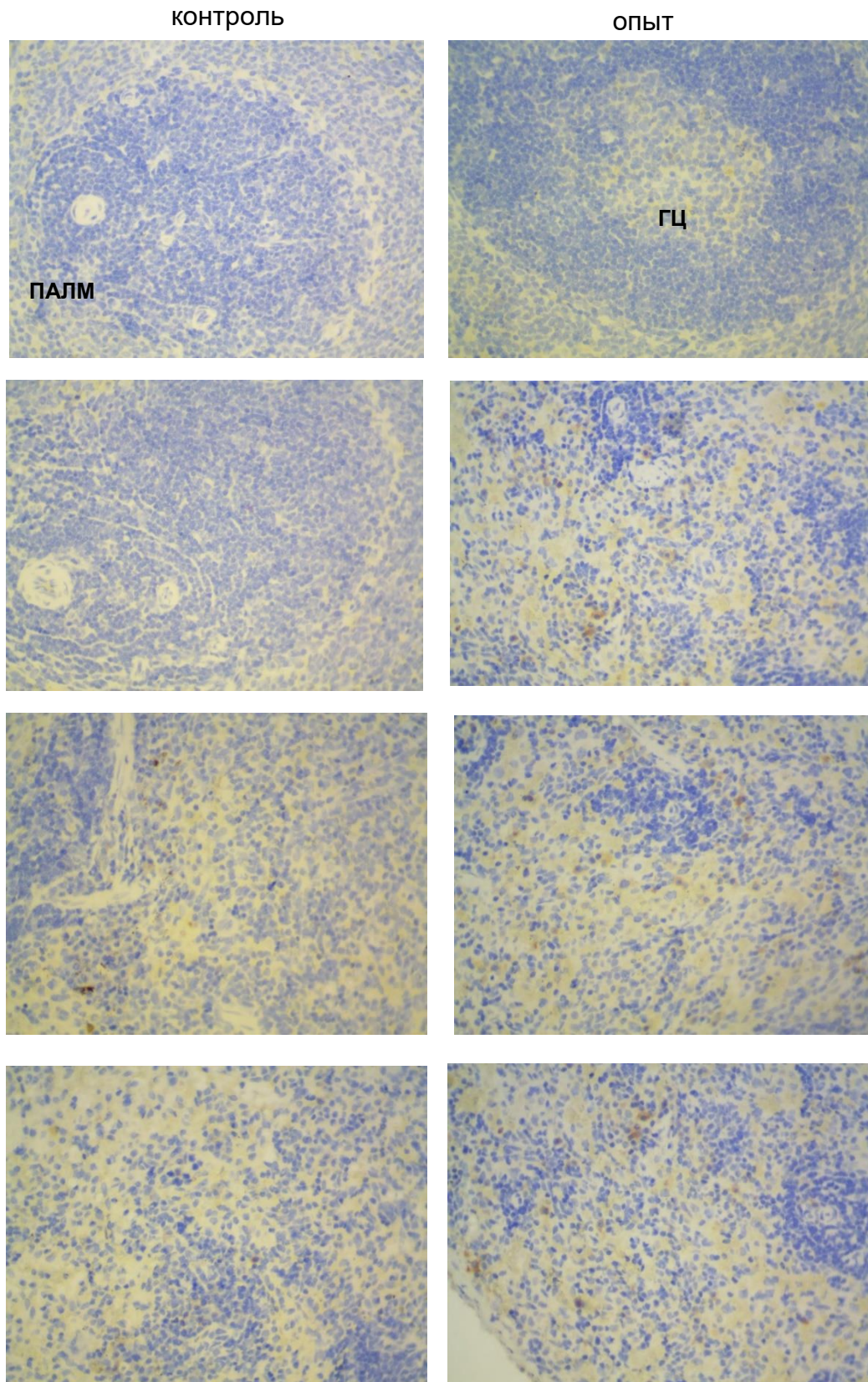


Рисунок 18. Селезенка крыс контрольной и опытной группы. Об.: ГЦ — герминативный центр лимфоидного узелка, ПАЛМ — периартериальная лимфоидная муфта. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к p53. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.х400

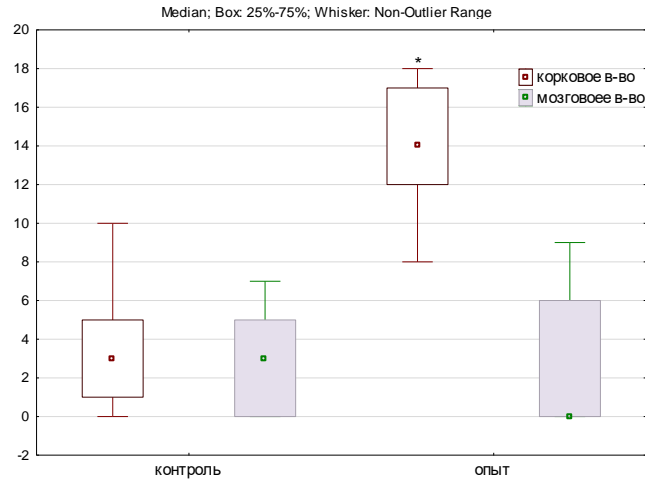


Рисунок 19. Среднее число p53 – иммунопозитивных клеток на единицу площади в селезенке животных контрольной и опытной групп

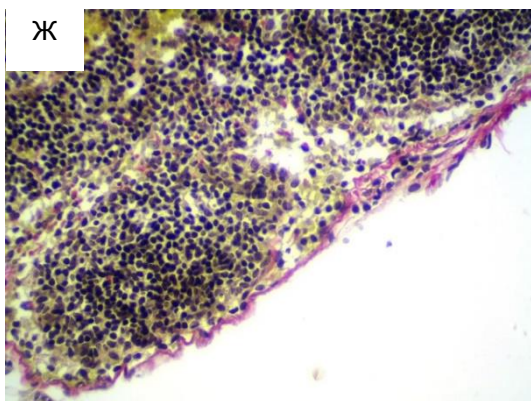
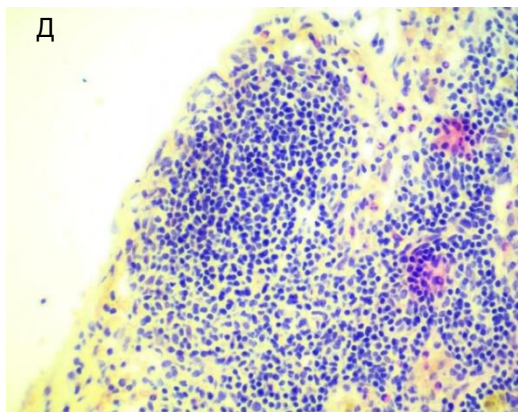
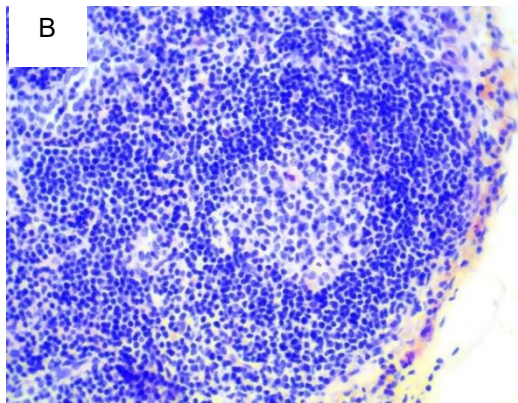
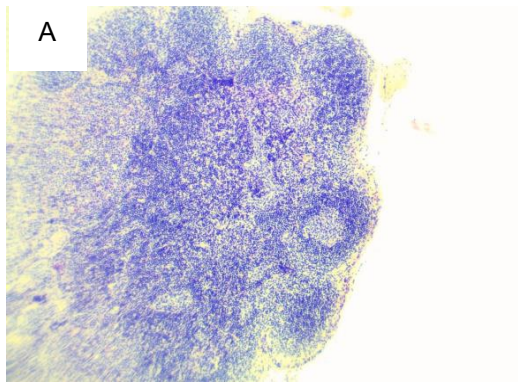
Таким образом, при пероральном введении НЧ TiO_2 в селезенке крыс наблюдается редукция белой пульпы с уменьшением абсолютного количества клеток и плотности их расположения, обусловленная снижением пролиферативного потенциала клеток и повышением активности апоптоза, гиперпластическая реакция с расширением герминативных центров лимфоидных узелков (атрофия В-зон), увеличением числа макрофагов в красной пульпе.

3.1.3 Морфологическая характеристика поверхностных шейных лимфатических узлов

У животных контрольной группы строение поверхностных лимфатических узлов шеи соответствовало нормальному, какие-либо реактивные изменения отсутствовали (рис. 20). Кортковое вещество образовано первичными и вторичными лимфоидными узелками с герминативными центрами, а также межфолликулярной зоной лимфоцитов. Паракортикальная зона плотно заселена лимфоцитами. Мозговое вещество представлено лимфоцитами, плазмócитами, макрофагами, ретикулярными клетками, коллагеновыми и ретикулярными волокнами, макрофагами стромы. В краевом и мозговых синусах обнаруживались лимфоциты и макрофаги.

В поверхностных шейных лимфатических узлах животных опытной группы, несмотря на сохранность основных структурно-функциональных зон, лимфоидные узелки отличались широкими герминативными центрами по сравнению с животными контрольной группы (рис. 20). По данным морфометрического исследования, число вторичных лимфоидных узелков возросло на 35,38%, при этом площадь их герминативных центров увеличилась на 28,08% (рис. 21, 22). В герминативных центрах лимфоидных узелков и в паракортикальной области повысилось абсолютное количество клеток, приходящихся на единицу площади (рис. 24).

контроль



опыт

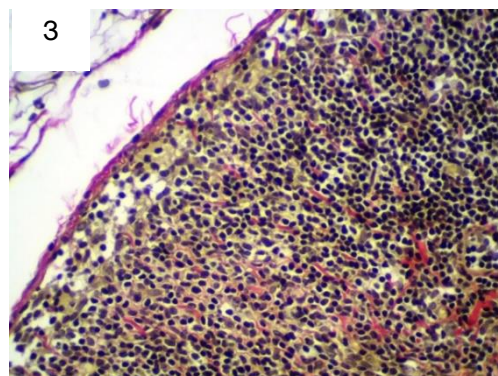
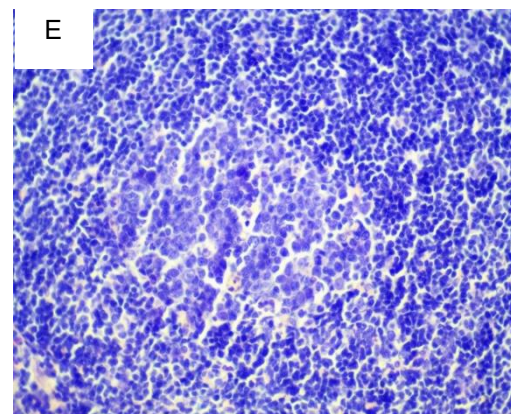
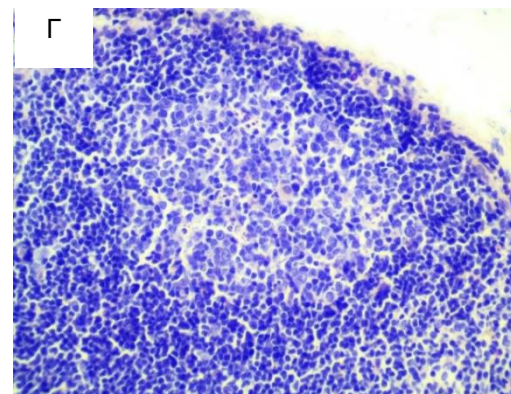
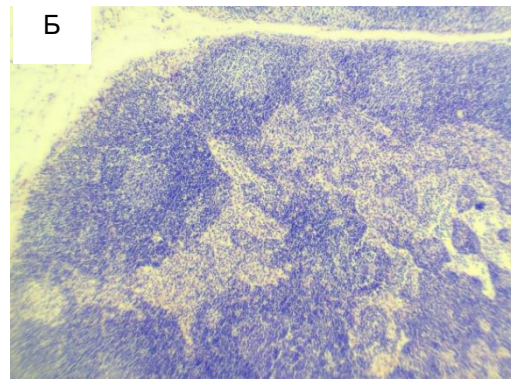


Рисунок 20. Поверхностные шейные лимфатические узлы контрольной и опытной группы: а – е – окраска гематоксилином эозином (а, б – ув. х40; в – е – ув.х400); ж, з – окраска по Ван Гизону (ув.х400)

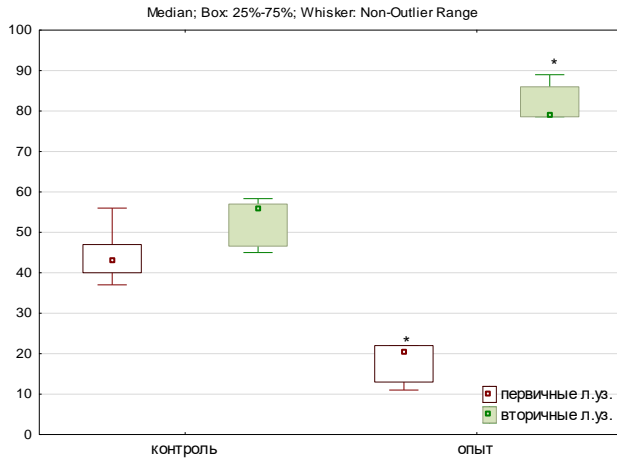


Рисунок 21. Доля первичных и вторичных лимфоидных узлов в поверхностных шейных лимфатических узлах крыс

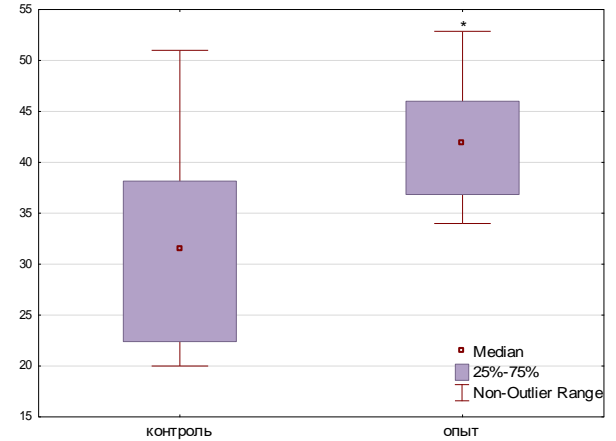


Рисунок 22. Относительная площадь, занимаемая герминативным центром во вторичных лимфоидных узелках поверхностных шейных лимфатических узлов крыс контрольной и опытной групп

Возможной причиной возрастания этого показателя может быть повышение уровня пролиферативной активности «местных» клеток, что и было нами обнаружено при иммуногистохимическом исследовании лимфатических узлов с типированием маркера пролиферации Ki-67. В герминативных центрах лимфоидного узелка и паракортикальной области выявлено увеличение числа Ki-67⁺ клеток на 30,59% и 44,09 % соответственно (рис. 23, 24). По мнению многих авторов, подобные изменения лимфатических узлов обусловлены антигенным воздействием и свидетельствуют об интенсивной миграции лимфоцитов в лимфатический узел и его высокой функциональной активности (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000; Бгатова Н.П. и др., 2014; Постовалова Е.А., 2016). Описанный комплекс изменений в структурно-функциональной организации поверхностных шейных лимфатических узлов может рассматриваться как усиление лимфоцитопоеза в В-зависимой зоне (центрах размножения) и в Т-зависимой паракортикальной зоне (Lennert K., 1982; Гао Ю. и др., 2018; Пауков В.С. и др., 2018).

Краевой и мозговые синусы расширены, количество клеточных элементов в них увеличено, и они представлены лимфоцитами и макрофагами с преобладанием

последних. Результаты иммуногистохимического типирования с помощью антител к маркеру макрофагов CD68 (рис. 25, 26) свидетельствуют о повышении числа макрофагов, за исключением герминативных центров и паракортикальной области, где их количество не отличается от показателей контрольной группы животных.

Указанные перестройки в шейных лимфатических узлах, вероятно, являются компенсаторно-приспособительными, связанными с необходимостью усиления процессов детоксикации при введении НЧ. Обнаруженное нами увеличение содержания макрофагов в лимфатических узлах сопряжено с их участием в межклеточных кооперациях при формировании иммунного ответа и при фагоцитозе собственных деструктивно измененных клеток (Петров Р.В., 1987; Серов В.В., Шехтер А.Б., 1981). По наблюдениям многих авторов увеличение числа макрофагов обнаруживается в лимфатических узлах, селезенке и тимусе в результате воздействия негативных факторов внешней среды и с точки зрения многих авторов, является стереотипной морфологической реакцией на антигенные воздействия лимфоидных органов, сопряженное с их участием в межклеточных кооперациях при формировании иммунного ответа и при фагоцитозе собственных деструктивно измененных клеток (Ерофеева Л.М., 2002; Григоренко Д. Е., Хребтовский А.М., 2006; Бгатова Н.П. и др., 2014; Пауков В.С. и др., 2018). Так, при исследовании влияния многократного введения наноразмерных частиц лития в структуре регионарного пахового лимфатического узла было обнаружено увеличение числа вторичных лимфоидных фолликулов, в которых возростала плотность макрофагов, значительное расширение краевого и мозговых синусов. В совокупности эти признаки свидетельствуют о возрастании дренажной и детоксикационной функции этого лимфоидного органа при воздействии НЧ лития (Бгатова Н.П. и др., 2014).

Таким образом, в поверхностных шейных лимфатических узлах при пероральном введении НЧ TiO_2 , по данным морфологического анализа, выявляется гиперплазия коркового вещества и выраженная макрофагальная реакция в синусах. Нами показано, что в этих зонах сохраняется пролиферативная активность клеток,

которая превосходит контрольные значения, что свидетельствует об активации В-звена иммунного ответа у опытной группы животных.

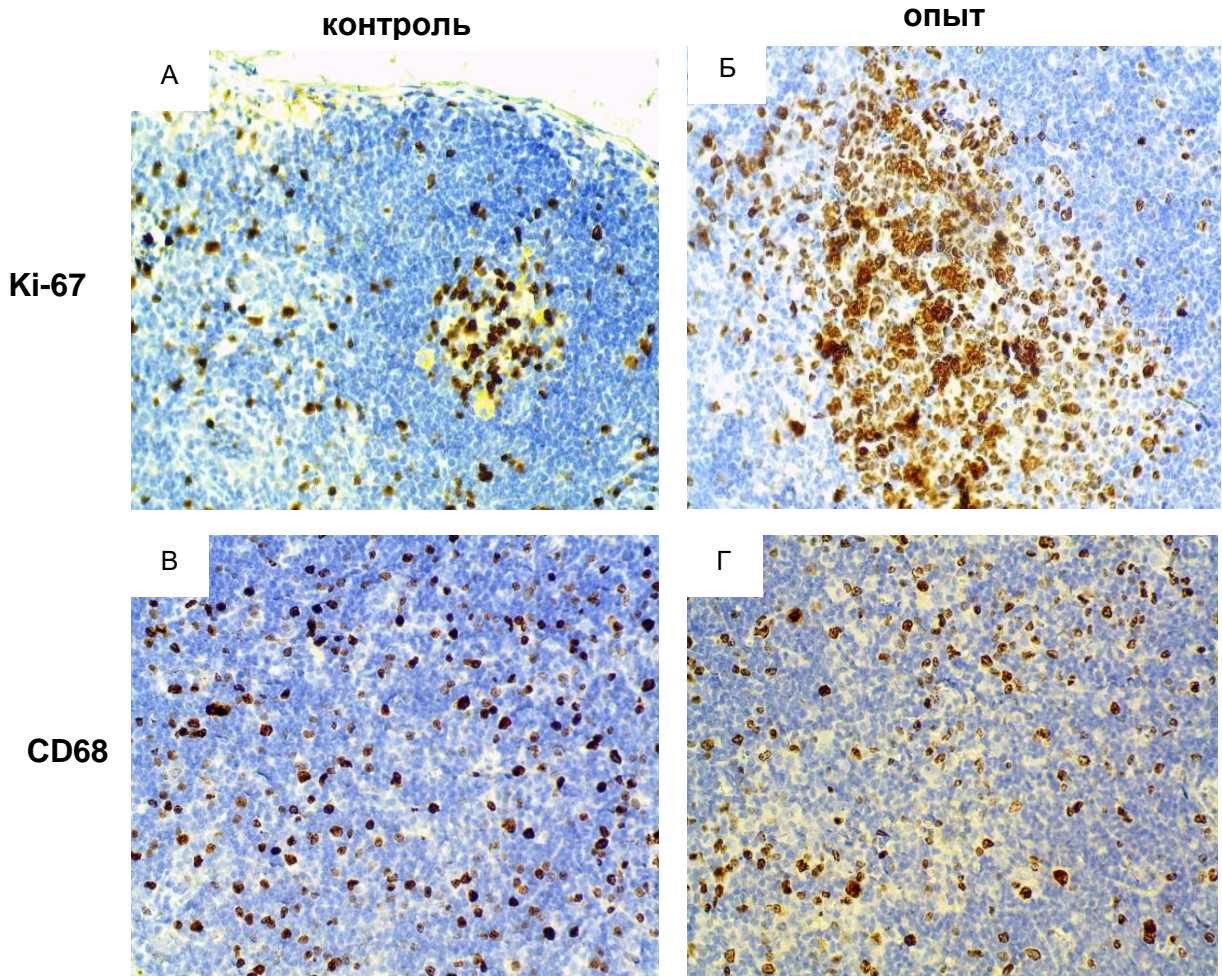


Рисунок 23. Поверхностный шейный лимфатический узел крыс контрольной и опытной групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к Ki-67 (а, б — ГЦ), CD68 (в, г — междузелковая часть). Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув. x400

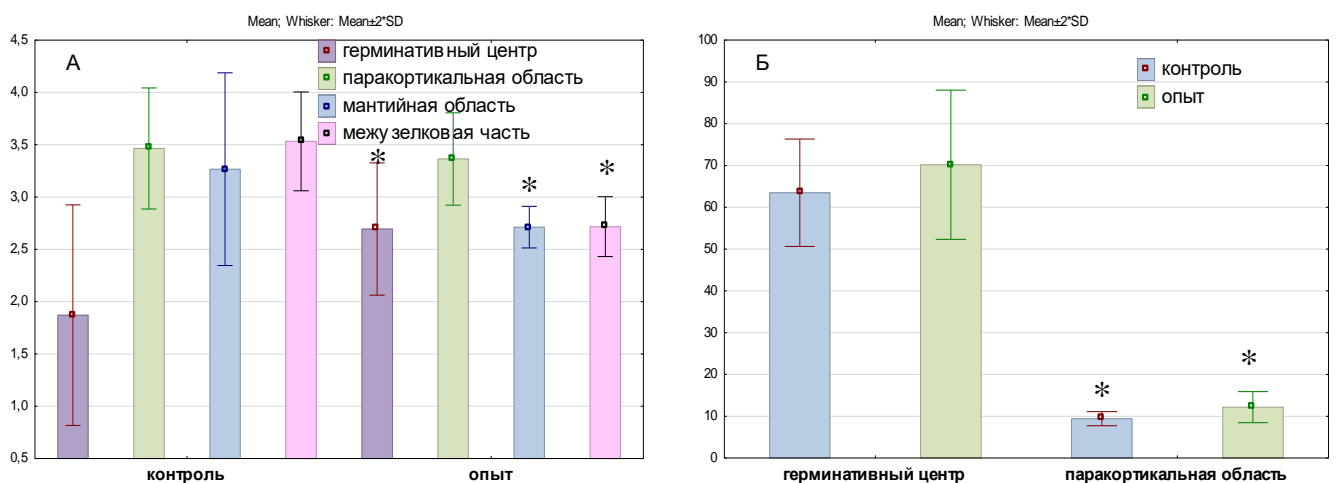


Рисунок 24. Абсолютное число клеток на единицу площади в структурно-функциональных зонах лимфатического узла (а); доля Ki-67⁺ клеток в герминативных центрах и паракортикальной области лимфоидных узлов лимфатического узла крыс контрольной и опытной групп (б)

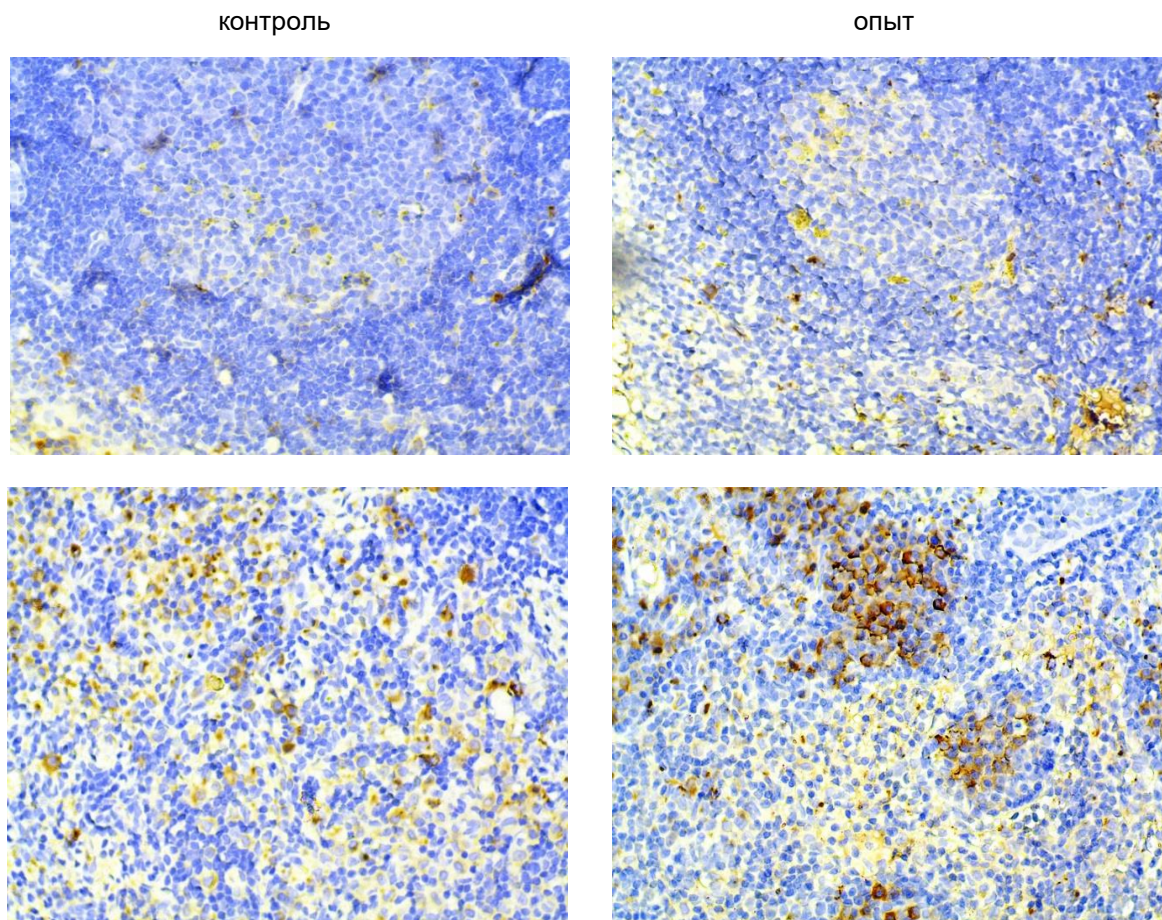


Рисунок 25. Поверхностный шейный лимфатический узел крыс контрольной и опытной групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к CD68. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.х400

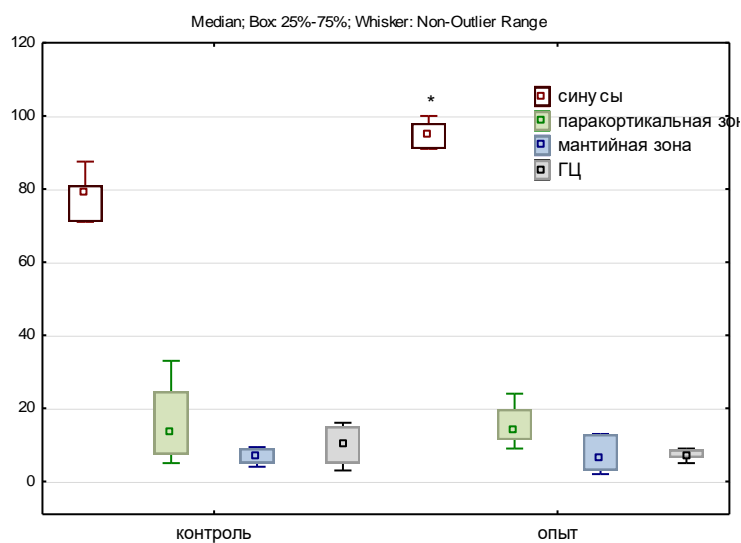


Рисунок 26. Доля CD68+—иммунопозитивных клеток в различных функциональных зонах лимфатического узла крыс контрольной и опытной групп животных

3.2 Показатели крови человека и крысы в условиях воздействия наночастиц диоксида титана

3.2.1 Нейтрофилы крови человека после воздействия наночастиц диоксида титана в условиях in vitro, по данным атомно-силовой микроскопии

Поскольку кровь как специфическая ткань является ключевой в развитии всех видов иммунитета и, по сути, является частью иммунной системы, то любые токсические воздействия на организм неизбежно будут проявляться в изменении ее показателей. В первую очередь это касается тех форменных элементов, функции которых напрямую связаны с поглощением различных чужеродных агентов, а последствия такого фагоцитоза для этих клеток часто являются фатальными. Мы решили на модели *in vitro* исследовать результаты такого контакта самых многочисленных фагоцитирующих клеток организма - нейтрофилов с НЧ TiO_2 с помощью высокоразрешающей атомно-силовой микроскопии (АСМ), ибо сведений о том, какие цитотоксические эффекты вызывают эти НЧ практически нет. Для решения этой проблемы, мы проанализировали ключевые морфологические характеристики (диаметр, высота клетки, шероховатость, жесткость) нейтрофилов крови на фоне воздействия НЧ TiO_2 с помощью АСМ.

Результаты АСМ-сканирования нейтрофилов крови показали, что в контрольных образцах присутствуют нейтрофилы округлой формы, с ровными краями, преимущественно имеющие сегментированное ядро, расположенное асимметрично (рис. 27). Поверхность нейтрофилов характеризуется незначительными инвагинациями. Нейтрофилы, подвергнутые воздействию НЧ, имели неровные контуры, просматривались выраженные псевдоподии (рис. 28).

Результаты оценки морфометрических параметров (табл. 6) показали, что на фоне прямого воздействия НЧ TiO_2 средний диаметр нейтрофилов незначительно уменьшается ($p > 0,05$), тогда как средняя высота клеток увеличивается.

Наряду с изменением морфометрических параметров клеток на фоне воздействия НЧ TiO_2 происходит и изменение особенностей поверхности

нейтрофилов, и в частности увеличение степени её шероховатости. Сканирование клеток с помощью АСМ позволило выявить, что на поверхности нейтрофилов, обработанных НЧ TiO_2 , определяются многочисленные инвагинации. Визуальный анализ был подтвержден и результатами измерения максимальной, минимальной высоты клетки и максимального их перепада. Оказалось, что указанные параметры значительно выше у клеток опытной группы, что позволяет сделать вывод о большей шероховатости их поверхности по сравнению с интактными нейтрофилами (табл. 6). Результаты наших исследований согласуются с имеющимися в литературе данными о существенном изменении морфологии клеток в результате воздействия НЧ, заключающиеся в неровной, «ячеистой» микроструктуре поверхности и ее деформации (Katsnelson V. et al., 2010; Плескова С. и др., 2017). Известно, что при осуществлении фагоцитоза происходит плотный контакт между клеткой и фагоцитируемым агентом с формированием эндосомы, что сопровождается изменением топографии поверхности нейтрофилов и приводит к появлению инвагинаций. Таким образом, увеличение шероховатости нейтрофилов можно считать маркером их фагоцитарной активности (Privalova L. et al., 2014).

Т а б л и ц а 6

**Морфометрические параметры, модуль Юнга нейтрофилов крови
до и на фоне воздействия НЧ TiO_2 ($M \pm Sd$)**

параметры	контроль	НЧ TiO_2
диаметр, <i>мкм</i>	16,3±3,45	14,08±2,16
средняя высота клетки относительно подложки, <i>мкм</i>	0,57±0,3	0,89±0,25*
минимальная высота, <i>мкм</i>	0,39±0,05	0,46±0,09*
максимальная высота, <i>мкм</i>	1,05±0,1	1,29±0,3*
максимальный перепад высот, <i>мкм</i>	0,66±0,03	0,83±0,02*
модуль Юнга, <i>кПа</i>	5,44±1,78	12,03±2,37*

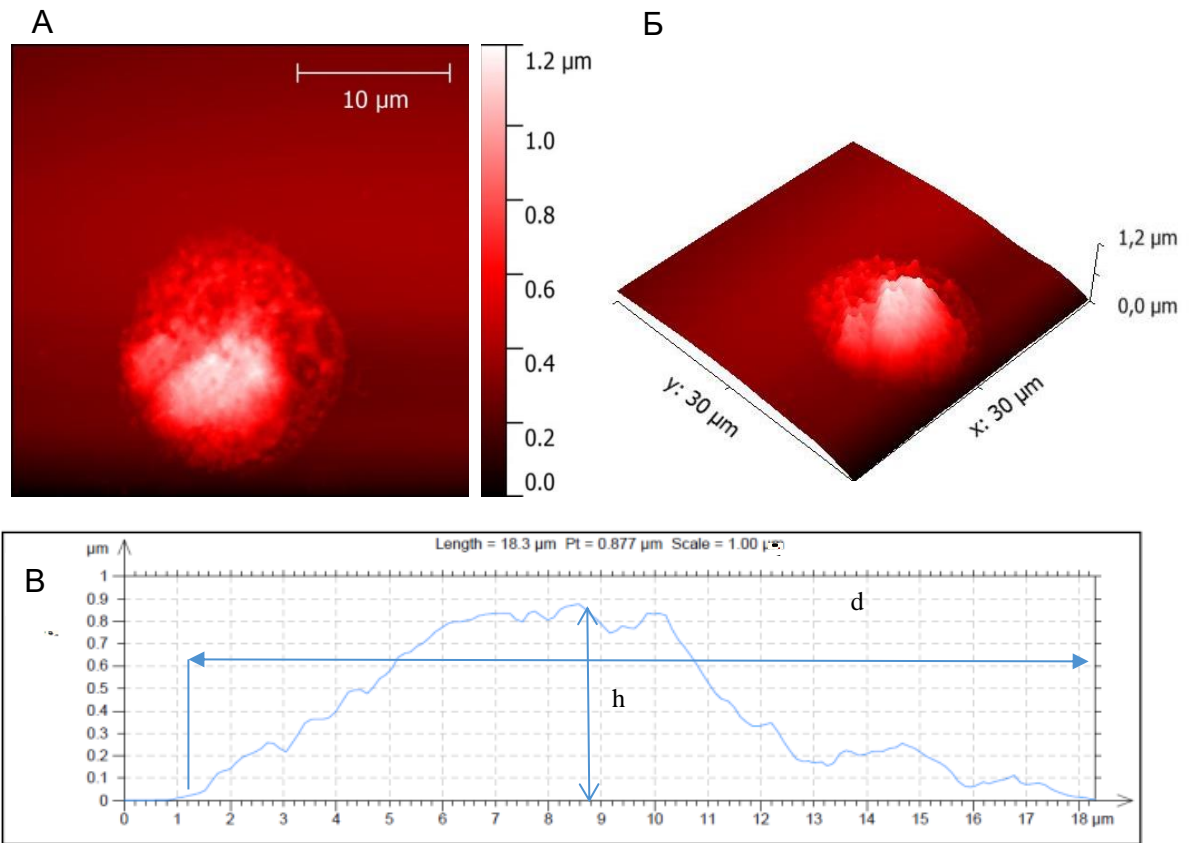


Рисунок 27. Нейтрофил контрольной группы. а - топография нейтрофила, полученная на АСМ, б – изображение в 3D, в – линейные параметры нейтрофилов, определяемые на кривой бокового профиля: h – высота клетки относительно подложки, d – диаметр клетки

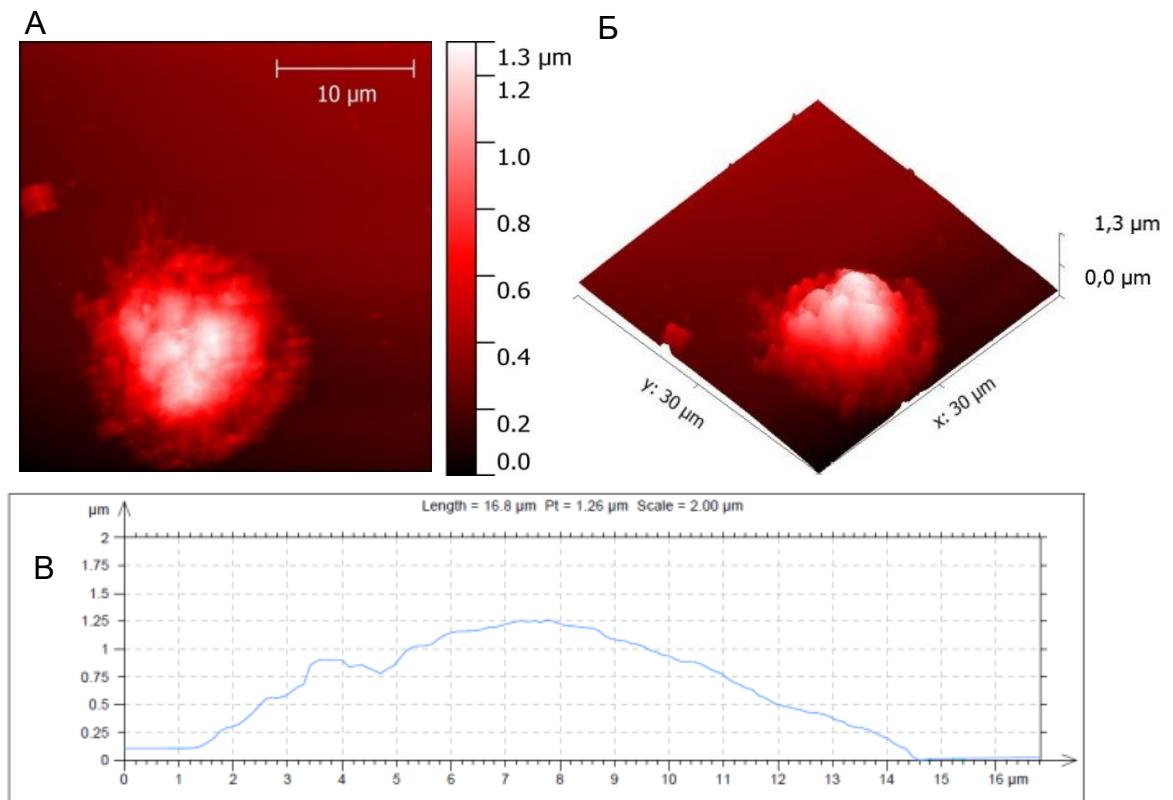


Рисунок 28. Нейтрофил опытной группы (НЧ TiO_2). а - топография нейтрофила, полученная на АСМ, б – изображение в 3D, в – кривая бокового профиля

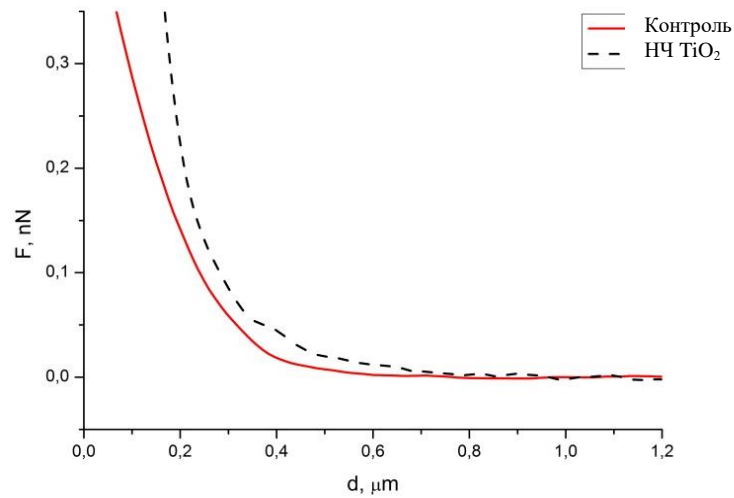


Рисунок 29. Силовые кривые подвода зонда АСМ к поверхности нейтрофилов

Проведенное нами исследование упругих свойств поверхности нейтрофилов свидетельствует о том, что расчетные показатели значения жесткости нейтрофилов сопоставимы с показателями таких клеток человека как фибробласты, лимфоциты, мезенхимальные стволовые клетки, остеобласты и эндотелиальные клетки. Наклон кривой подвода кантилевера определяет упругие свойства образца (клетки). Для «мягких» образцов кривая подвода кантилевера имеет более пологий наклон. На представленном рисунке 29 отчетливо видно, что наклон силовой кривой подвода зонда к поверхности нейтрофилов опытной группы более крутой, что свидетельствует о более высокой жесткости мембраны клеток по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы. Таким образом, механические свойства мембраны нейтрофилов после воздействия НЧ TiO_2 изменяются, а именно модуль упругости клеток значительно повышается, что свидетельствует об увеличении жесткости нейтрофилов.

3.2.2 Клинико-лабораторные показатели крови крысы на фоне перорального введения наночастиц диоксида титана

Поскольку при исследовании лимфоидных органов экспериментальных животных нами были получены результаты, свидетельствующие о существенных изменениях соотношения различных иммунокомпетентных клеток, то логично предположить, что такие сдвиги в их содержании не могут не затронуть систему крови. Анализ гематологических показателей животных на фоне введения НЧ TiO_2 свидетельствует об отсутствии выраженных изменений со стороны эритроцитов (табл. 7). В течение всего периода наблюдения содержание гемоглобина и число эритроцитов колебались в пределах нормы и не отличались от контрольных значений. Стоит отметить незначительное повышение указанных показателей, сохраняющееся в течение всего периода наблюдений.

Результаты ряда исследований показали, что НЧ TiO_2 в условиях *in vitro* в эритроцитах человека вызывают окислительный стресс и интенсификацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Meena R., 2012; Khan M., Naqvi A.H., Ahmad M., 2015). Накопление продуктов ПОЛ увеличивает микровязкость мембранных фосфолипидов, что является основной причиной повышения ригидности мембраны эритроцитов, и как следствие этого приводит к снижению деформируемости и увеличению их агрегации (Рязанцева Н.В., 2001; Семченко В.В. и др., 2003; Šimundić M. et al., 2013). Вследствие увеличения жесткости эритроцитов и образования эритроцитарных агрегатов возрастает «критический» радиус проходимости микрососудов, что способствует резкому нарушению тканевого метаболизма в результате снижения поступления кислорода в клетки и в конечном счете вызывает усиление эритропоэза, а, следовательно, возможно является причиной наблюдаемого нами эритроцитоза.

Изучение количественных показателей лейкоцитов крови животных на фоне перорального введения исследуемых НЧ выявило их существенные отклонения от контрольных значений. В крови животных опытной группы к 14-му дню

наблюдений резко повышается содержание лейкоцитов, достигая максимальных значений к 30-му дню эксперимента (табл. 8).

Т а б л и ц а 7

Показатели красной крови животных на фоне перорального введения НЧ TiO₂ (M±Sd)

	Контроль	Опыт (14 день)	Опыт (30 день)
эритроциты, 10 ¹² /л	7,51±0,93	8,56±0,39	7,98±0,73
гемоглобин, г/л	124,25±10,32	143,00±5,79*	140,33±9,98*
гематокрит, %	38,68±2,47	46,53±1,16*	44,19±4,05
средний объем эритроцитов, фл	51,62±1,50	54,80±2,94*	55,50±2,17*
среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците, пг	16,43±0,57	16,88±1,08	17,44±0,69
средняя концентрация гемоглобина в отдельном эритроците, г/л	320,37±12,33	307,40±7,02	317,83±11,75
относительная ширина распределения эритроцитов по объёму, %	15,92±0,38	17,48±0,76*	17,40±0,96*

Т а б л и ц а 8

Показатели белой крови животных на фоне перорального введения НЧ TiO₂ (M±Sd)

	Контроль	Опыт (14 день)	Опыт (30 день)
лейкоциты, 10 ⁹ /л	13,41±3,06	19,26±1,81*	19,23±3,19*
лимфоциты, 10 ⁹ /л	9,46±2,28	12,67±1,68	12,12±1,99
моноциты, 10 ⁹ /л	0,38±0,14	0,34±0,15	0,44±0,19
гранулоциты, 10 ⁹ /л	3,72±1,07	6,25±0,63*	6,46±1,62*
лимфоцитов, %	70,63±3,84	67,14±0,96	62,21±4,30*
моноциты, %	0,74±0,41	0,52±0,28	0,64±0,49
гранулоциты, %	25,78±3,08	32,66±3,07*	35,50±3,74*

Анализ лейкоцитарной формулы (табл. 9) показал, что выявленный нами лейкоцитоз формируется за счет гранулоцитов, абсолютное число которых к концу срока наблюдений согласно результатам общего анализа гематологических показателей возрастает на 43%, что свидетельствует о наличии воспалительных процессов в организме животных опытной группы. Прирост количества

гранулоцитов происходит за счет увеличения содержания всех видов зернистых лейкоцитов, но наиболее существенные сдвиги наблюдались со стороны юных, палочкоядерных форм нейтрофилов и эозинофилов (табл. 9). Что же касается агранулоцитов, то их количество в крови животных, подвергшихся воздействию НЧ, наоборот снижается, в основном за счет падения уровня лимфоцитов, процентное содержание которых по данным общего анализа крови к концу срока наблюдений падает на 14% относительно контрольных значений. Этот факт указывает на то, что развивающиеся на фоне введения НЧ лейкоцитоз и гиперагрессия нейтрофилов приводят к относительной лимфопении. Число моноцитов у таких животных было в пределах нормы.

Т а б л и ц а 9

**Лейкоцитарный профиль крови животных
контрольной и опытных групп (M±Sd)**

Сроки	Гранулоциты %					Агранулоциты %	
	базофилы	эозинофилы	нейтрофилы			лимфоциты	моноциты
			палочко-ядерные	сегментоядерные	юные		
Контроль	2,76±0,87	1,3±0,42	3,24±0,65	20,1±1,97	0,63±0,09	71,07±3,31	0,84±0,33
14 дней	4,86±1,77*	2,35±0,69*	8,00±2,12*	12,43±2,37*	3,78±0,64*	67,64±2,56	0,64±0,37
30 дней	4,43±1,24*	2,42±0,73*	10,21±2,10*	17,07±1,95	4,07±0,73*	61,07±2,67*	0,71±0,27

Увеличение количества гранулоцитов в периферической крови, можно объяснить уменьшением скорости миграции нейтрофилов, задержкой и агрегацией их в микроциркуляторном русле, связанными с полученными нами данными об изменении вязко-упругих свойств поверхности нефиксированных нейтрофилов человека при их взаимодействии с НЧ TiO₂. В крови животных опытной группы снижается число лимфоцитов, что можно объяснить обнаруженным нами нарушением их пролиферативной активности в тимусе. Выявленные отклонения количественных характеристик лейкоцитов от контрольных значений свидетельствуют об изменении состояния иммунной системы организма животных опытной группы и в целом согласуются с результатами, полученными другими авторами (Becker K. et al., 2014; Kongseng S. et al., 2016).

3.3 Морфологические особенности печени на фоне введения наночастиц диоксида титана

3.3.1 Структурные особенности печени

Несмотря на то, что при длительном воздействии различные химические соединения могут не вызывать внешне регистрируемые признаки патологического процесса, в отдельных органах и тканях могут проявляться скрытые повреждения, затрагивающие биохимические системы. В связи с этим нами была исследована активность трансаминаз (АлАТ, АсАТ) в сыворотке крови животных на фоне воздействия НЧ TiO_2 . Проведенный нами анализ активности индикаторных ферментов показал, что у животных опытной группы через 30 дней ежедневного перорального введения НЧ TiO_2 исследуемые биохимические показатели крови крыс претерпели значительные изменения: уровни АсАТ и АлАТ в крови повышаются (рис. 30).

Поскольку основной причиной увеличения уровня ферментов в крови может являться в том числе их выход из поврежденных клеток в кровяное русло, обнаруженные нами изменения биохимических параметров указывают на негативное влияние исследуемых НЧ, нарушение целостности мембран гепатоцитов и являются признаком повреждения печеночной ткани.

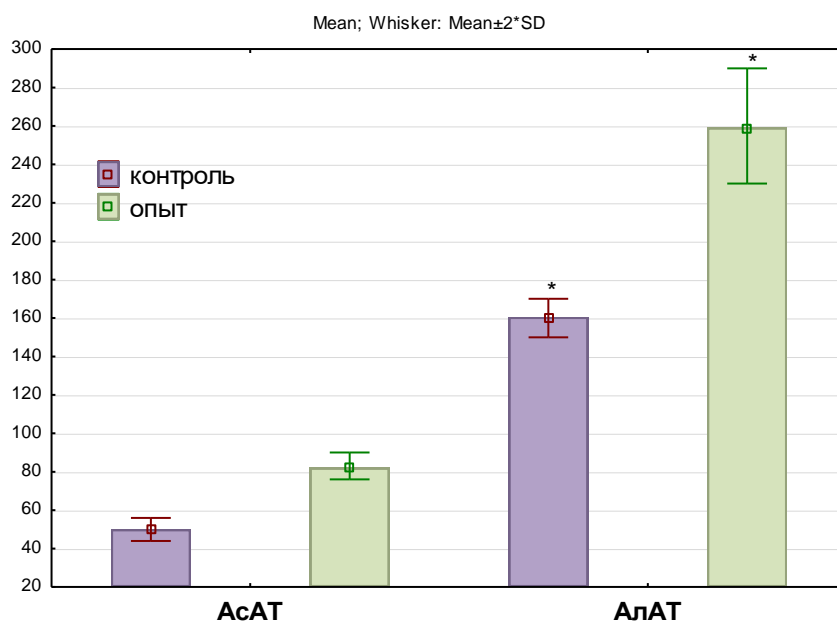


Рисунок 30. Содержание АлТ и АСТ (Ед./л) в плазме крови животных контрольной и опытной групп

Печень является одним из естественных барьеров организма на пути токсикантов и обладает эффективными детоксикационными возможностями. Более того, при любых токсических поражениях эта железа способна регулировать функциональные возможности системы крови за счет синтеза большей части белков ее плазмы. Вывод о негативном действии исследуемых НЧ в отношении клеток печени, выявленном с помощью биохимического анализа, был подтвержден нами при изучении морфологии этого органа. При морфологическом исследовании печени животных контрольной группы грубых нарушений в структурной организации органа не было выявлено, балочное и дольковое строение сохранено. (рис. 31).

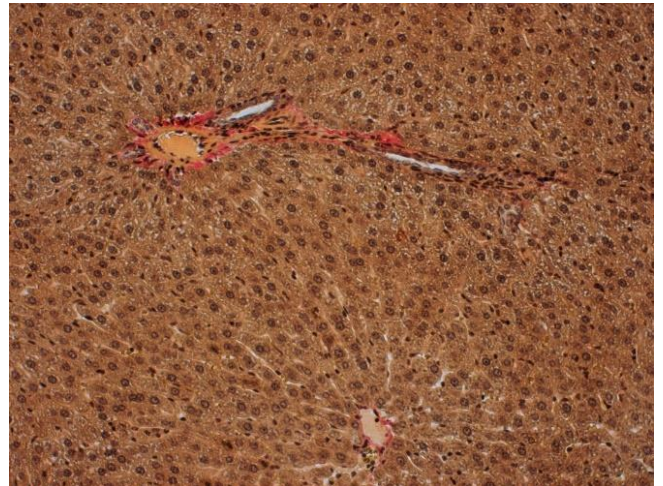
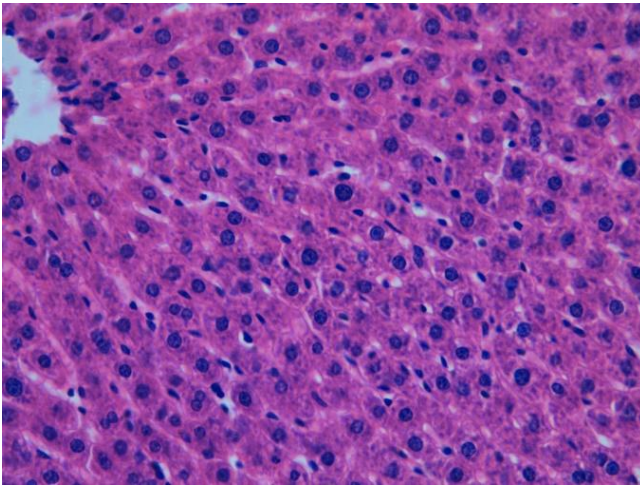


Рисунок 31. Печень крысы контрольной группы. Окраска гематоксилином эозином. Ув. x400

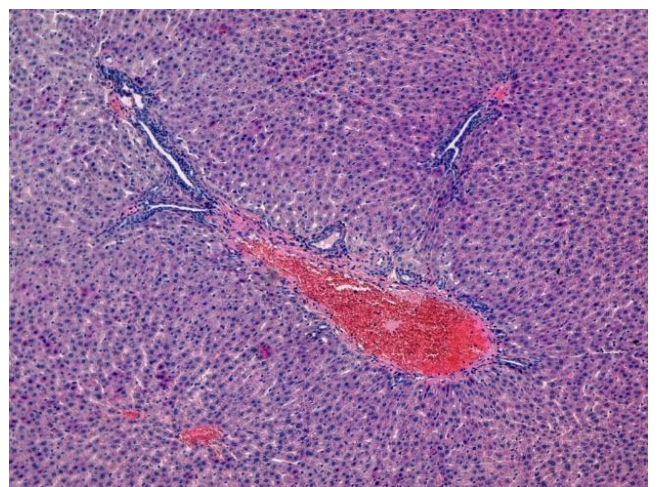
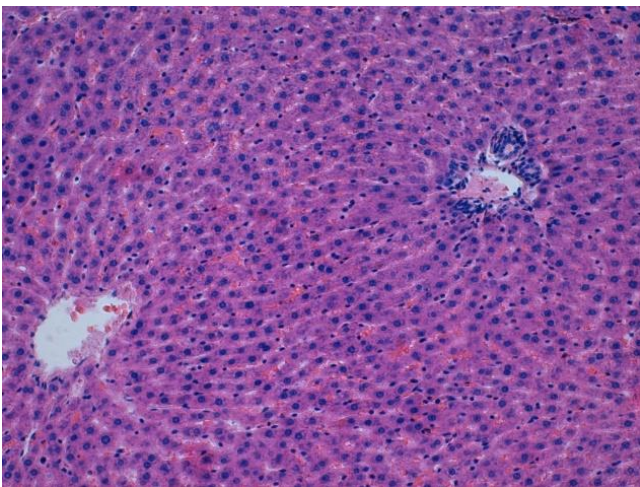


Рисунок 32. Печень крысы опытной группы. Окраска гематоксилином эозином. Ув. x100.

При исследовании гистологической картины печени крыс опытной группы через 30 дней после перорального введения НЧ TiO_2 в первую очередь обнаруживалось кровенаполнение большинства венозных сосудов как в портальных трактах, так и в центре печеночных долек (рис. 32). Диаметр центральных и портальных вен был резко увеличен, а просвет их заполнен клетками крови, преимущественно эритроцитами, находящимися в состоянии агрегации (рис. 33 а-г). Синусоидные капилляры неравномерно расширены (рис. 33 а ↑), их просвет увеличен в центральной зоне печеночных долек и несколько уменьшен по периферии. В паренхиме печени определялись признаки патологических изменений, заключающихся в атрофии части гепатоцитов (рис. 33 д ↑) Довольно значительные по площади темные плотные зоны с атрофированными гепатоцитами встречались по периферии долек. Гепатоциты в них были полиморфными, теряли очертания, сливались. Такие клетки отличались очень темной цитоплазмой и базофильным сморщенным ядром, синусоидные капилляры между ними не просматривались. Выявлялись признаки зернистой дистрофии, выражающиеся в присутствии большого количества зерен в цитоплазме клеток. У крыс опытной группы вокруг портальных трактов выявлялись признаки вакуольной и балонной дистрофии гепатоцитов (рис. 33 ж, з). Несмотря на вакуолизацию цитоплазмы клеток радиальность расположения печеночных балок вокруг центральных вен и портальных трактов в основном сохранялась.

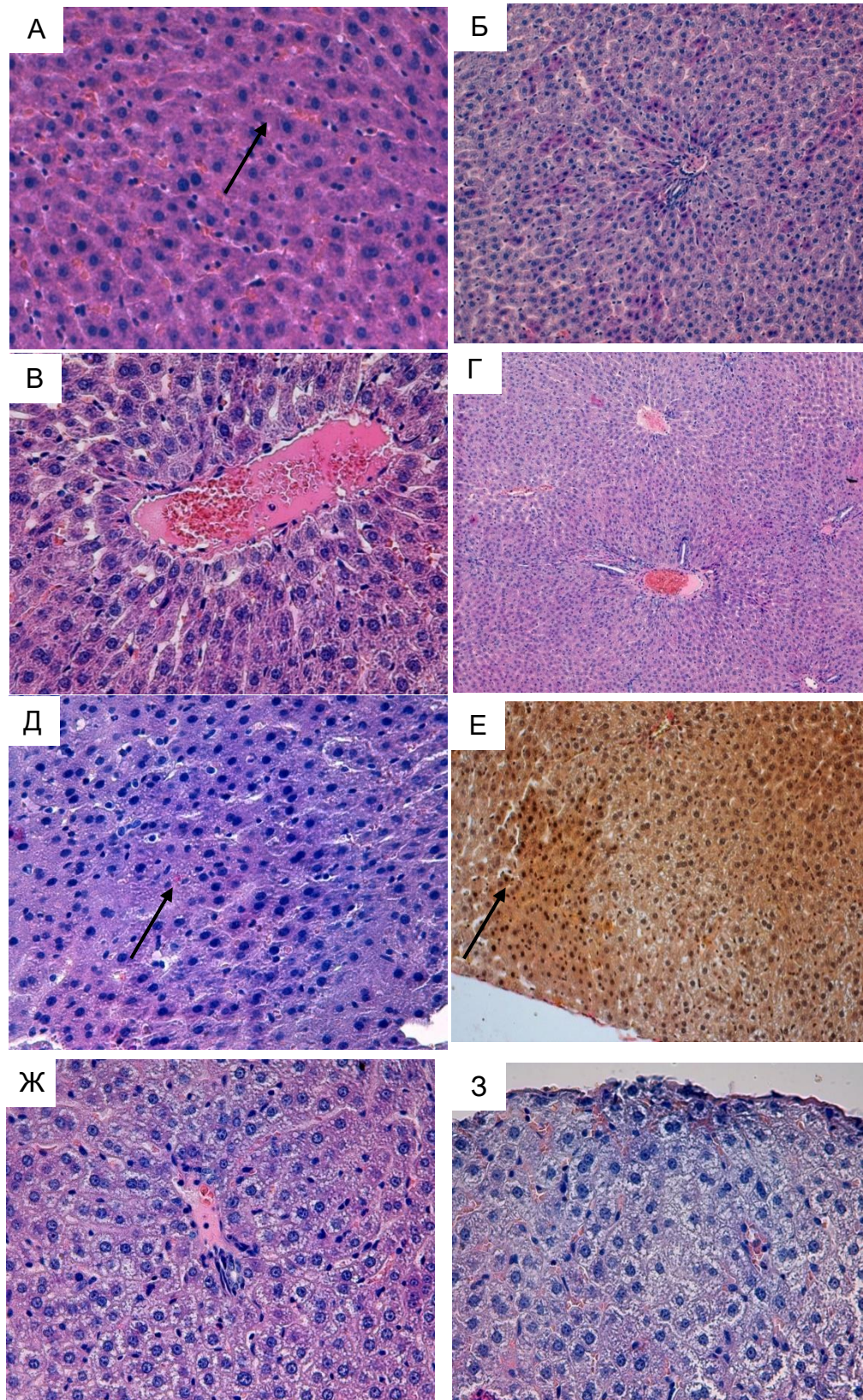


Рисунок 33. Печень крыс опытной группы. Окраска гематоксилином-эозином и по Ван Гизону (е). Ув. х100; Ув. х400

Проведенные нами *иммуногистохимические исследования* дополняют представления о механизмах токсического действия НЧ TiO₂ на печень. Исследование экспрессии маркера макрофагов CD68 выявило его присутствие в тканях печени как опытной, так и экспериментальной группы (рис. 34, 35). У контрольной группы примерно 20% клеток в поле зрения являются CD68⁺ – клетками. Наиболее значительное увеличение количества макрофагов в паренхиме печени наблюдается в портальных трактах. К 14-му дню наблюдений количество CD68 – иммунопозитивных клеток увеличилось примерно в два раза, а к 30-му – в три раза по сравнению с аналогичным показателем интактной группы животных (рис. 34, 35). При выявлении маркера клеточной пролиферации Ki-67 было обнаружено, что в условиях эксперимента наблюдалось увеличение числа гепатоцитов, экспрессирующих этот маркер, что свидетельствует об усилении процессов пролиферации клеток печени на фоне воздействия НЧ TiO₂.

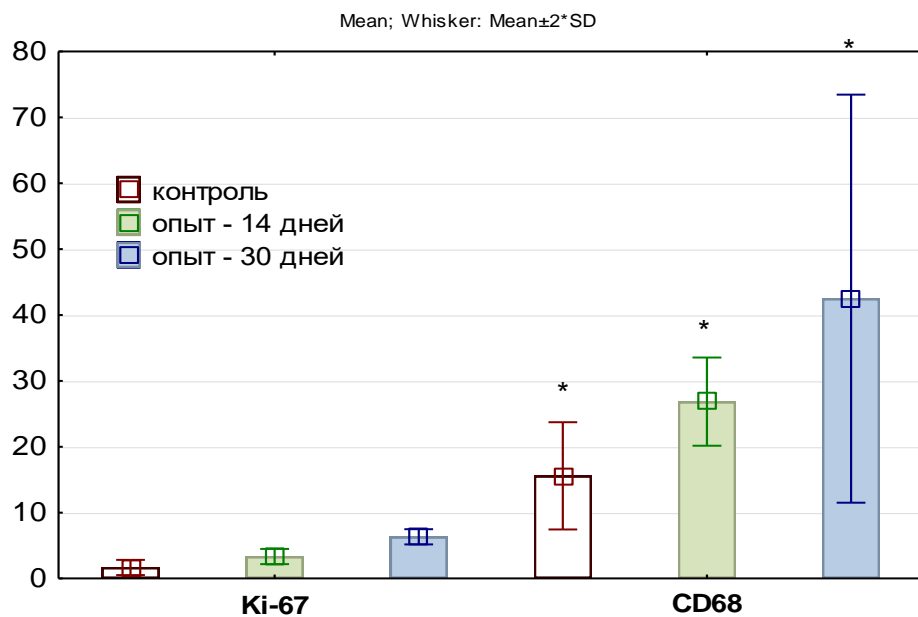


Рисунок. 34. Среднее число Ki-67- и CD68-иммунопозитивных клеток на единицу площади в печени животных контрольной и опытных групп

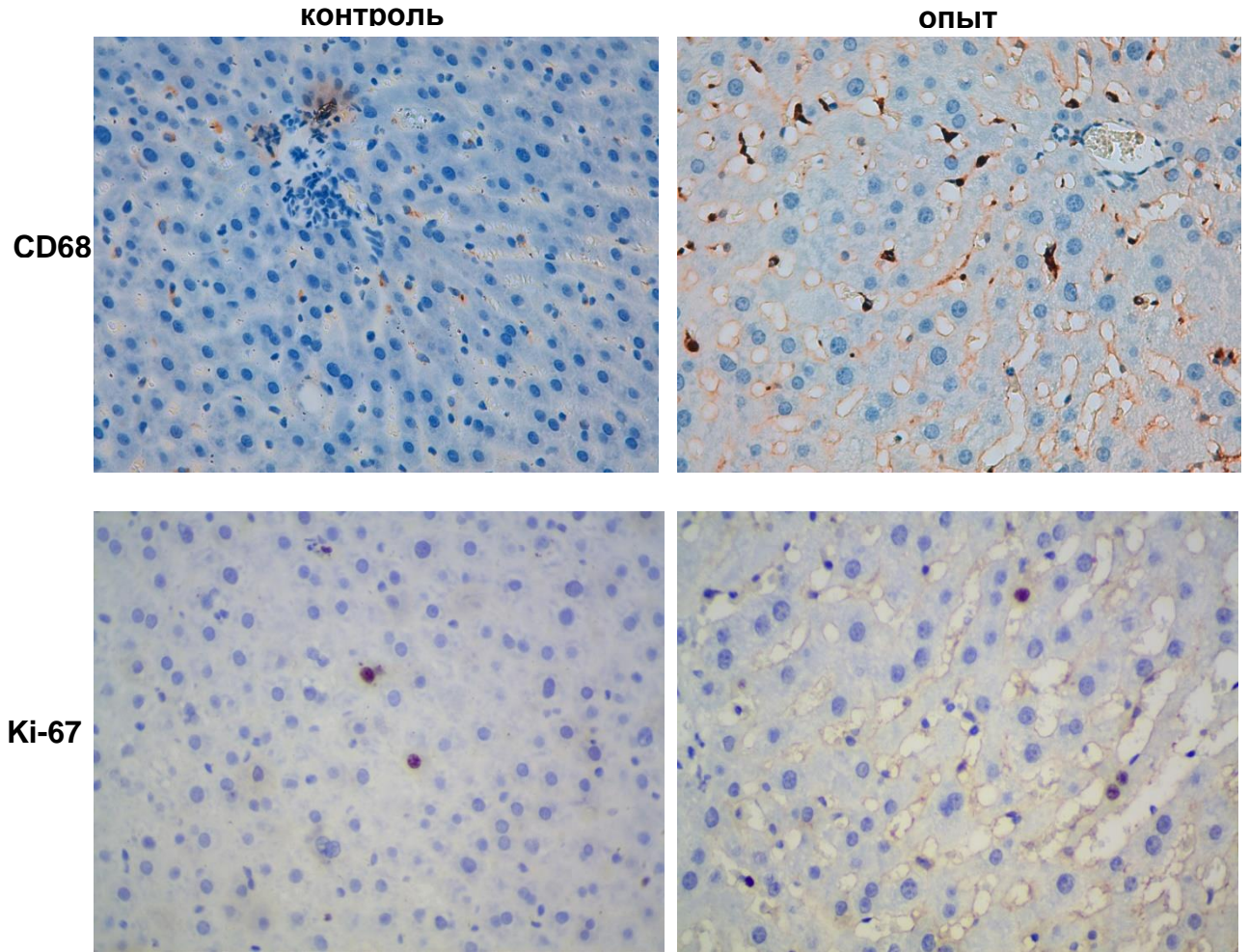


Рисунок. 35. Печень крыс контрольной и опытной групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к маркеру макрофагов CD68, ядерному антигену пролиферирующих клеток Ki-67. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.х400

3.3.2 Ультраструктурная характеристика печени

Анализ ультраструктурных особенностей печени животных на фоне воздействия НЧ TiO_2 позволил выявить признаки развития деструктивных процессов. Так, на 30-е сутки наблюдений несмотря на то, что часть гепатоцитов сохраняет ультраструктурную организацию, свойственную клеткам интактных животных (рис. 36), в ряде случаев паренхимные клетки отличаются наличием дистрофических изменений. Гепатоциты имеют полигональную форму и содержат ядро неправильной формы с выраженными инвагинациями кариолеммы (рис. 36 а, б). В кариоплазме наблюдается избыточная конденсация хроматина, его маргинация (рис. 37 в), т. е. расположение его под ядерной оболочкой (гиперхроматоз стенки ядра), что может отражать нарушение процессов транскрипции и рассматривается как признак первой стадии апоптоза (Лушников Е.Ф., Абросимова А.Ю., 2001). Ядрышко располагается как эксцентрично, так и в центре ядра и представлено пористыми мелкозернистыми структурами с очагами просветления в центре (рис. 37 г). Подобное разрыхление (диссоциация) ядрышек, отражающее их гипогрануляцию, может быть следствием нарушения образования р-РНК. На фоне введения НЧ TiO_2 в печени экспериментальной группы животных увеличивается количество двуядерных гепатоцитов.

Значительную часть цитоплазмы гепатоцитов печени животных экспериментальной группы занимали митохондрии и мембранные структуры гранулярной эндоплазматической сети. Ультраструктурные изменения заключались в появлении полиморфизма митохондрий, что является свидетельством компенсаторных реакций: в гепатоцитах обнаруживаются как набухшие с просветленным матриксом митохондрии с фрагментированными кристами, так и многочисленные органеллы с гомогенизированным матриксом, в котором часто определялись электронно-плотные частицы (рис. 37 д, е).

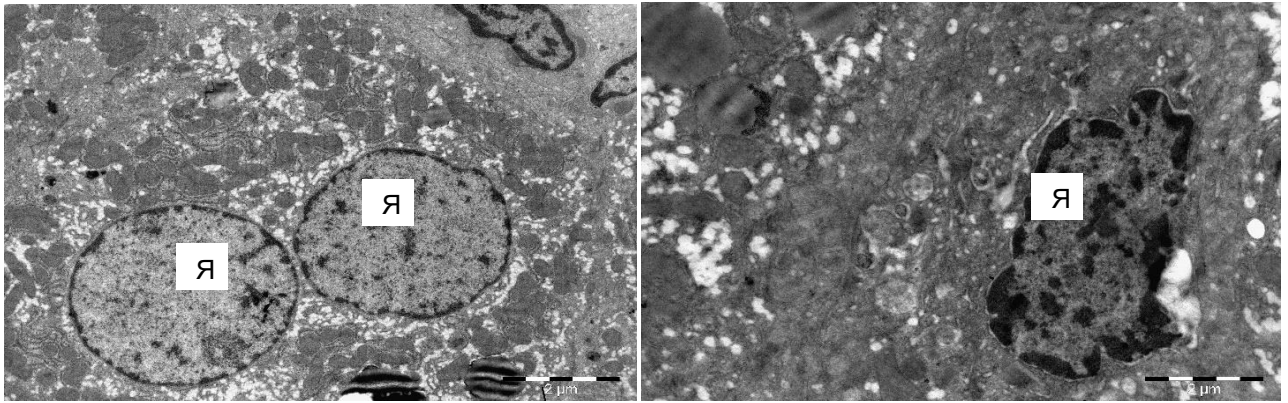


Рисунок 36. Печень крысы контрольной группы. Электронограммы.

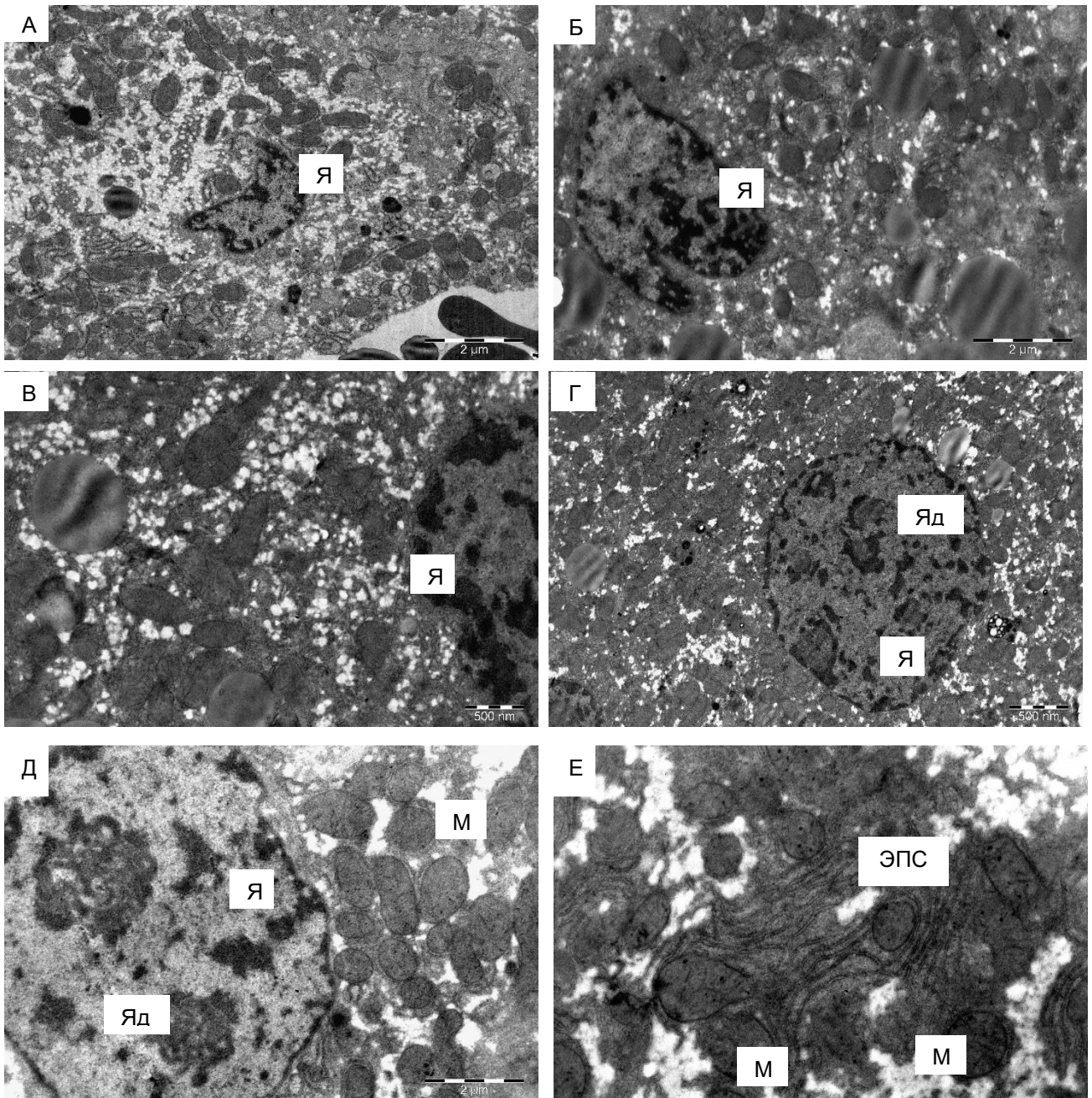


Рисунок 37. Печень крысы опытной группы. Электронограммы. Об.: М – митохондрия Я – ядро, Яд – ядрышко, ЭПС – эндоплазматическая сеть

Как правило, подобные митохондриальные осмиофильные гранулы служат местом аккумуляции двухвалентных ионов кальция и отражают неспецифическую реакцию митохондрий на повреждение клетки. Внутримитохондриальная кальцификация может быть связана как с избыточным притоком кальция в клетку вследствие первичного повреждения плазматической мембраны, так и с первичными нарушениями транспорта кальция митохондриями (Струков А.И., Серов В.В., 1995; Плотников Е.Ю. и др., 2015).

В печени животных опытной группы дегенеративные изменения заключались также в виде жировой дистрофии и проявлялись набуханием цитоплазмы гепатоцитов, исчезновением в них гранул гликогена и рибосом, фрагментацией и лизисом элементов цитоплазматической сети (рис. 38 а, б), появлением большого количества липидных включений разного размера и занимающих в некоторых случаях почти весь объем цитоплазмы (рис. 38 в, г). В результате деструкции гладкой эндоплазматической сети в виде распада ее структурных элементов (очаговый цитолиз) цитоплазма отдельных гепатоцитов была просветлена и электроно прозрачна. Выявленный рост объемной плотности липидных капель, возможно связан с нарушением функции гладкой ЭПС или с изменением структурно-функциональных характеристик ЭПС и КГ, что приводит к увеличению численной и объемной плотности лизосом и подтверждается дезорганизацией мембран АГ (рис. 38 д), потерей их параллельной ориентации.

В пространстве между гепатоцитами и эндотелиальной выстилкой синусодных капилляров (пространство Диссе) дифференцируются перисинусоидальные липоциты (клетки Ито), имеющие типичную звездчатую форму и длинные цитоплазматические отростки (рис. 38 е). Овальное светлое ядро этих клеток содержало одно или два ядрышка, в цитоплазме выявляются многочисленные осмиофильные вакуоли, свидетельствующие о наличии липидных гранул. В пространстве Диссе печени опытной группы животных выявлены пучки коллагеновых волокон (рис. 38 ж, з).

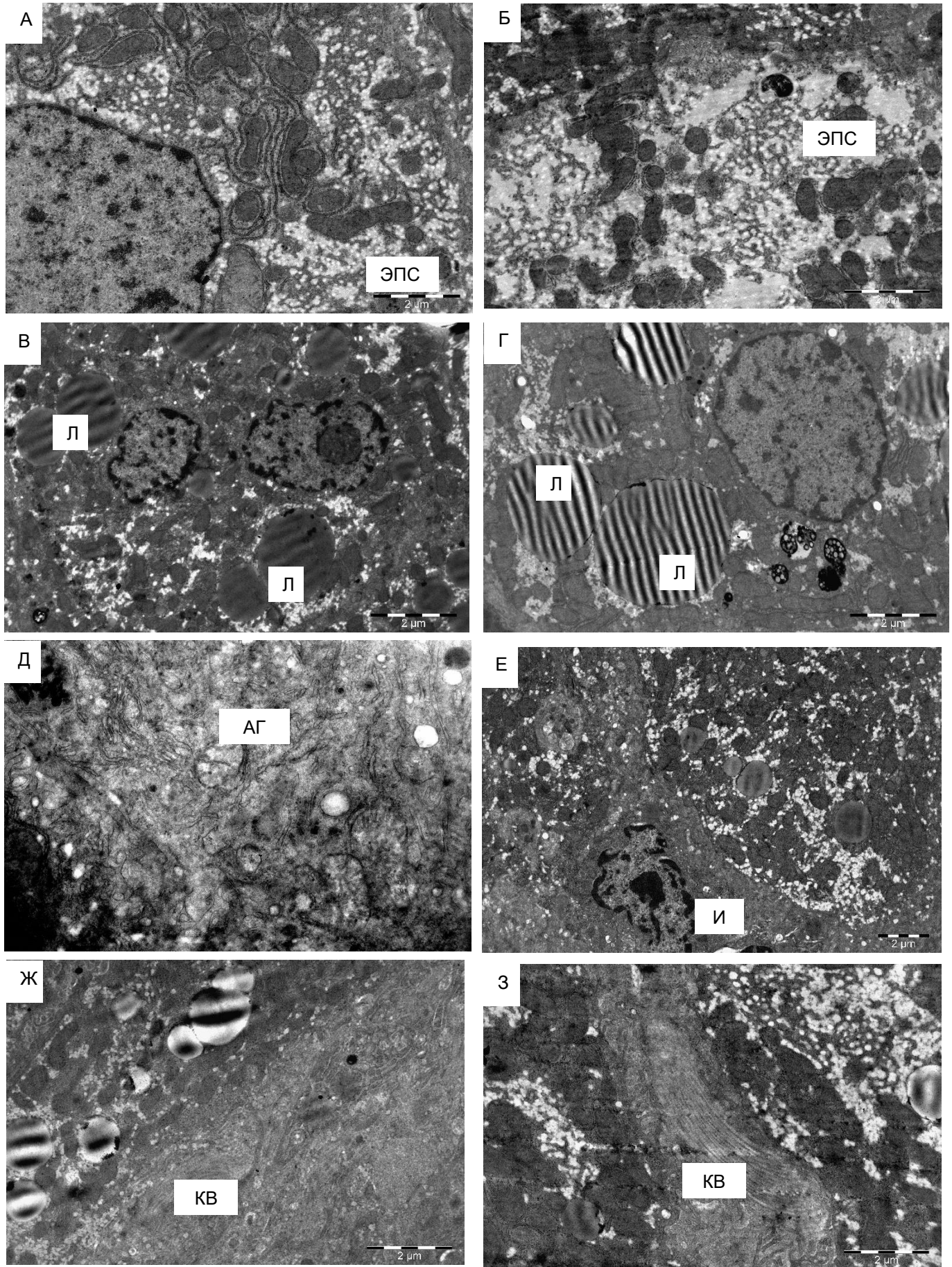


Рисунок 38. Печень крысы опытной группы. Электронограммы. ОБ.: И – клетка Ито, КВ – коллагеновые волокна, Л – липидные включения, ЭПС – эндоплазматическая сеть

Поскольку основная роль в продукции соединительной ткани в печени (внеклеточного матрикса) играют звездчатые клетки перисинусоидального пространства, присутствие коллагена указывает на избыточную активацию клеток Ито. Появление соединительнотканых структур в пространстве Диссе может мешать нормальной гемодинамике печени и приводить к сокращению объема метаболически активной паренхимы.

Микроворсинки васкулярной поверхности гепатоцитов в пространстве Диссе гипертрофированы и деформированы (рис. 39 б), что можно объяснить адаптивно-компенсаторной реакцией и увеличением площади двустороннего обмена (эндоцитоз, секреция) через мембрану в условиях перикапиллярного отека печени животных при воздействии НЧ в выбранном нами режиме. Функциональную значимость выявленных изменений ультраструктуры микровилл гепатоцитов можно определить как успешную попытку гепатоцита нормализовать расстройства водного, электролитного и белкового обмена в системе тканевой жидкости пространства Диссе, вызванного гепатотоксическим воздействием НЧ. Это подтверждается активацией звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (макрофагов печени), выражающейся в их гипертрофии и увеличении в цитоплазме клеток числа первичных и вторичных лизосом (рис. 40). Обнаруженные нами на ультратонких срезах печени Pit-клетки характеризовались нормальной структурой, не отличающей их от таковой у контрольной группы крыс.

К 30-му дню эксперимента значительным изменениям подвергалось микроциркуляторное русло печеночной дольки: в синусоидных капиллярах определялись эндотелиоциты с признаками апоптоза. Характерной особенностью таких клеток являлось наличие ядер с несколько зазубренным контуром, содержанием большого количества конденсированного хроматина, который располагался в виде широкой полосы вдоль ядерной мембраны и в виде глыбок в кариоплазме (рис. 41).

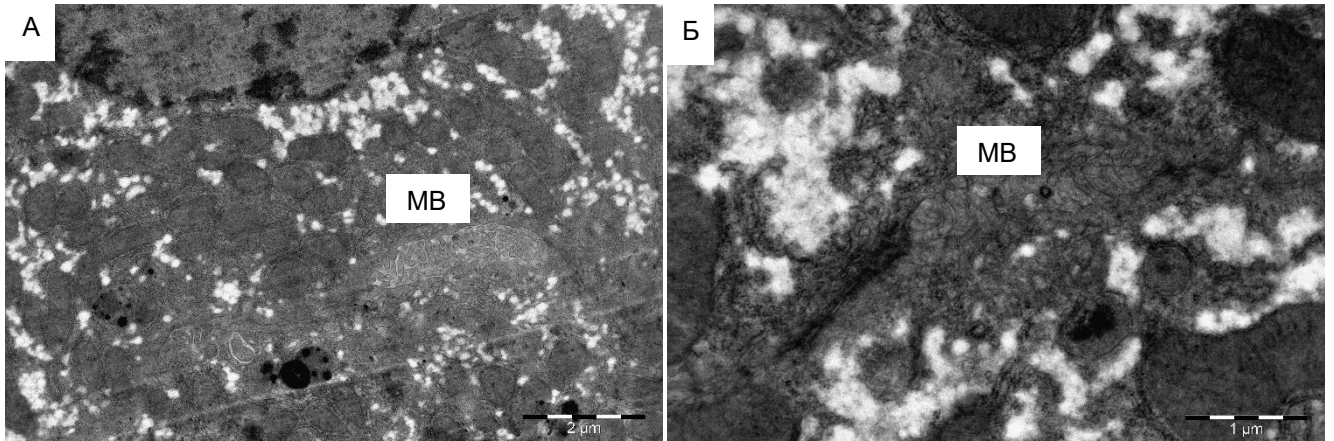


Рисунок 39. Микровосинки (МВ) васкулярной поверхности гепатоцитов в пространстве Дриссе печени крыс контрольной (а) и опытной групп животных (б). Электронограммы

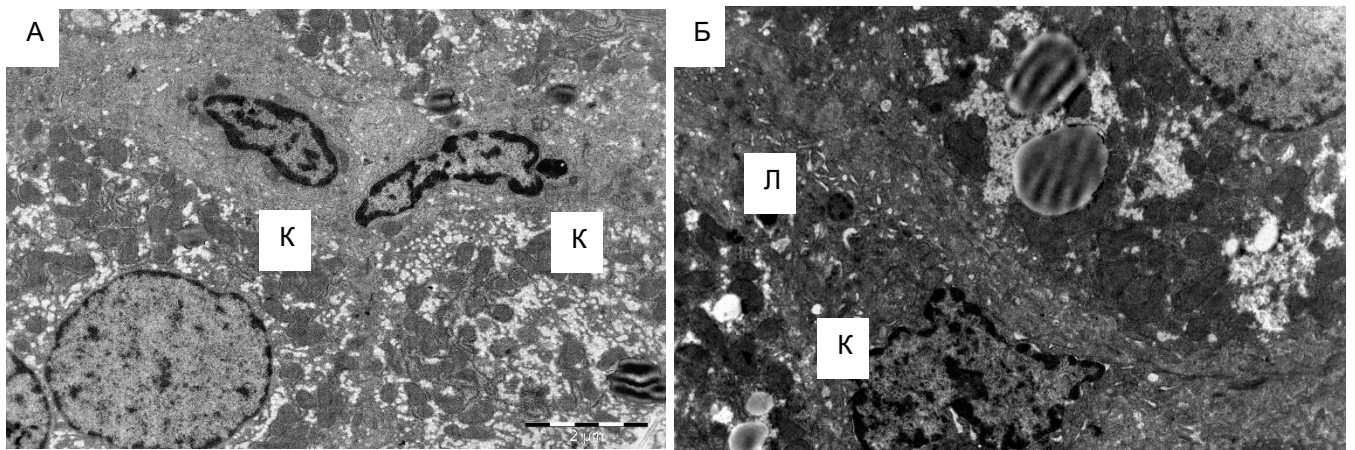


Рисунок 40. Клетки Купфера в печени крысы контрольной (а) и опытной (б) групп. Электронограммы. Об.: К - клетка Купфера, Л - лизосомы

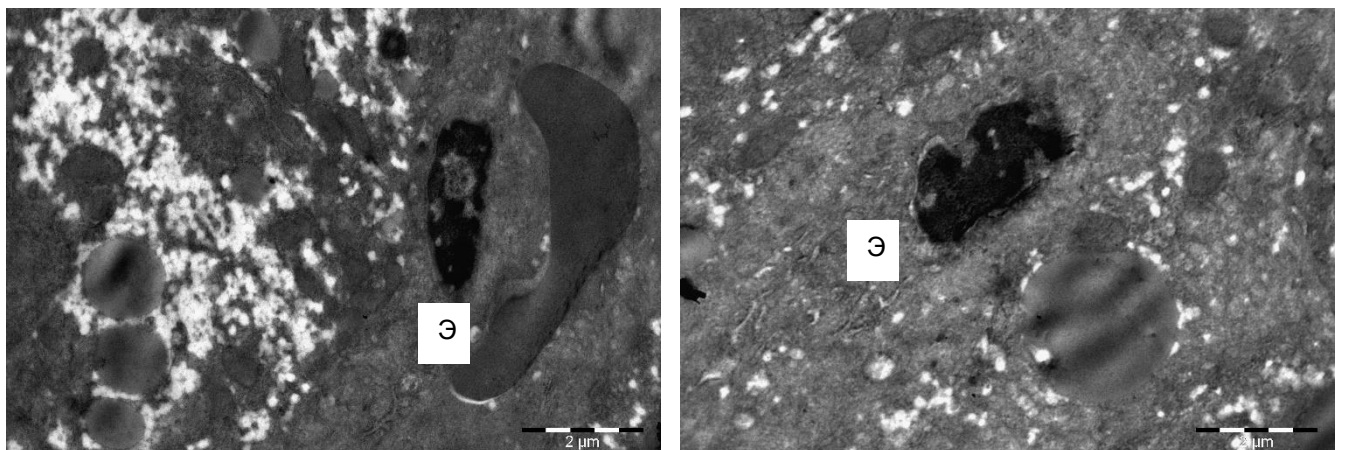


Рисунок 41. Эндотелиоциты (Э) в печени крысы контрольной (а) и опытной (б) групп. Электронограммы

Суммируя полученные результаты можно заключить, что при ежедневном пероральном введении крысам НЧ TiO_2 в печени определяются дистрофические изменения гепатоцитов, характеризующиеся на ультраструктурном уровне конденсацией хроматина, редукцией гладкой эндоплазматической сети, снижением числа свободных рибосом и полисом; избыточной активацией перисинусоидальных липоцитов и резидентных макрофагов печени, а также реактивными изменениями микроциркуляторного русла, сопровождающиеся появлением эндотелиоцитов с признаками апоптоза; увеличением CD68^+ резидентных макрофагов; увеличением пролиферативной активности с повышением числа Ki-67-иммунопозитивных клеток.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования демонстрируют возможное неблагоприятное воздействие НЧ TiO_2 на морфофункциональные свойства клеток печени у крыс, что хорошо согласуется с имеющимися сведениями о высокой чувствительности органа к действию различных дестабилизирующих и токсичных факторов, в том числе и наноматериалов.

3.4 Морфофункциональные изменения ЦНС при интраназальном введении наночастиц диоксида титана

3.4.1 Морфологическая характеристика гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса головного мозга

3.4.1.1 Структурные особенности полей CA1, CA3, зубчатой извилины гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса мозга

При исследовании препаратов, окрашенных по методу Ниссля установлено, что в гиппокампе интактных животных сохранялась хорошо описанная в специальной литературе топография клеточных слоев и зон, характерная для этой структуры (рис. 42).

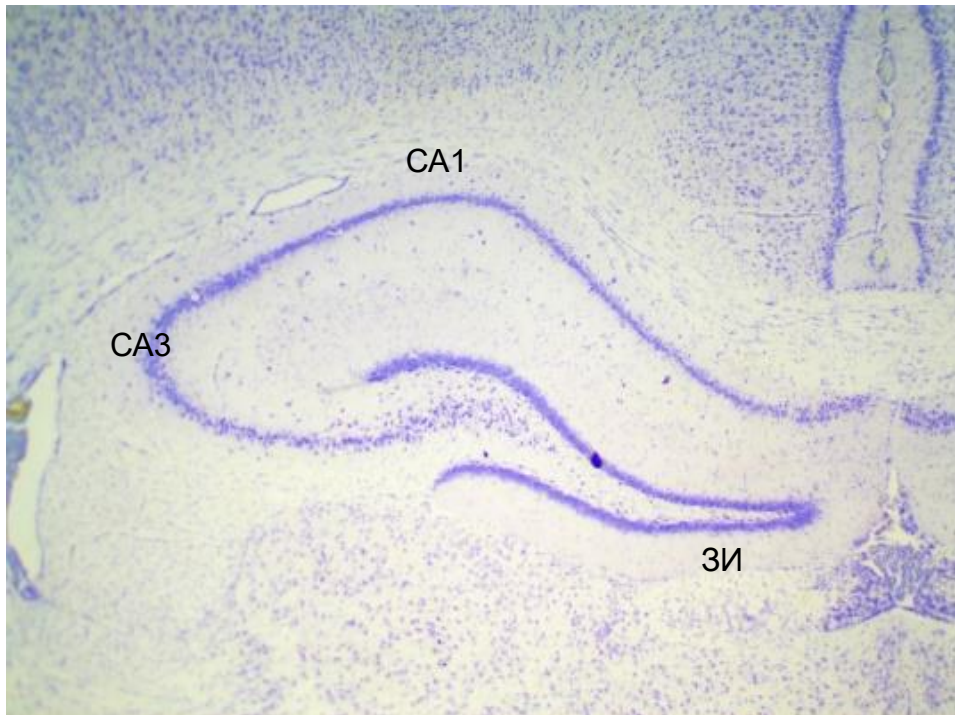


Рисунок 42. Гиппокамп крысы контрольной группы животных. Окраска крезильовым фиолетовым по Ниссля. Ув.х40

Пирамидный слой зоны CA1 гиппокампа у таких животных (рис. 43), представлял собой область плотно расположенных нейронов традиционной пирамидной формы, в которых четко визуализировались ядро и ядрышко. Глиальные клетки располагались чаще по периферии пирамидного слоя и реже

встречались среди плотно расположенных нейронов. При изучении поля СА3 гиппокампа контрольной группы животных обнаружено, что основные клеточные элементы хорошо были выражены. Определялись крупные, редко расположенные нейроны с четко выраженными контурами ядра и ядрышка, а также хорошо прослеживались равномерно распределенные клетки глии. Определяемая визуально разница в плотности расположения и количестве нейронов в данных областях гиппокампа подтверждалась данными морфометрического исследования (рис. 44).

В пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа крыс на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 (рис. 43) наблюдались признаки деструктивных изменений, которые выражались появлением полиморфности размеров нейронов, приобретении ими веретеновидной формы и резкой гиперхромии цитоплазмы. Нейроны пирамидного слоя располагались неравномерно, компактность их размещения отсутствовала, между клетками наблюдались пустоты и кроме того обнаруживалось увеличение размеров межклеточного пространства, а вокруг нейронов выявлялись очаги глиоза. Наличие структурных нарушений описываемой области гиппокампа у животных экспериментальной группы подтверждалось и изменениями морфометрических параметров этой структуры мозга (рис. 44, 45). Так, выявлено уменьшение плотности расположения нейронов пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа на 47,45% и снижение средней площади ядра (на 30,89%) и перикариона (на 18,08%) нейронов по сравнению с контрольной группой животных ($p < 0,05$).

В пирамидном слое зоны СА3 гиппокампа крыс опытной группы отмечалось значительное увеличение числа нейронов с признаками дегенерации (рис. 40), большинство из которых приобретали вытянутую веретеновидную форму и содержали темное пикнотическое ядро с отсутствием ядрышка. Выявлены нарушения цитоархитектоники пирамидного слоя, заключающиеся в исчезновении нейронов в ряде участков и снижении удельной плотности их расположения на 20,63% по сравнению с интактными животными (рис. 44). При морфометрическом исследовании области СА3 гиппокампа установлено уменьшение средней площади

ядра и перикариона нейронов пирамидного слоя относительно контрольной группы животных на 24,6 и 46,06% соответственно (рис. 45).

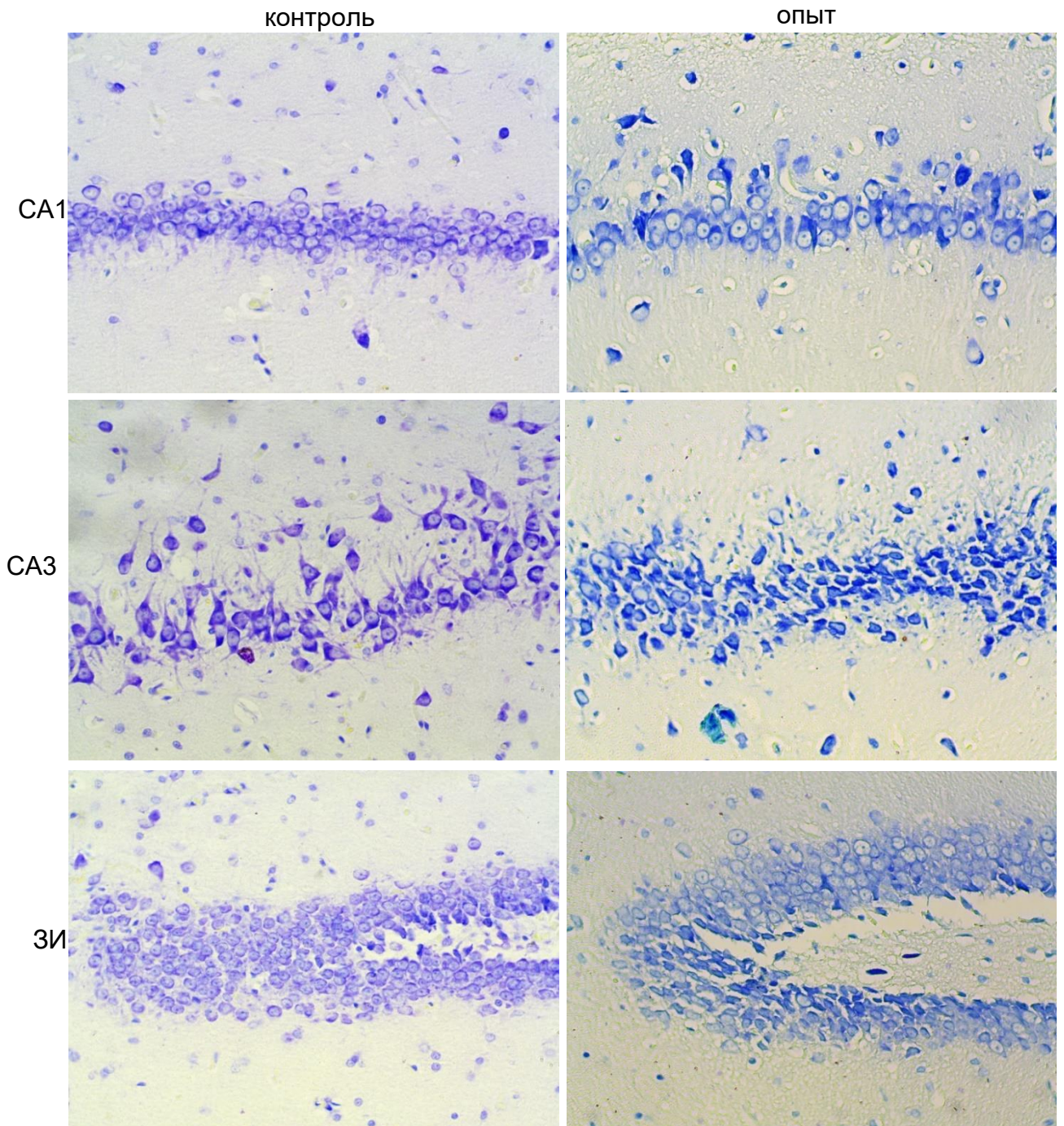


Рисунок 43. Гиппокамп крыс контрольной группы и опытной групп животных. Окраска крезильовым фиолетовым по Нисслю. Ув. 400

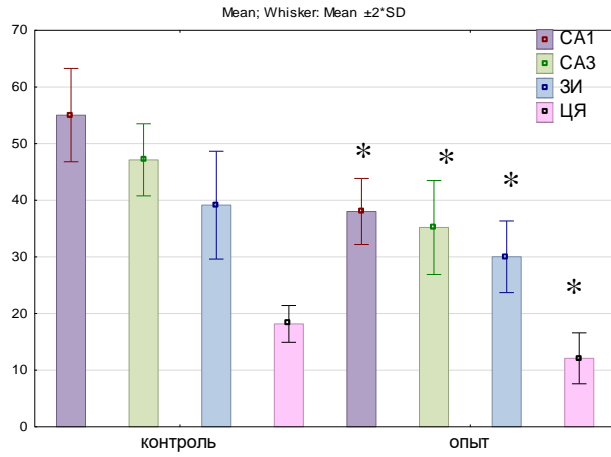


Рисунок 44. Плотность нейронов на $0,001\text{мм}^3$ в изученных областях мозга контрольной и опытной групп животных

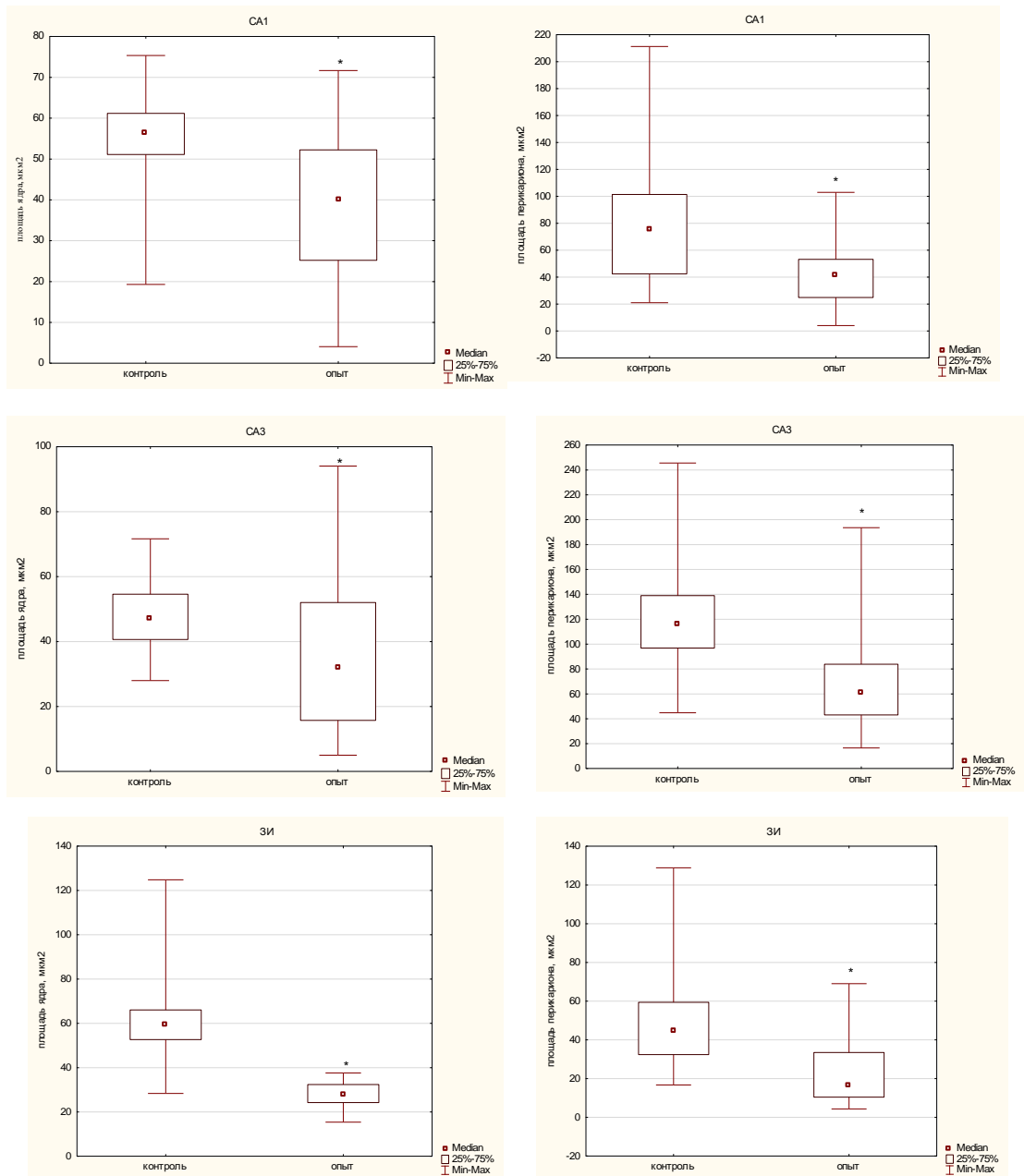


Рисунок 45. Площадь ядра и перикариона ($\mu\text{м}^2$) в полях CA1, CA3 и ЗИ гиппокампа контрольной опытной групп животных.

В пирамидном слое зоны СА3 гиппокампа крыс опытной группы отмечалось значительное увеличение числа нейронов с признаками дегенерации (рис. 43), большинство из которых приобретали вытянутую веретеновидную форму и содержали темное пикнотическое ядро с отсутствием ядрышка. Выявлены нарушения цитоархитектоники пирамидного слоя, заключающиеся в исчезновении нейронов в ряде участков и снижении удельной плотности их расположения на 20,63% по сравнению с интактными животными (табл. 44, 45). При морфометрическом исследовании области СА3 гиппокампа установлено уменьшение средней площади ядра и перикариона нейронов пирамидного слоя относительно контрольной группы животных на 24,6 и 46,06% соответственно.

При морфологическом анализе пирамидного слоя зоны зубчатой извилины (ЗИ) гиппокампа крыс на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 обнаружено неравномерное расположение нейронов и утрата компактности их размещения (рис. 47). Между клетками наблюдается появление пустот и увеличение объема межклеточного пространства, отмечается значительное увеличение количества нейронов с признаками дегенерации, большинство из которых приобретают измененную (сморщенную) форму тела и содержат темное пикнотическое ядро с неравномерным распределением хроматина и отсутствием ядрышка. Морфометрический анализ указанной области гиппокампа выявил уменьшение как площади ядра нейронов пирамидного слоя, так и их перикариона (рис. 44, 45).

При изучении фронтальных серий срезов конечного мозга крысы элементы центрального ядра появляются на ростральном уровне переднего отдела миндалевидного комплекса. Область, занятая им, располагается между волокнистой прослойкой передней комиссуры (*comissura anterior*), которая идёт сверху вниз в центральных зонах МК и образует медиовентральную границу ядра. Сверху к ЦЯ прилежат клеточные массы скорлупы (*putamen*), а латерально - продольная ассоциативная связка и скопления вставочных масс (рис. 46 а, б). Кпереди от ЦЯ довольно четко можно распознать элементы передней амигдалоидной области. По своей конфигурации СЕ представляет собой округлое образование.

Нейроны, образующие ЦЯ, обладают преимущественно средними размерами, но среди них встречаются и отдельные крупные клетки (рис. 46 в-е). Форма нейронов преимущественно полигональная, что определяется отхождением от перикариона двух-трёх и даже четырёх дендритов, начальные сегменты которых хорошо выявляются в препаратах за счёт содержания хроматофильной субстанции. Хорошо развитый перикарион равномерно заполнен базофильной субстанцией, имеющей характер нежной сетевидной структуры с отдельными зёрнами, локализующимися преимущественно в краевых зонах цитоплазмы. Центр нейрона занимает крупное, "сочное" ядро, имеющее шаровидную или эллипсоидную форму. Кариолемма имеет ровный контур, чёткость выявления которого усиливается из-за явлений примембранного гиперхроматоза. В клеточном ядре хорошо выявляется нежная ахроматиновая сеточка, на фоне которой хорошо выделяется ядрышко и несколько мелких глыбок хроматина, самое крупное из которых обычно локализуется недалеко от ядрышка. Встречаются нейроны с эксцентричным расположением ядрышка. По своей характеристике описанные нейроны имеют черты сходства с нейронами скорлупы, но их различает наличие более выраженного перикариона у нейронов ЦЯ. Описанные нейроны обозначены нами как цитохромные. В краевых зонах ЦЯ можно найти крупные нейроны с овоидным телом, большая часть которого занята ядром. Цитоплазма слабо различима, или выявляется лишь на одном полюсе клетки. Ядро и цитоплазма этих нейронов красится крезилем фиолетовым более интенсивно, вследствие чего они выглядят более тёмными (кариохромными), чем те нейроны, которые были описаны выше и которых в ядре большинство. На границе со вставочными массами и продольной ассоциативной связкой нейроны ориентированы своей продольной осью вдоль волокнистой прослойки и располагаются более дисперсно (рис. 46 в). По своим размерам они незначительно меньше тех, которые составляют основные зоны СЕ.

Таким образом, ЦЯ образовано нейронами троякого рода: средние по размеру, полигональные по форме "светлые" (цитохромные) нейроны составляют большинство, "тёмные" (кариохромные) нейроны с овальными телами

незначительны по количеству, и продольно ориентированные вдоль продольной ассоциативной связки "светлые" (цитохромные) нейроны, группирующиеся в латеральных зонах ядра.

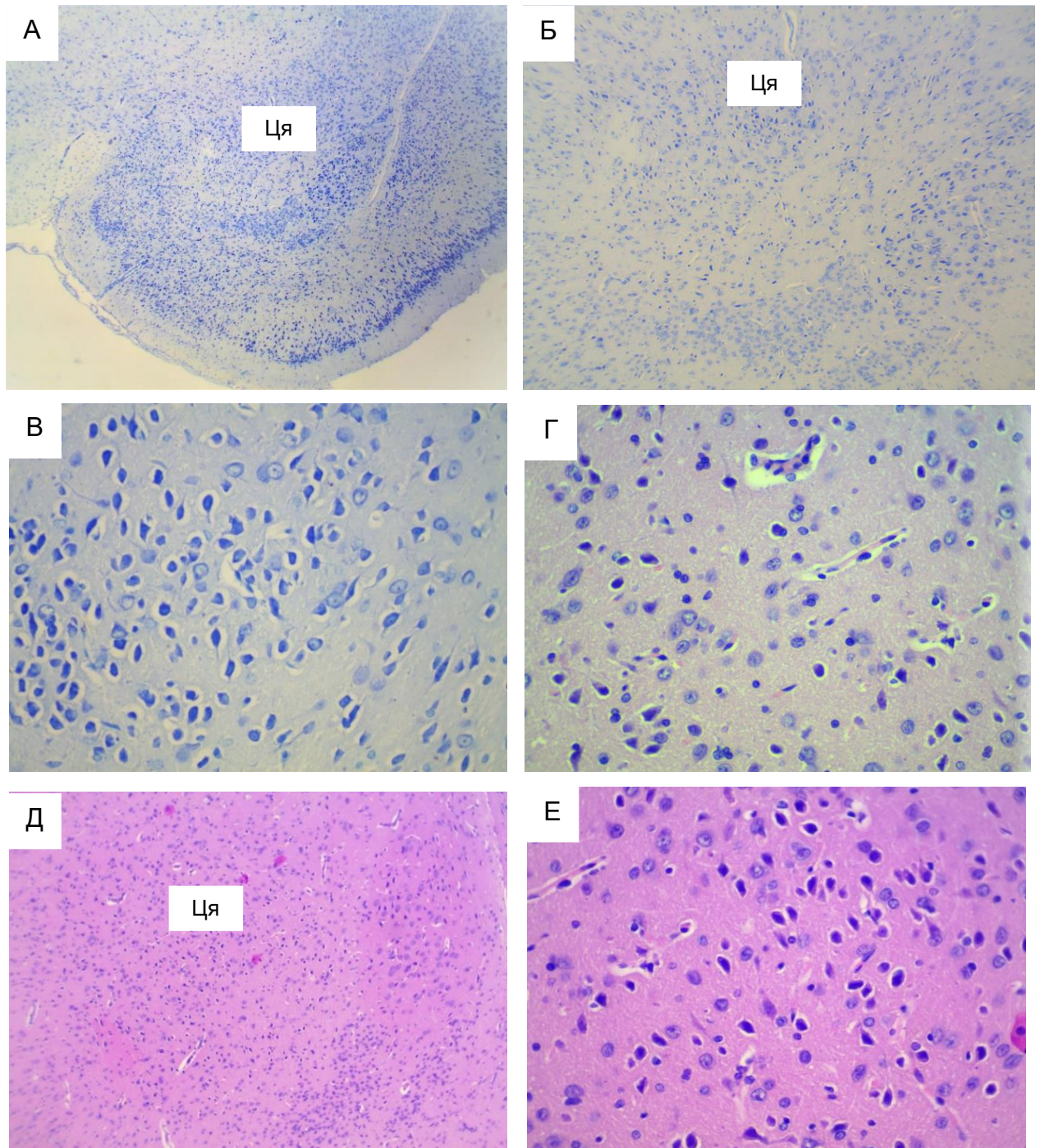


Рисунок 46. Центральное ядро миндалевидного комплекса мозга крысы контрольной группы. Окраска по Ниссля (а, ув. 40; б, ув.х100; в, ув. 400). Окраска гематоксилином – эозином (г, ув. 400; д, ув. 40; е, ув. 400)

В ядре выявляется большое количество глиальных клеток. В препаратах, окрашенных по Нисслю мы видим их ядра. Одни ядра крупнее и светлее, по-видимому, они принадлежат астроцитам, другие меньше и плотнее - они, видимо, являются клеточными ядрами олигодендроглии. Часто обнаруживаются явления "ложной" нейронофагии, проявляющиеся в том, что на поверхности нейронов мы видим одну, две или три клетки глии.

Центральное ядро имеет обильную сеть сосудов, представленных преимущественно капиллярами, рассеченными в препаратах как поперечно, так и продольно. В интима сосудов хорошо выявляются ядра эндотелиальных клеток, характеризующиеся плотностью хроматина и интенсивной его окраской. По своим тинкториальным свойствам ядра эндотелия схожи с мелкими клетками глии.

В центральном ядре МК мозга животных опытной группы отмечается значительное увеличение числа нейронов с признаками дегенерации, большинство из которых содержало темное пикнотическое ядро с отсутствием ядрышка. Выявлены нарушения цитоархитектоники описываемой области мозга, заключающиеся в снижении удельной плотности расположения клеток по сравнению с интактными животными на 29,35% (рис. 47).

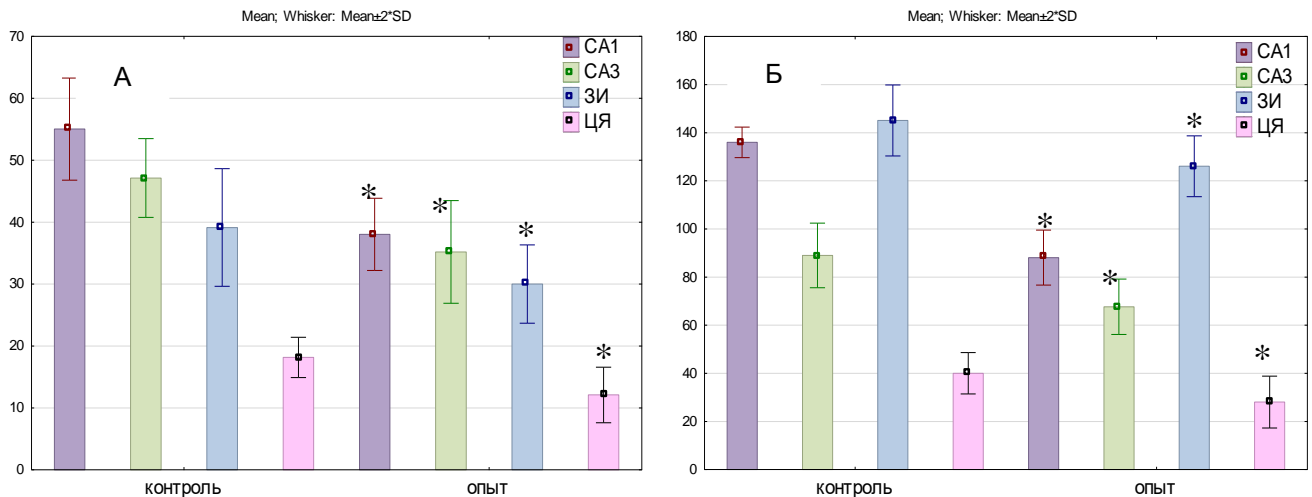


Рисунок. 47. Плотность нейронов на $0,001\text{мм}^3$ (а) и средняя площадь ядра нейронов (б) изученных зон мозга, мкм^2

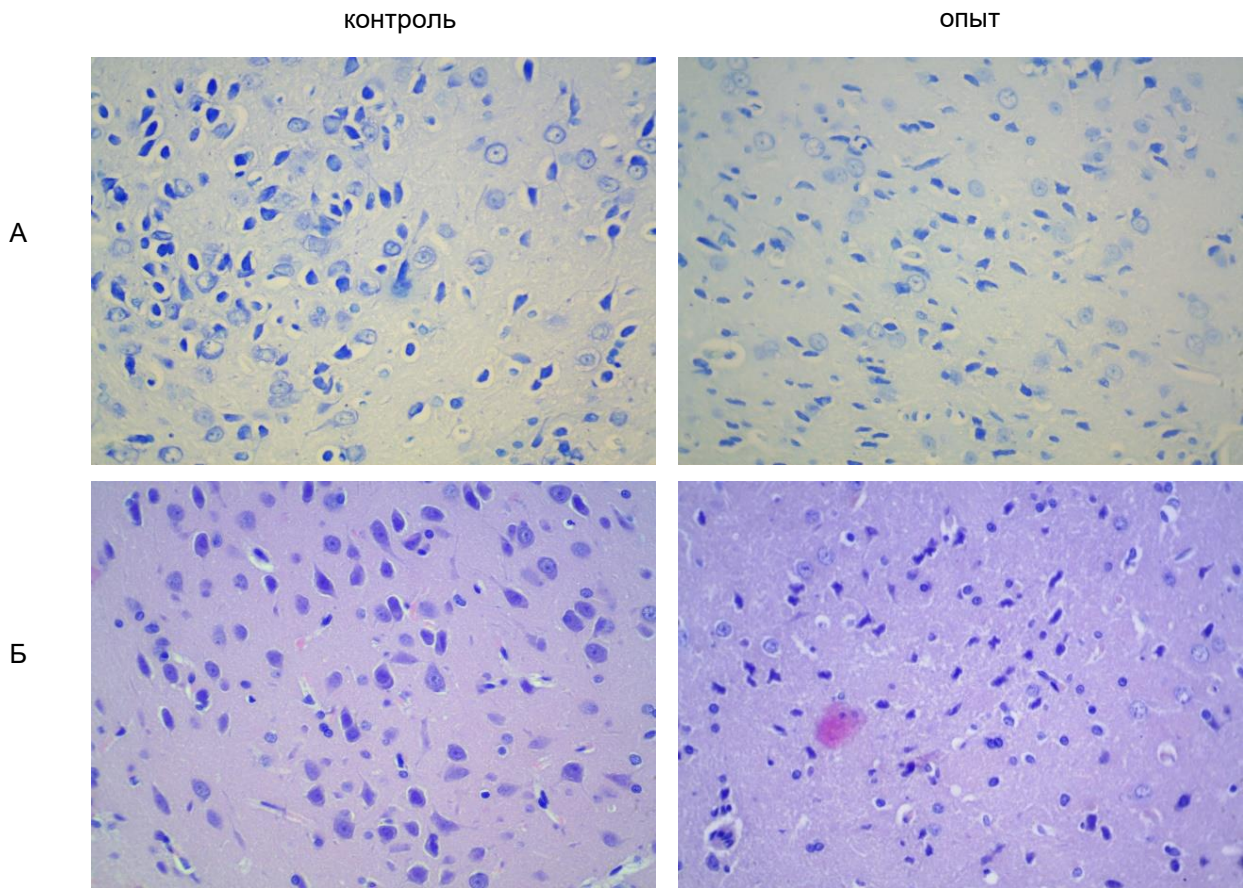


Рисунок 48. Центральное ядро миндалевидного комплекса мозга животных контрольной и опытной групп. Окраска по Ниссля (Аа ув. 400). Окраска гематоксилином – эозином (б, ув. 400)

Наличие структурных нарушений описываемой области амигдалы у животных экспериментальной группы подтверждается и изменениями морфометрических параметров: выявлено снижение площади ядра и перикариона нейронов ЦЯ МК на 29,47% и 33,76% соответственно (рис. 49).

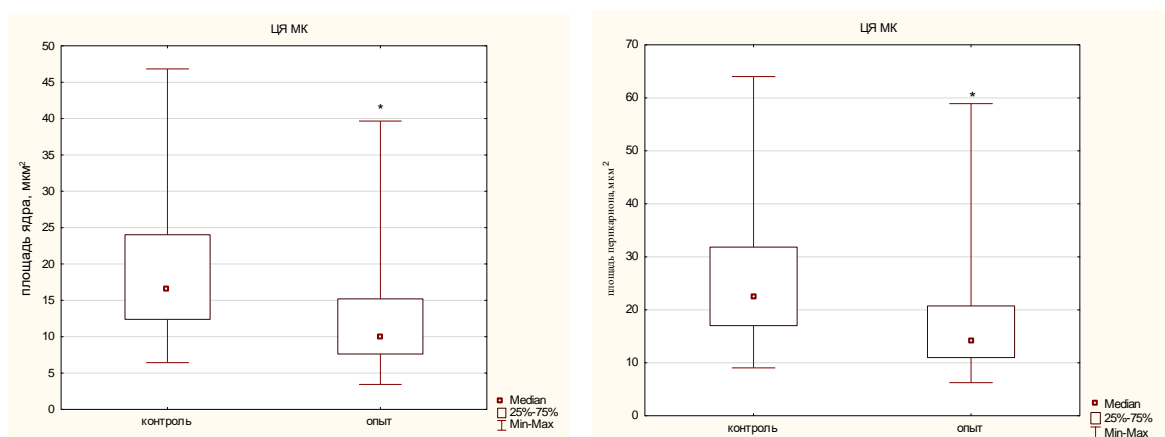


Рисунок 49. Площадь ядра и перикариона (μm^2) нейронов центрального ядра миндалевидного комплекса мозга контрольной и опытной групп животных

3.4.1.2 Ультраструктурные особенности гиппокампа и миндалевидного комплекса мозга

При электронно-микроскопическом исследовании в нейронах гиппокампа и миндалевидного комплекса мозга интактных животных хорошо просматривались все входящие в состав ядра и цитоплазмы структуры (рис. 50).

Ядро имело сферическую форму и характеризовалось наличием на своей поверхности незначительных впячиваний в цитоплазму. В центральных зонах кариоплазмы выявлялись участки гетерохроматина с перихроматиновыми гранулами, различные по величине и плотности, перинуклеарное пространство было равномерно расширено. В перинуклеарной области располагался комплекс Гольджи, представленный мембранным компонентом, стопки его цистерны состояли из пяти-шести элементов. На отдельных участках они были расширены и содержали микропузырьки, то есть имели признаки секреторной активности. В цитоплазме клеток хорошо определялись равномерно расширенные канальца гранулярной эндоплазматической сети, которые были ориентированы параллельно по отношению к ядерной оболочке, форма профилей канальцев овальная или вытянутая, а на наружной поверхности мембраны их канальцев выявлялись рибосомы. Лизосомы немногочисленны и содержали гранулы накопления, имеющие гомогенное содержимое. На периферии клеток выявлялось большое количество митохондрий различной формы и размеров с темным матриксом, в них хорошо были различимы целые, неразрушенные кристы, ориентированные чаще всего поперёк их длинной оси.

Исследование ультраструктурных особенностей гиппокампа и амигдалы опытной группы животных показало, что среди нейронов с неизменной структурой встречались и отдельные клетки с признаками дегенерации (рис. 51-53).

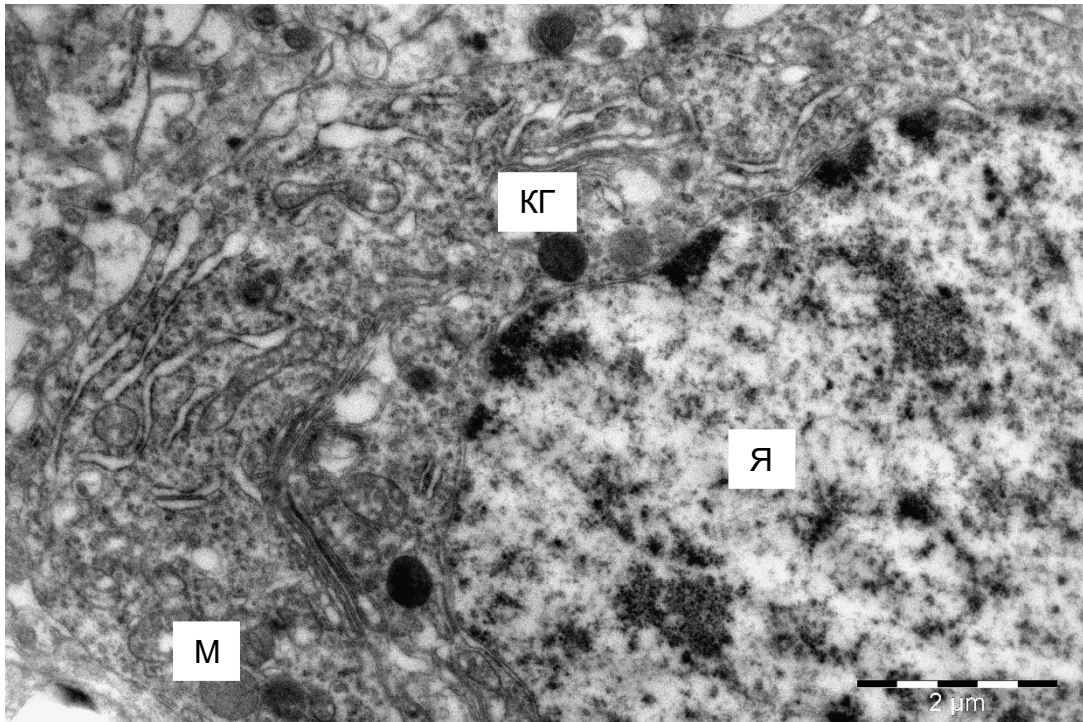


Рисунок 50. Ультраструктура нейрона гиппокампа головного мозга животных контрольной группы. Электронограммы. Об.: КГ – комплекс Голджи, М – митохондрия, Я – ядро

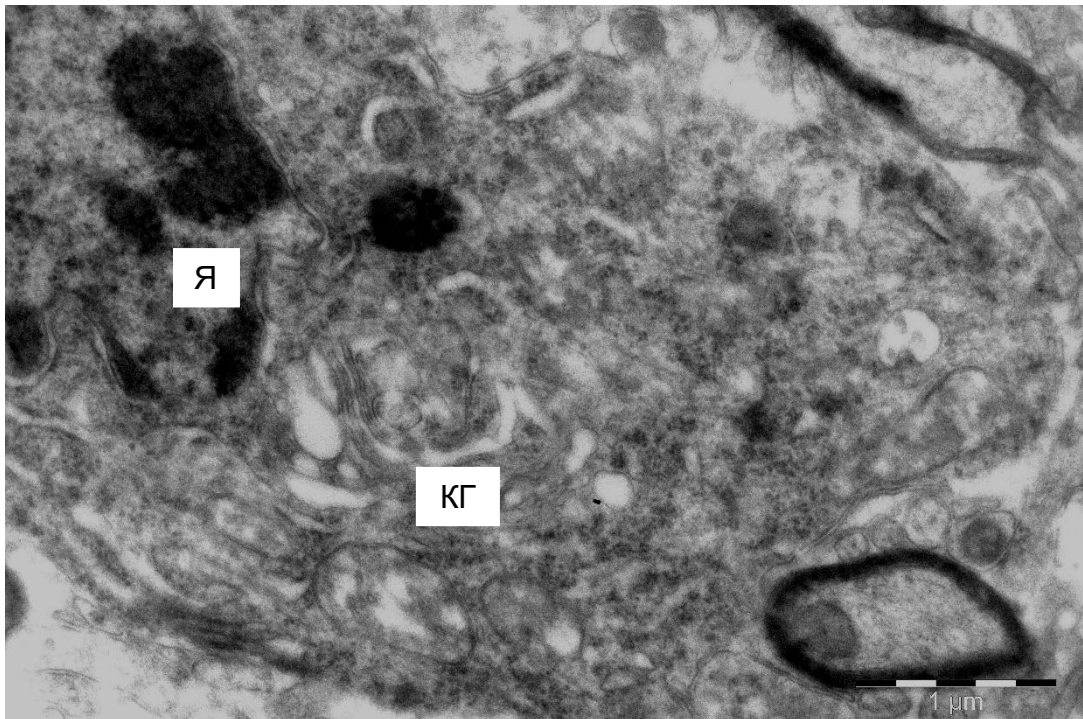


Рисунок 51. Ультраструктура нейронов гиппокампа опытной группы животных. Электронограмма. Об.: М – митохондрия, Я – ядро

В перикарионе таких нейронов отмечалось просветление матрикса цитоплазмы, значительное уменьшение числа свободных рибосом и полисом, расширение цистерн ЭПС. (рис. 51). Обращало внимание заметное визуально определяемое уменьшение объема клеток. Профиль ядра становился вытянутым в медио-латеральном направлении, а контуры ядра имели сложный рельеф поверхности за счет многочисленных впячиваний (рис. 52). Гетерохроматин был образован гранулярным материалом, состоящим из скоплений гранул разных по величине и плотности расположения. Аппарат Гольджи визуализировался редко или представлял собой расширенные цистерны без признаков синтетической деятельности. Митохондрии в перикарионах нейронов набухшие, распределены по цитоплазме неравномерно. Целостность крист митохондрий, внешней и внутренней мембраны часто была нарушена. В нейронах определялось появление вакуолей и значительного числа липофусциновых гранул (рис. 52, 53).

Таким образом, проведенные нами электронно-микроскопические исследования гиппокампа показали, что на фоне введения НЧ TiO_2 определяются ультраструктурные изменения нейронов, свидетельствующие о повреждении их энергетического аппарата, что проявляется в разрушении наружных мембран митохондрий и значительной деструкции крист. Кроме того, в нейронах гиппокампа экспериментальной группы животных резко увеличивается просвет цистерн гранулярной эндоплазматической сети, уменьшается число рибосом, отмечается разрыхление ядерной оболочки и наличие множественных инвагинаций в ней, что в совокупности указывает на негативные реактивные изменения структур белоксинтетического аппарата этих клеток. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что суммарный эффект воздействия НЧ TiO_2 на клетки гиппокампа – деструктивные изменения в них.

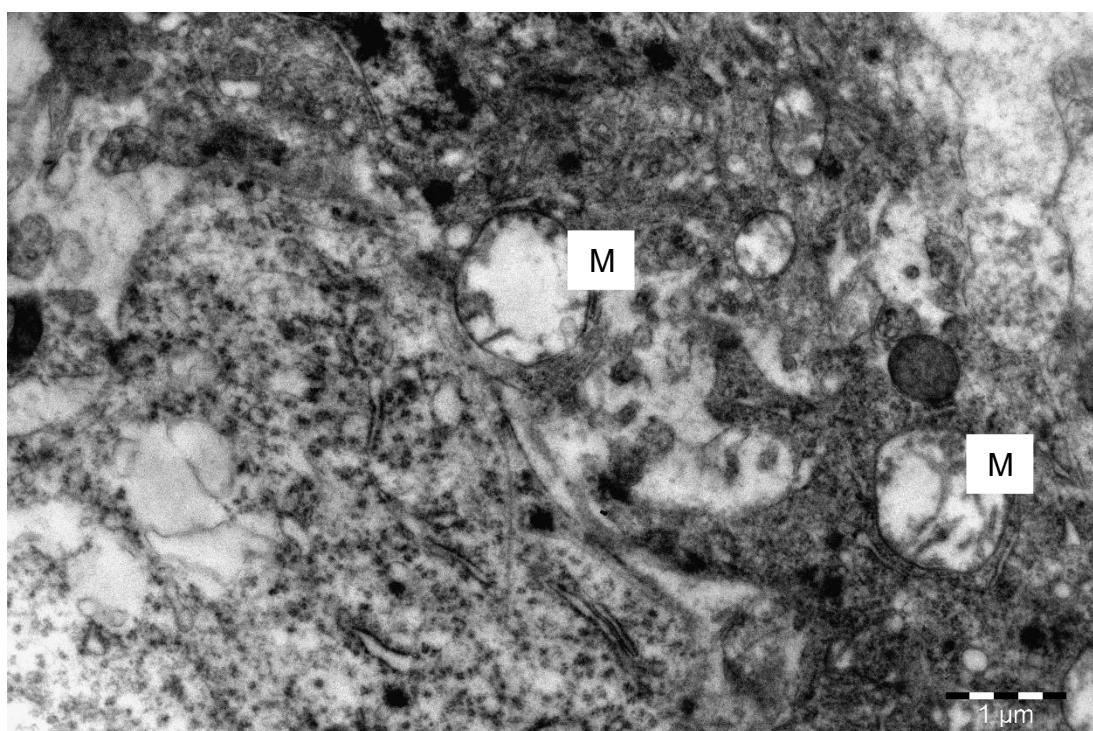
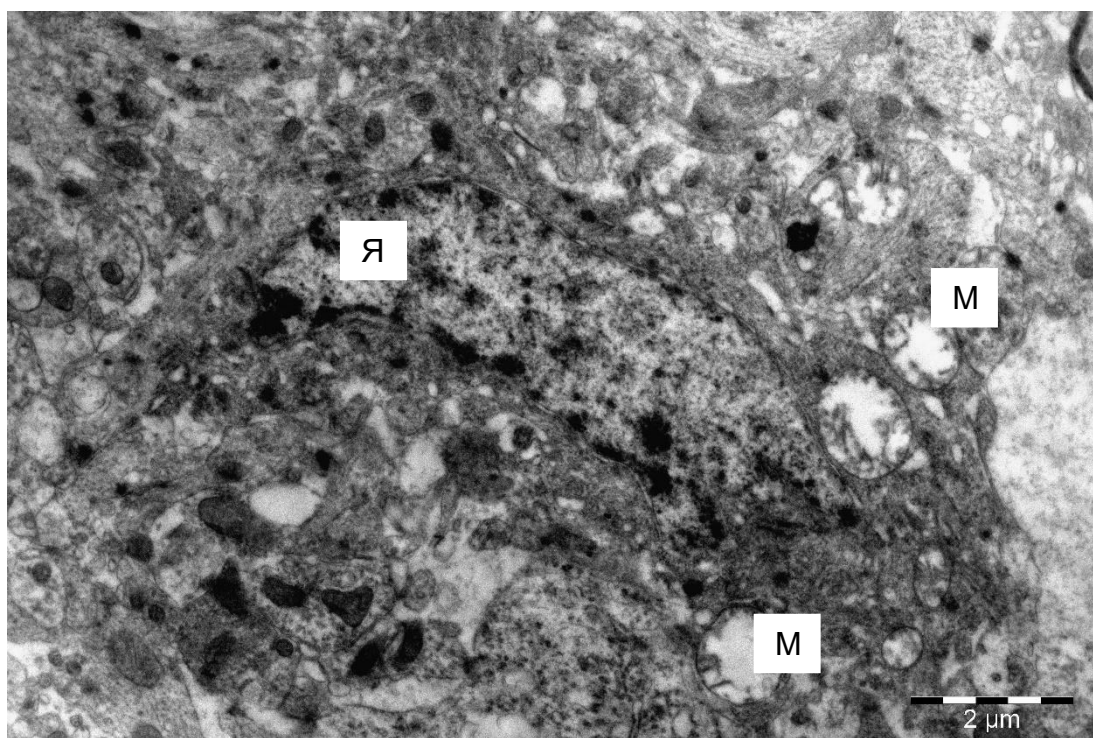


Рисунок 52. Ультраструктура нейронов гиппокампа опытной группы животных. Электронограммы. Об.: М – митохондрия, Я – ядро

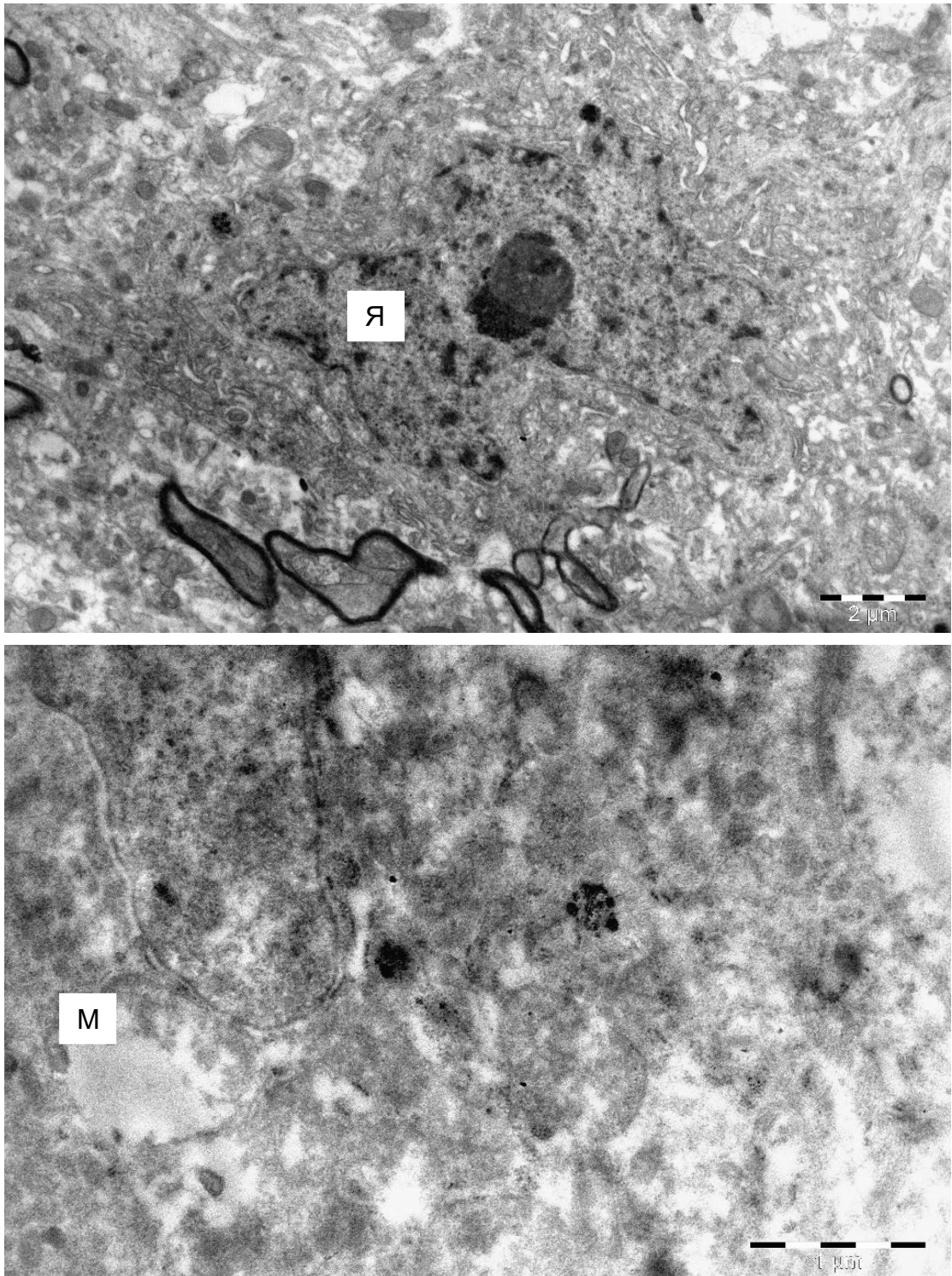


Рисунок 53. Ультраструктура нейронов амигдалы опытной группы животных. Электронограммы. Об.: Я - ядро, М - митохондрия

3.4.1.3 Иммуногистохимические особенности гиппокампа и миндалевидного комплекса мозга

По мнению многих исследователей одним из маркеров повреждающего действия неблагоприятных факторов и развития патологических процессов в тканях мозга является активация астроглии (Smirnov A.V. et al., 2017; Tishkina A.O. et al., 2013; Muhamedshina Y.A. et al., 2014). Реактивные изменения астроцитов проявляются в увеличении их линейных размеров, активации синтеза ряда белков, в том числе и GFAP. С целью выяснения реакции астроцитарной глии на интраназальное введение НЧ TiO_2 , мы провели иммуногистохимическое обнаружение белка GFAP, маркера промежуточных филаментов (рис. 54 – 55).

Нами выявлено увеличение числа GFAP – позитивных клеток в различных зонах гиппокампа и ЦЯ амигдалы крыс, что свидетельствует об увеличении числа реактивных астроцитов в указанных областях головного мозга под влиянием НЧ TiO_2 (рис. 55, 56, табл. 10).

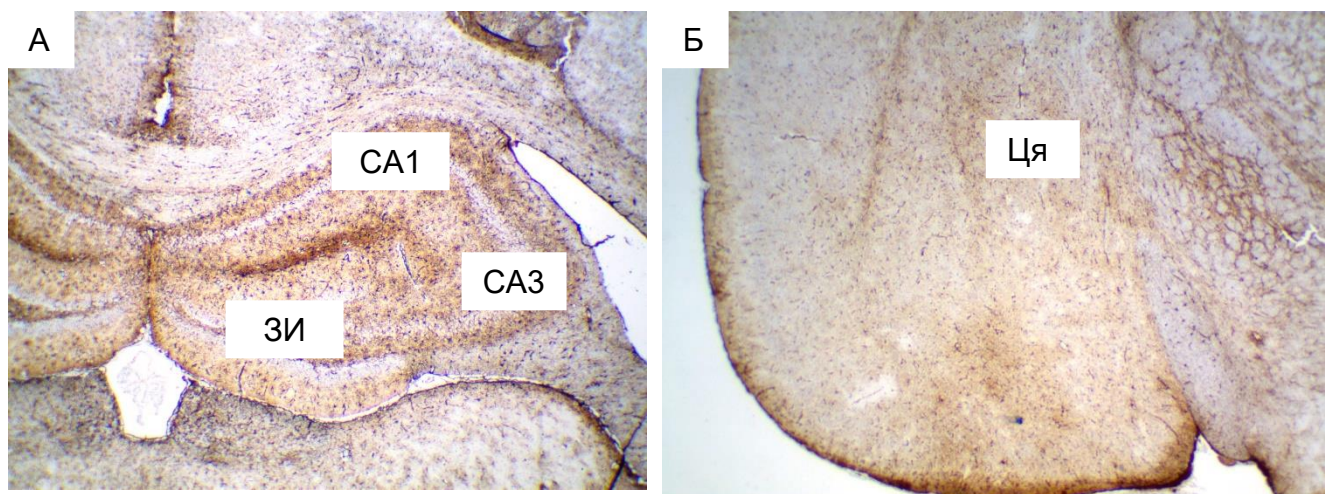


Рисунок. 54. Гиппокамп (а - поля CA1, CA3, зубчатая извилина (ЗИ) и центральное ядро (ЦЯ) амигдалы (б) головного мозга животных контрольной группы. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к GFAP. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув. x40

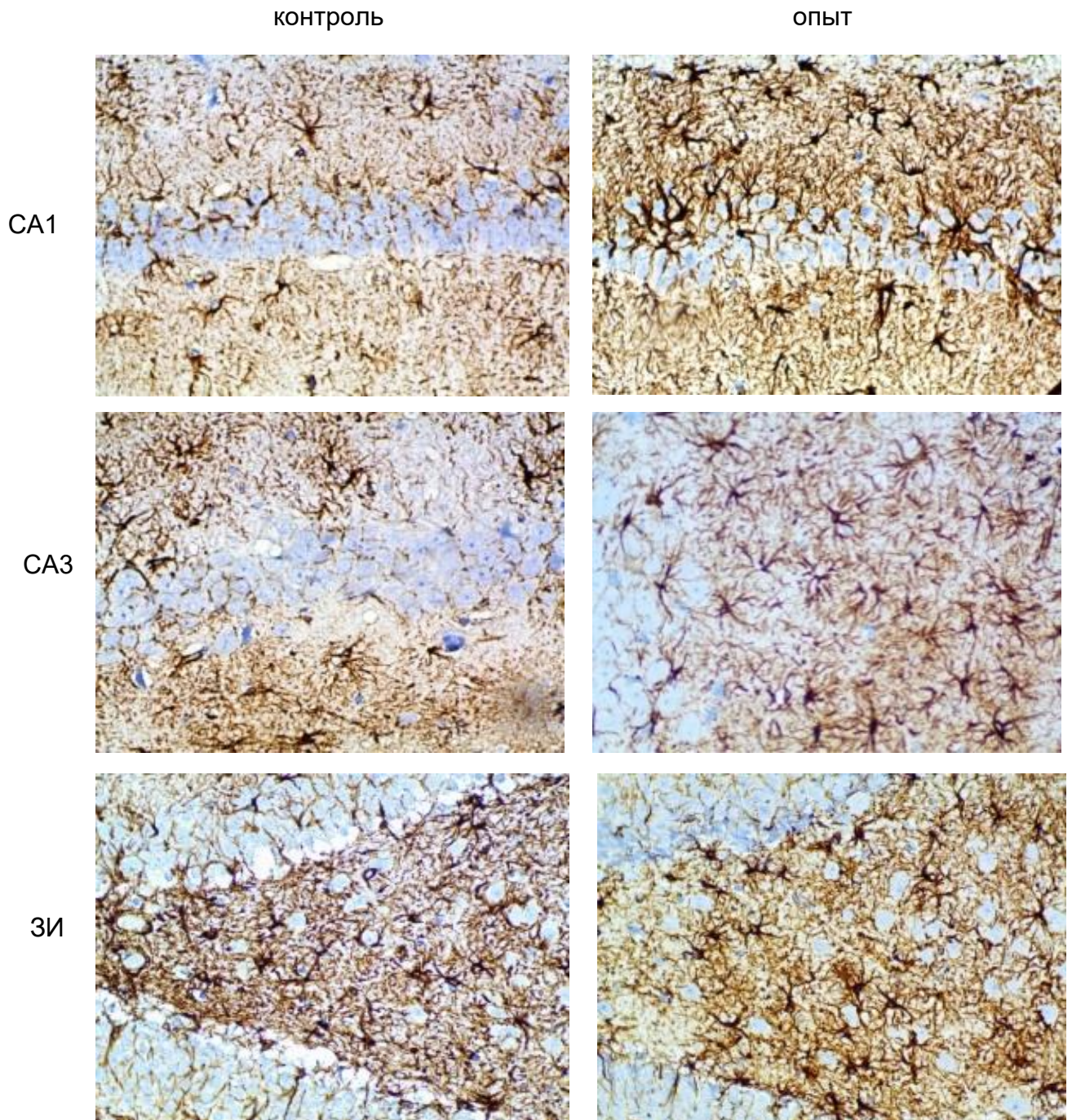


Рисунок 55. Гиппокамп мозга животных контрольной и опытной групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к GFAP. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув. х400

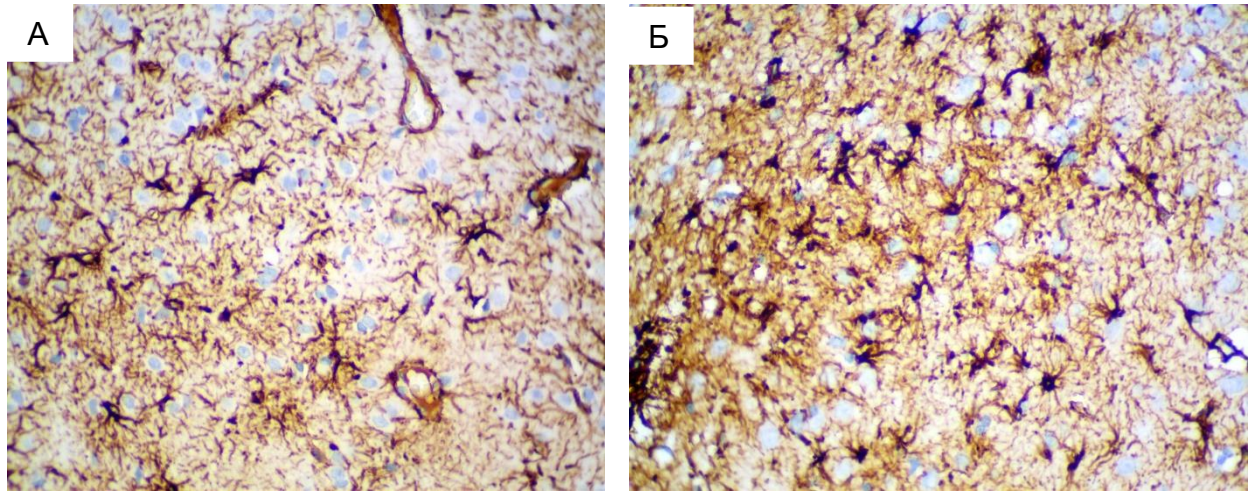


Рисунок 56. Центральное ядро миндалевидного комплекса мозга животных контрольной (а) и опытной (б) групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к GFAP. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув. х400

Т а б л и ц а 10

Относительная плотность GFAP⁺ клеток в гиппокампе и центрального ядра МК головного мозга контрольной и опытной групп животных

Зоны		Контроль	Опыт
Гиппокамп	CA1	6,96±0,52	11,71±0,36*
	CA3	6,42±0,49	12,71±0,61*
	ЗИ	7,4±0,72	9,5±0,6*
ЦЯ МК		5,9±0,61	9,94±1,51*

Как уже отмечалось выше уровень васкуляризации – важнейших фактор функционирования всех клеток нервной ткани. Новообразования и рост сосудов поддерживаются целым рядом гормональных факторов, к которым вовлеченные в эти процессы клетки обладают чувствительностью, и одним из таких факторов является VEGF. Мы исследовали экспрессию рецептора к VEGF – VEGFR-1 (Flt-1) в различных зонах гиппокампа мозга контрольной и опытной групп животных. Результаты качественной оценки содержания иммунопозитивных клеток показали, что в гиппокампе интактных животных Flt-позитивное окрашивание наблюдалось как в нейронах и глиальных элементах, так и в эндотелиальных клетках сосудов (рис. 57).

При сравнительном анализе среднего числа иммунопозитивных клеток в гиппокампе головного мозга животных, подвергнутых воздействию НЧ TiO_2 , было выявлено снижение числа нейронов, экспрессирующих VEGFR-1 по сравнению с группой интактных животных (рис. 57 – 58). В то время как в клетках глиии и в эндотелиальных клетках сосудов гиппокампа опытной группы иммунопозитивная реакция была значительно выше в сравнении с этим показателем у контрольной группы животных.

Таким образом, можно заключить, что деструктивные изменения различных клеток гиппокампа и ЦЯ амигдалы при интраназальном введении НЧ TiO_2 идет за счет индукции оксидативного стресса, апоптоза, повреждения ряда органелл клеток, появления воспалительных реакций (Feng X.L. et al., 2015; Mushtaq G. et al., 2015; Shah S.N.A. et al., 2017), что находит отражение в обнаруженных нами макро- и микроструктурных изменениях изученных структур мозга крыс. Это позволяет заключить о наличии компенсаторных реакций в исследуемых зонах головного мозга, сопровождающихся активацией астроцитов, процессов ангиогенеза и специфическим нарушением нейро-глиального соотношения в ответ на воздействие НЧ TiO_2 .

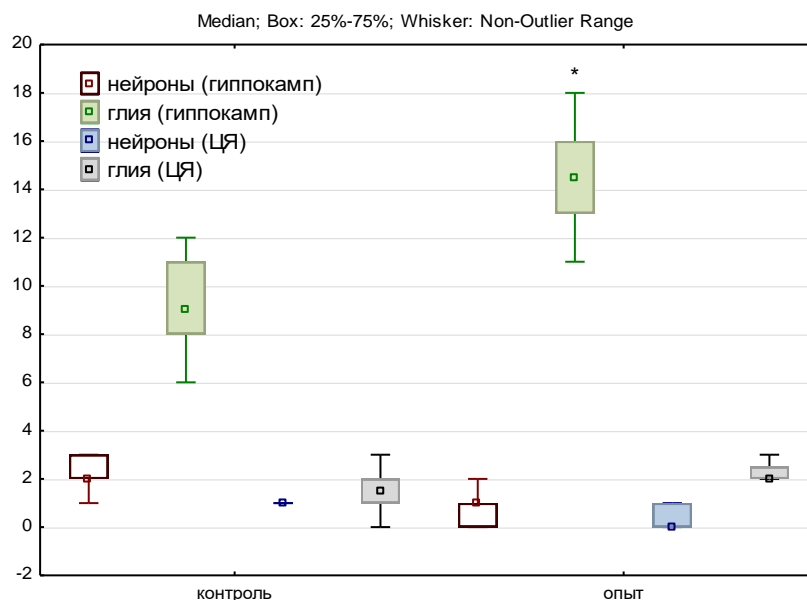


Рисунок 57. Среднее число VEGFR1⁺–нейронов, –глиальных клеток в гиппокампе и в ЦЯ МК мозга контрольной и опытной групп животных

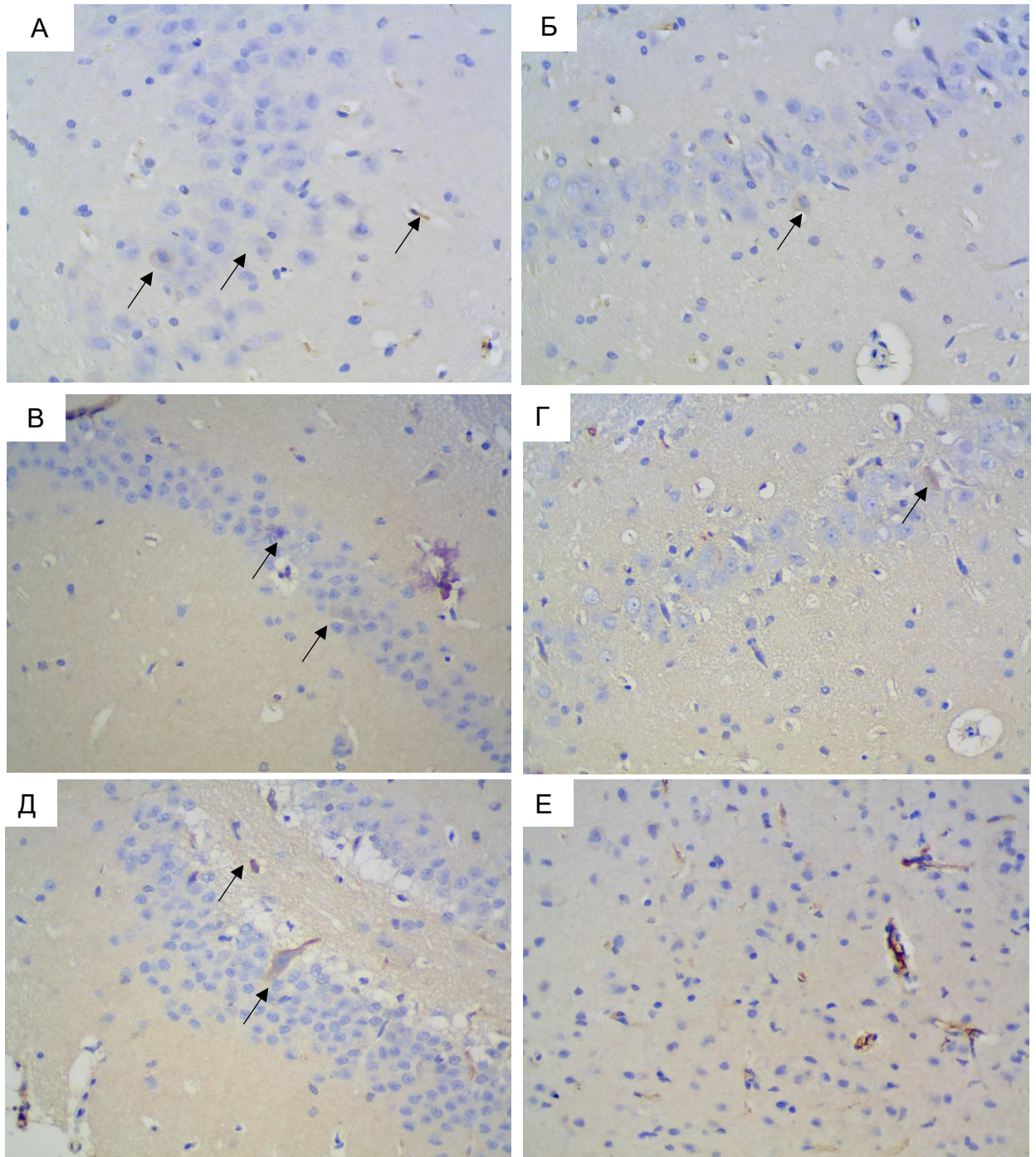


Рисунок 58. Экспрессия VEGFR-1 в гиппокампе мозга крыс контрольной группы. а, б – поле СА3; в, г – поле СА1; д – зубчатая извилина; е – молекулярный слой. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув. х400.

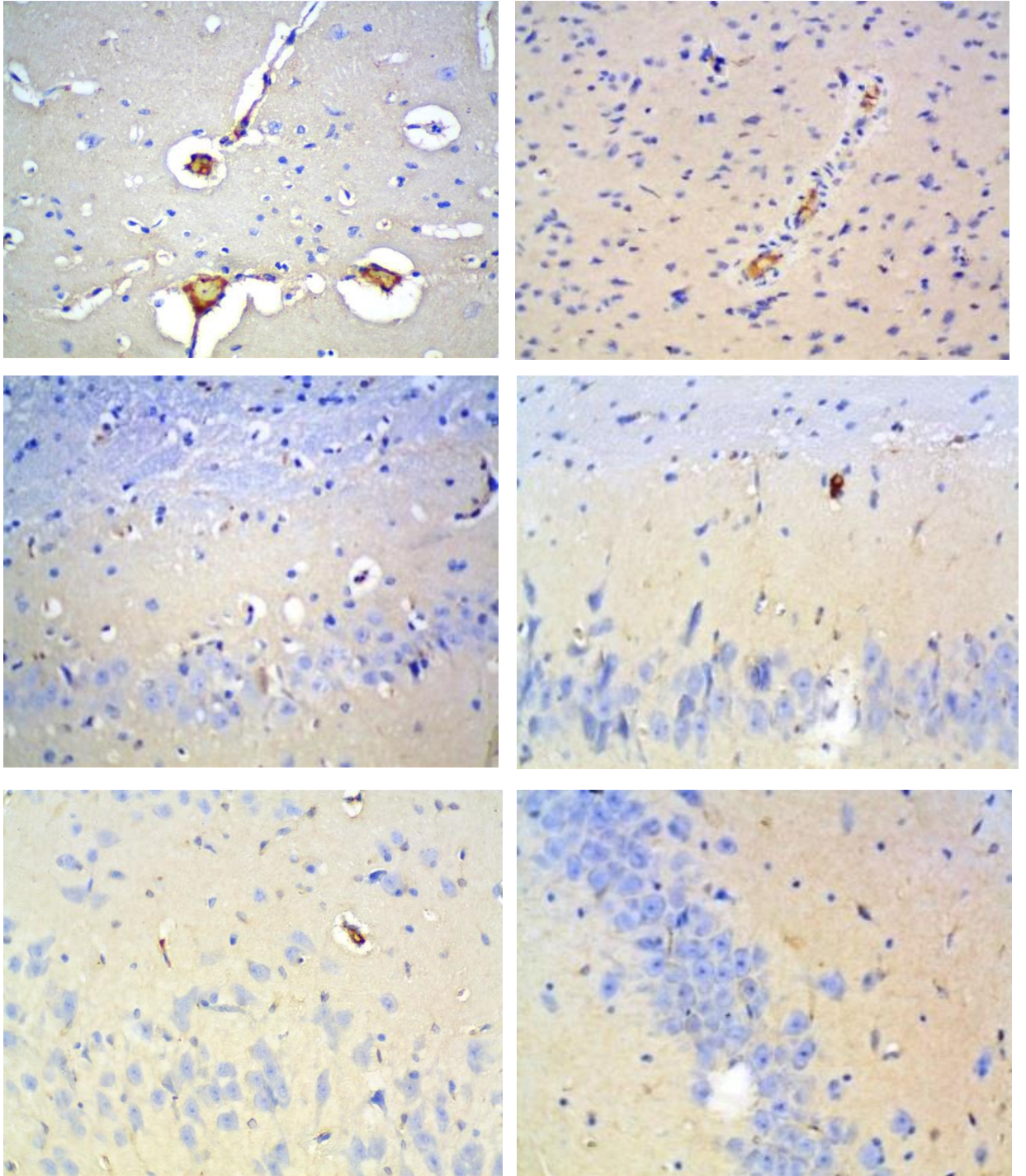
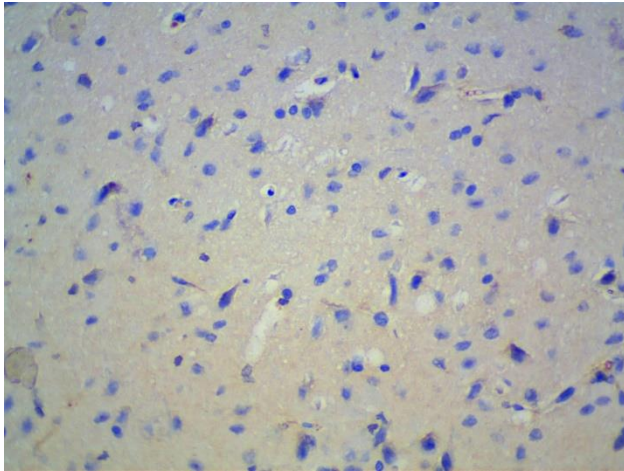


Рисунок 59. Экспрессия VEGFR-1 в гиппокампе мозга крыс опытной группы животных. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув.х 400.

контроль



ОПЫТ

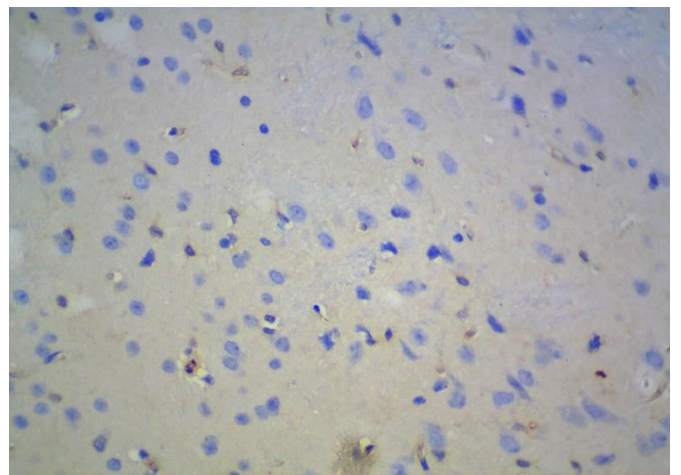
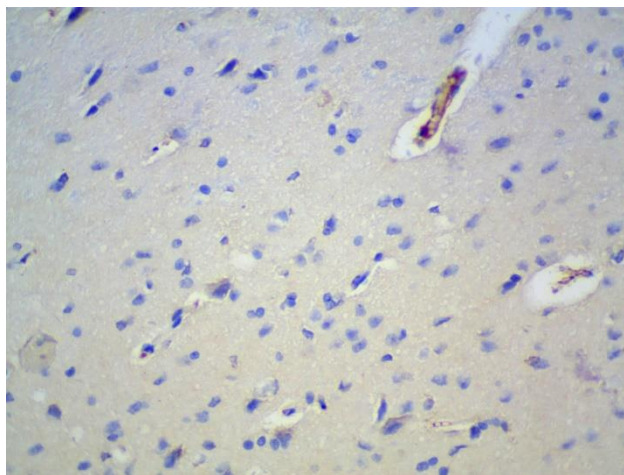
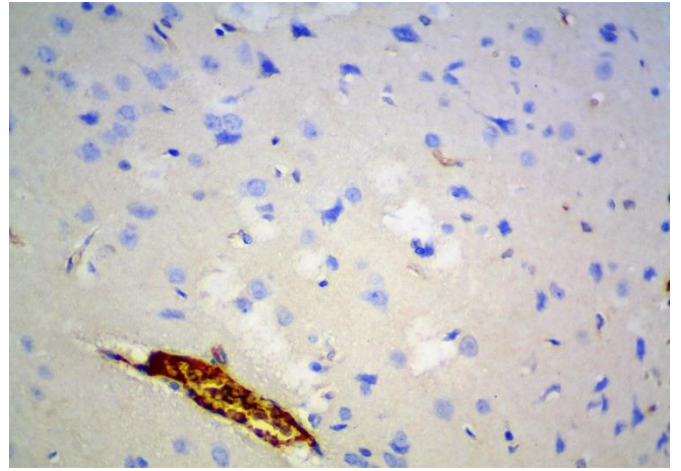


Рисунок 60. Экспрессия VEGFR-1 в ЦЯ МК головного мозга крыс контрольной и опытной групп животных. Непрямой иммунопероксидазный метод с подкраской гематоксилином. Ув.х 400.

3.4.2 Функциональные характеристики ЦНС

3.4.2.1 Показатели электроэнцефалографии головного мозга крыс

На полученных нами записях электроэнцефалограммы фронтальной и теменной областей коры крыс контрольной группы электрическая активность определялась в частотном диапазоне от 1 до 35 Гц. Изучение амплитудных характеристик ЭЭГ крыс контрольной группы показало, что средняя амплитуда ритмов фронтальной коры составила $10,33 \pm 1,22$ мкВ, а теменной – $19,33 \pm 3,99$ мкВ (табл. 11). Через 14 дней интраназального введения НЧ TiO_2 этот показатель снижался в обеих изученных областях коры ($p < 0,05$): средняя амплитуда электрической активности во фронтальной коре составила $8,57 \pm 1,65$ мкВ, в теменной - $13,28 \pm 3,71$ мкВ (рис. 61).

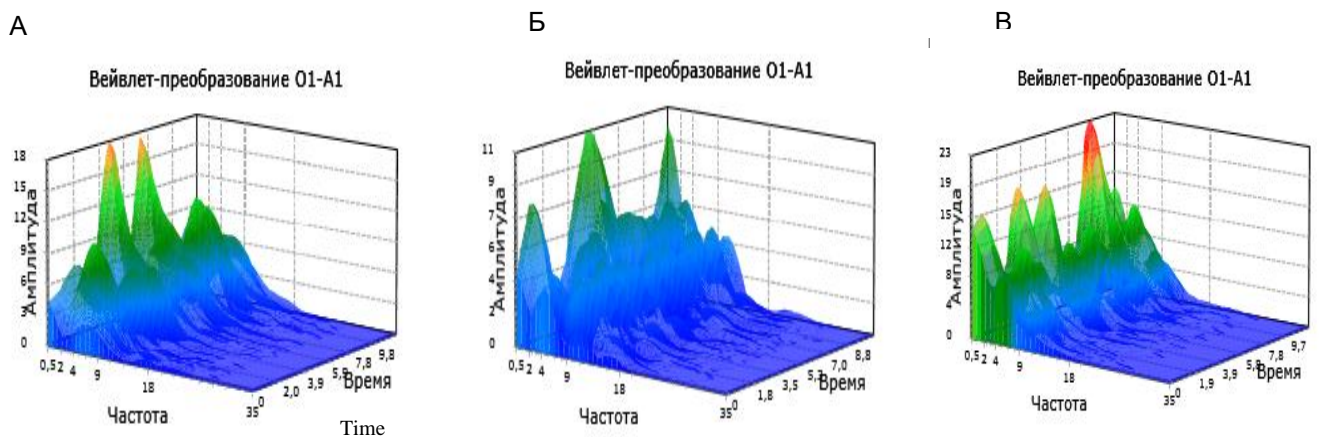


Рисунок 61. Вейвлет – спектрограмма сигнала фоновой ЭЭГ фронтальной области коры головного мозга крыс в контроле (а), на 14-й (б) и 30-й (в) дни интраназального введения НЧ TiO_2 .

Существует мнение, что снижение амплитуды ритмов ЭЭГ мозга может быть связано как с уменьшением количества нейронов и синаптических связей между ними, так и/или с нарушением локальной синхронизации между отдельными функционально связанными популяциями нейронов. Последнее может быть результатом сбоя ритма тормозных интернейронов, демиелинизации их отростков,

нарушения глутаматергической передачи и кортикокортикальных или кортико-таламо-кортикальных связей (Selemon L.D., Goldman-Rakic P.S., 1999; Lewis D.A. et al., 2005). Однако, к 30-му дню эксперимента средняя амплитуда ритмов префронтальной области коры повышалась и составила $12,00 \pm 1,00$ ($p < 0,05$).

Т а б л и ц а 11

Амплитуда ритмов фоновой ЭЭГ префронтальной, теменной областей коры головного мозга крыс и на 14-й и 30-й дни интраназального введения НЧ TiO₂ (M±Sd)

	префронтальная область коры			теменная область коры		
	фон	14 дней	30 дней	фон	14 дней	30 дней
Средняя амплитуда, мкВ	10,33	8,57	12,00	19,33	13,28	22,00
	±1,22	±1,65*	±1,00*	±3,99	±3,71*	±1,63

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с группой контроль ($p < 0,05$).

При изучении спектральных характеристик ЭЭГ крыс опытной группы выявлены выраженные изменения биоэлектрической активности нейронов префронтальной области коры головного мозга экспериментальных животных в виде преобладания медленноволновой активности θ – и Δ - диапазона, сопряженное с уменьшения относительной мощности α -, β_1 -, β_2 -ритмов (табл. 12). По мнению многих авторов, появление медленноволновых θ - и Δ -ритмов является неблагоприятным признаком, причем чем ниже их частота и выше амплитуда, тем более выражен патологический процесс, который согласно существующим представлениям возможно связан с дистрофическими, демиелинизирующими и дегенеративными поражениями головного мозга, снижением активизирующих влияний ствола головного мозга (Поворинский А. Г., Заболотных В. А., 1987; Javitt D.C. et al., 2008). Поскольку известно, что Δ -ритм (1-4 Гц) играет большую роль в реализации когнитивных задач, участвует в мотивационных ситуациях, связанных с опасностью или удовлетворением различных потребностей мозга, то увеличение мощности ритма на фоне интраназального введения НЧ TiO₂ свидетельствует об

увеличении поведенческой активности и усилении панического состояния животных (Kustubayeva A.M., 2012). Таким образом, обнаруженное нами увеличение соотношения θ - и Δ -ритмов во фронтальной коре головного мозга крыс на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 позволяет заключить о возможном развитии дегенеративных изменений, характерных для неврозоподобного синдрома.

Т а б л и ц а 12

Спектральные характеристики ритмов фоновой ЭЭГ префронтальной, теменной областей коры головного мозга крыс на 14-й и 30-й дни интраназального введения НЧ TiO_2 ($M \pm Sd$)

	Префронтальная область коры			Теменная область коры		
	контроль	14 дней	30 дней	контроль	14 дней	30 дней
Δ -ритм, 1-4 Гц	52,87 $\pm 2,51$	50,18 $\pm 4,9$	62,23 $\pm 5,27^*$	72,83 $\pm 2,79$	77,38 $\pm 5,14$	82,2 $\pm 3,22^*$
θ -ритм, 4-8 Гц	18,76 $\pm 1,08$	23,75 $\pm 1,51^*$	22,73 $\pm 0,88^*$	12,06 $\pm 2,06$	11,92 $\pm 2,26$	13,66 $\pm 1,78$
α -ритм, 8-14 Гц	13,01 $\pm 1,41$	12,71 $\pm 1,63$	8,05 $\pm 1,73^*$	3,05 $\pm 0,45$	3,62 $\pm 0,76$	4,7 $\pm 0,61^*$
β_1 -ритм НЧ, 14-24 Гц	6,89 $\pm 1,11$	5,85 $\pm 0,83$	4,03 $\pm 0,99^*$	1,3 $\pm 0,36$	2,9 $\pm 0,95^*$	1,75 $\pm 0,20^*$
β_2 -ритм ВЧ, 24-32 Гц	7,38 $\pm 2,11$	7,15 $\pm 0,94$	5,35 $\pm 0,61^*$	1,3 $\pm 0,41$	3,9 $\pm 1,64^*$	1,91 $\pm 0,49$

Таким образом, обнаруженное нами увеличение соотношения θ - и Δ -ритмов во фронтальной коре головного мозга крыс на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 позволяет заключить о возможном развитии нейродегенеративных изменений в изучаемой области коры, характерных для неврозоподобного синдрома.

3.4.2.2 Особенности поведения животных

Известно, что поведенческие реакции напрямую связаны с морфофункциональными характеристиками нейронов как ЦНС, так и периферической нервной системы. При анализе поведения исследователи уделяют внимание состоянию тревожности животных и признакам депрессивности. Именно тревожность является наиболее часто встречающимся спутником эмоционального напряжения, первой реакцией ЦНС на стрессор. Традиционно для моделирования подобных состояний используют поведенческие тесты, которые основаны на анализе спонтанного поведения при помещении животных в незнакомую для них среду. Ожидание потенциальной опасности и новизна окружающей среды в этих тестах и порождают тревожность и депрессию. Показано, что экзогенные вещества, сдвигающие баланс между процессами возбуждения и торможения в ЦНС, способны изменять поведенческие реакции в отношении тревожности. По этой причине нами была проведена оценка уровня тревожности крыс на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», являющийся одним из самых популярных тестов из всех имеющихся в настоящее время. Этот тест используется в качестве скринингового теста во многих нейробиологических исследованиях тревожности (Amara S. et al., 2015).

Результаты проведенного исследования показали, что через 14 дней эксперимента крысы значительно больше времени проводили в закрытом рукаве лабиринта по сравнению с контролем (табл. 13). Этот факт, в совокупности с боязнью животных высоты (уменьшение числа свешиваний), указывает на то, что интраназальное введение НЧ TiO_2 вызывает повышение степени тревожности крыс. Кроме того, у животных повышается уровень исследовательского поведения, на что указывает увеличение числа стоек как в светлом, так и в темном рукавах лабиринта ($p < 0,05$). А увеличение количества выглядываний на 14-й и 30-й дни эксперимента по сравнению с контрольной группой, является признаком возрастания сложности принятия решения. В совокупности эти параметры по

сложившемуся представлению свидетельствуют об увеличении уровня тревожности животных.

Т а б л и ц а 13

Характеристики поведения крыс в приподнятом крестообразном лабиринте у контрольной группы и на 14-й, 30-й дни интраназального введения НЧ TiO₂ (M±Sd)

	Контроль	14 дней	30 дней
Количество свешиваний, <i>шт</i>	14,5±1,61	11,8±1,84*	11±1,71*
Количество выглядываний, <i>шт</i>	3,33±0,84	5,33±0,89*	5,62±1,07*
Количество стоек в открытом рукаве, <i>шт</i>	2,48±0,83	2,91±0,61	4,83±1,35*
Количество стоек в закрытом рукаве, <i>шт</i>	5,02±1,6	6,50±1,23	7,66±1,60*
Время нахождения в открытом рукаве, <i>с</i>	228,66±21,62	184,21±11,53*	173,33±26,09*
Время нахождения в закрытом рукаве, <i>с</i>	71,33±21,62	115,5±11,53*	126,66±26,09*

Таким образом, полученные нами данные о влиянии НЧ TiO₂ свидетельствуют о том, что они оказывают негативное влияние на функции ЦНС, что хорошо согласуется с результатами других исследований, подтверждающих, что НЧ способны вызывать нейротоксический эффект.

Обнаруженные нами поведенческие особенности у этих животных помимо изменения биоэлектрической активности нейронов головного мозга можно объяснить также уменьшением содержания некоторых нейромедиаторов, таких как норадреналина, дофамина и его метаболитов в условиях воздействия НЧ (Zhang L. et al., 2012).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что НЧ TiO₂ при интраназальном введении крысам оказывают негативное влияние не только на структурные характеристики изученных зон мозга и функции ЦНС, что хорошо согласуется с результатами других исследований, которые показали, что хроническое нейровоспаление и нарушение функционирования ГЭБ, вызванное НЧ TiO₂ приводит к гибели нейронов, когнитивным нарушениям и нейрональной дисфункции (Feng X.L et al., 2015; Notter T. et al., 2018).

Обобщая полученные данные изучения морфофункциональных характеристик гиппокампа и МК головного мозга можно заключить, что при интраназальном введении НЧ TiO_2 вызывают дегенеративные изменения нейронов, активацию астроглии, что негативно сказывается на функциональном состоянии нейронов (увеличивается амплитуда ритмов ЭЭГ и преобладает медленноволновая активность нейронов префронтальной коры, повышается уровень тревожности крыс). Обнаруженные изменения в совокупности с результатами иммуногистохимического исследования можно отнести к нейродегенеративным расстройствам, вызванным интраназальным введением исследуемых НЧ. Вместе с тем увеличение чувствительности ряда клеток изученных структур мозга к VEGF, одной из функций которого является поддержание в нативном состоянии микроциркуляторного русла, свидетельствует о развитии в мозге процессов адаптации в ответ на действие НЧ.

3.5 Репродуктивная система крыс

в условиях введения наночастиц диоксида титана

3.5.1 Структурно-функциональная характеристика семенников

Результаты исследования показали, что морфологическая картина семенников крыс контрольной группы соответствовала типичной для этих животных. На гистологических препаратах четко визуализируются плотно расположенные ИСК округлой формы (рис. 63). Пространство между ИСК заполнено интерстициальной тканью, содержащей клетки Лейдига, расположенные вокруг сосудов микроциркуляторного русла. На базальной мембране СЭ определяются сперматогенные клетки на разных стадиях сперматогенеза, связанные с клетками Сертоли.

При исследовании семенников крыс, подвергшихся воздействию НЧ TiO_2 , были выявлены выраженные морфологические изменения в тканях органа (рис. 63). Так, к 14-му дню эксперимента в ИСК отмечались дистрофические изменения СЭ, проявляющиеся в его деструкции: появлении пустот в цитоплазме клеток Сертоли и отрыве сперматогенного эпителия от базальной мембраны. Возможно, что вакуолизация косвенно свидетельствует о нарушении интегративных связей развивающихся гамет и sustentоцитов, причем к 30-му дню экспериментального воздействия указанные морфологические изменения были более выраженными. Кроме того, в указанные сроки было отмечено резкое уменьшение числа зрелых сперматид, в результате чего эпителиосперматогенный слой был представлен только тремя генерациями половых клеток: сперматогонии, сперматоциты первого и второго порядков. Отсутствие зрелых сперматид в семенниках животных опытных групп нашло отражение в изменении морфометрических параметров СЭ (рис. 62). Установлено, что в семенниках обеих опытных групп снижается толщина СЭ, что может свидетельствовать о негативном воздействии НЧ TiO_2 на структурные характеристики семенников, связанное с уменьшением количества клеток в эпителии. Естественно, что такие изменения не могут не сказаться на процессах сперматогенеза. На угнетение сперматогенеза косвенно указывает и уменьшение

диаметра ИСК к 14–му дню эксперимента. К 30-му дню наблюдений отмечается тенденция увеличения указанного параметра, что по-видимому связано с вакуолизацией клеток Сертоли, дезорганизацией слоев и отрыва сперматогенных клеток от базальной мембраны.

Результаты проведенного сравнительного морфометрического анализа площади ядра клеток Лейдига на фоне введения НЧ TiO_2 показали, что по сравнению с контрольной группой, значение данного параметра уменьшается ($p < 0,05$).

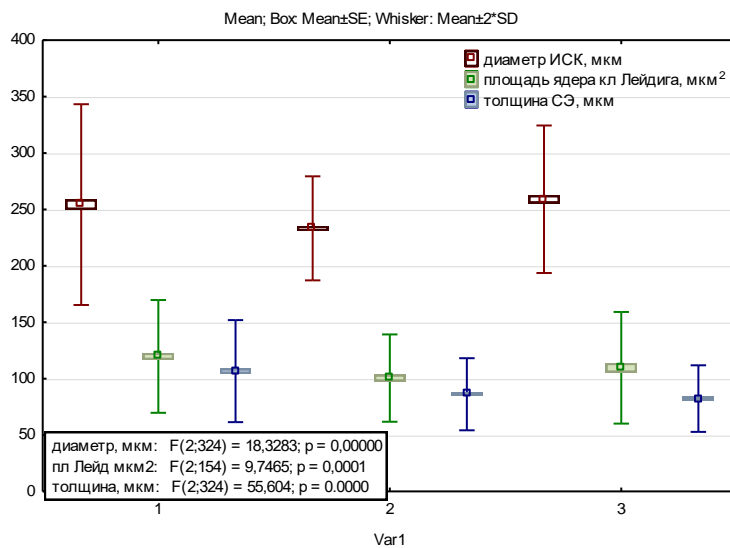
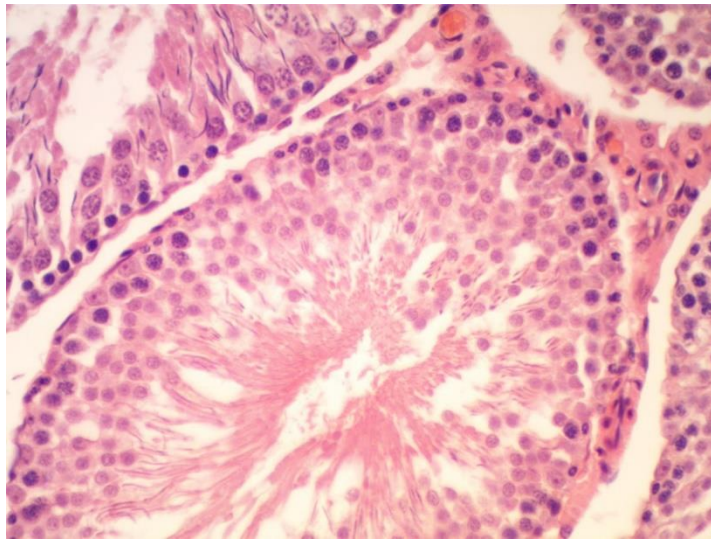


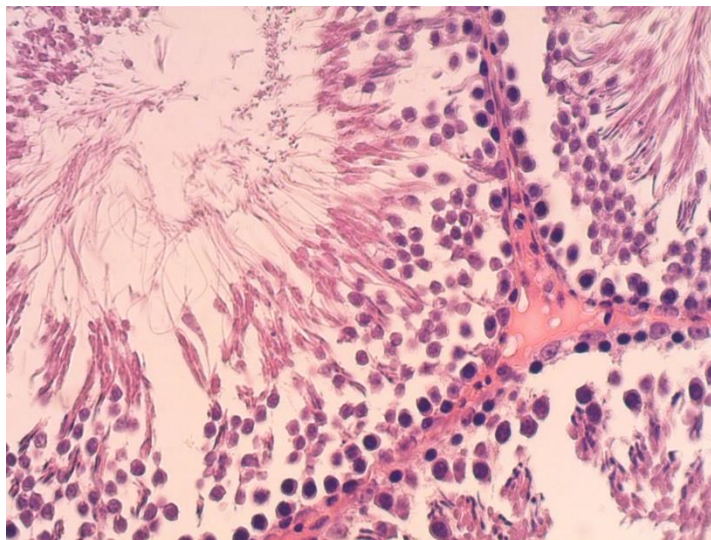
Рисунок 62. Морфометрические показатели семенников крыс в условиях воздействия НЧ TiO_2

Полученные нами сведения о структурных характеристиках семенников опытных групп животных хорошо соотносятся с результатами, полученными при использовании иммуногистохимических маркеров. Иммуногистохимическое типирование позволило обнаружить, что максимальные изменения были выявлены нами на сроке 30 дней от начала эксперимента. При выявлении маркеров пролиферации Ki-67 нами было показано, что в условиях воздействия НЧ TiO_2 в течение 30 дней наблюдалось снижение уровня экспрессии этого маркера (рис.64, 66), что свидетельствует о нарушении процессов пролиферации клеток сперматогенного эпителия. Аналогичная картина наблюдалась нами при анализе экспрессии маркера стволовых клеток c-kit (рис.66): к 30-му дню от начала экспериментального воздействия количество клеток, содержащих этот маркер, существенно снижался по сравнению с интактными животными.

контроль



14 дней



30 дней

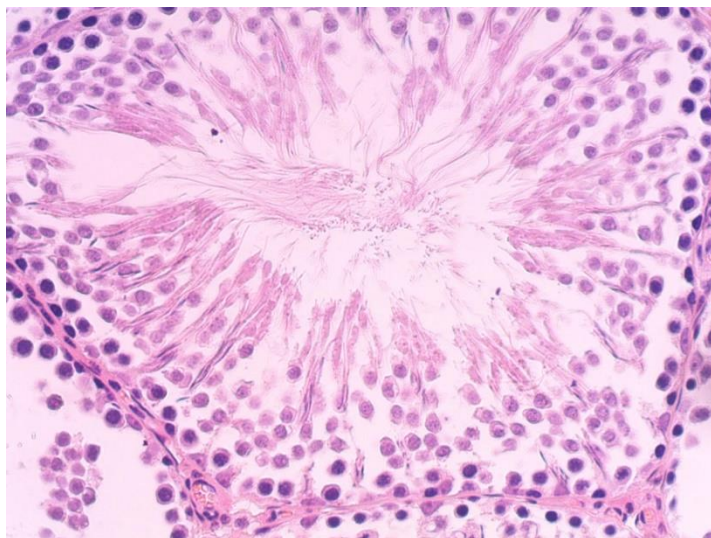


Рисунок 63. Извитые семенные канальца семенников крыс контрольной (а) и опытной (б, 30 дней) групп животных. Окраска гематоксилином эозином. Ув.х100

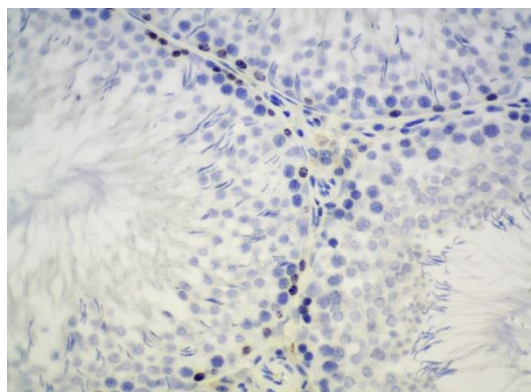
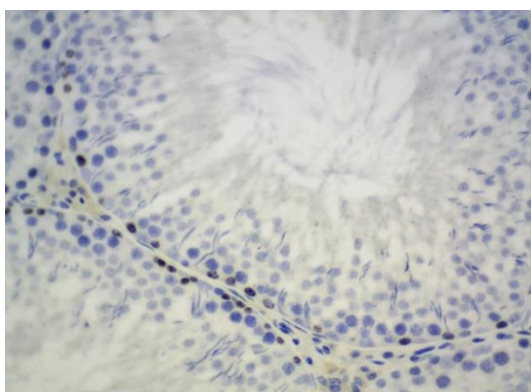
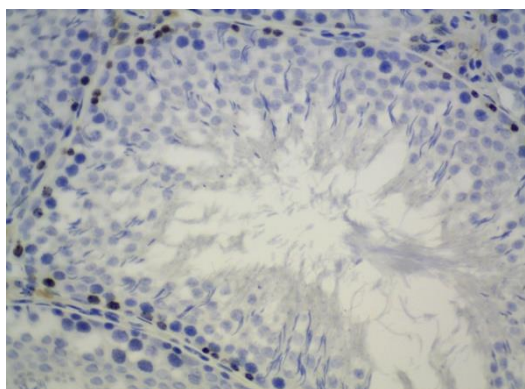
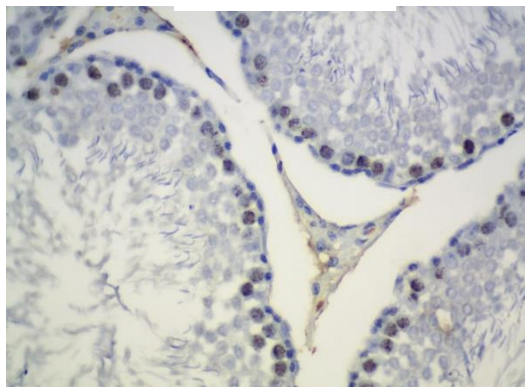
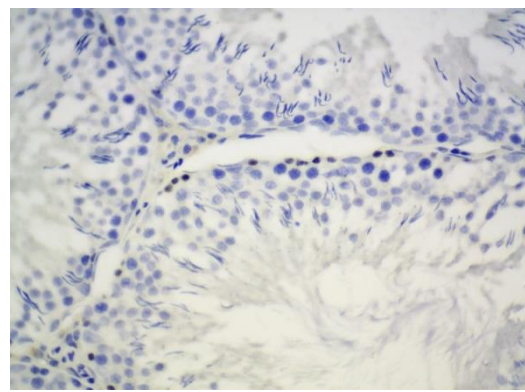
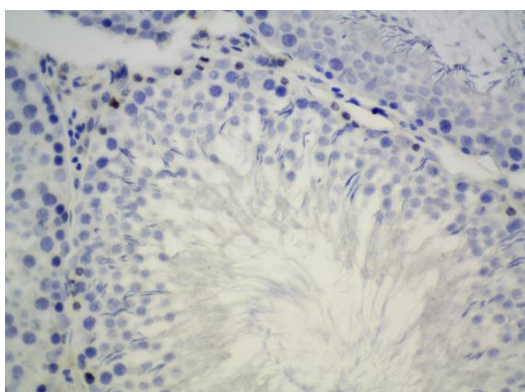
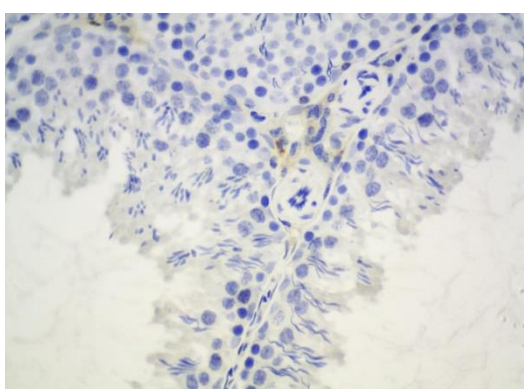
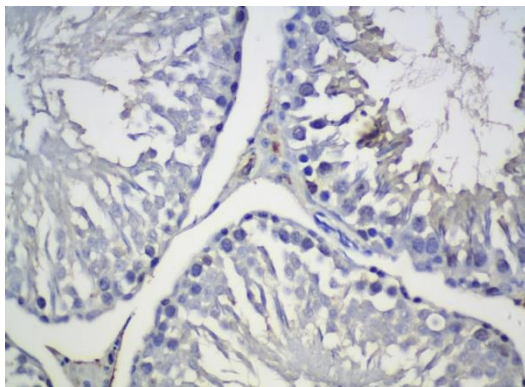
контроль**опыт**

Рисунок 64. Извитые семенные канальца семенников крыс контрольной и опытной (30 дней) групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к Ki-67. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.400

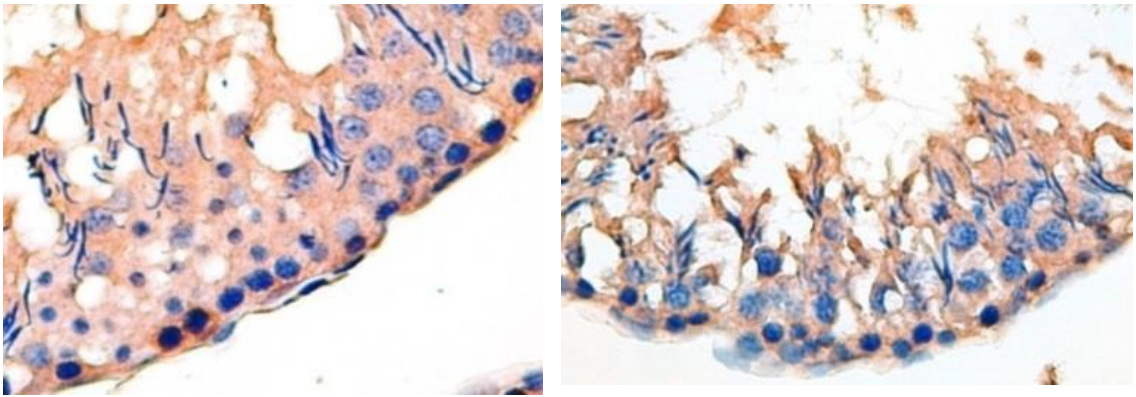


Рисунок 65. Извитые семенные канальца семенников крыс контрольной и опытной (30 дней) групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к рецептору c-kit. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.400

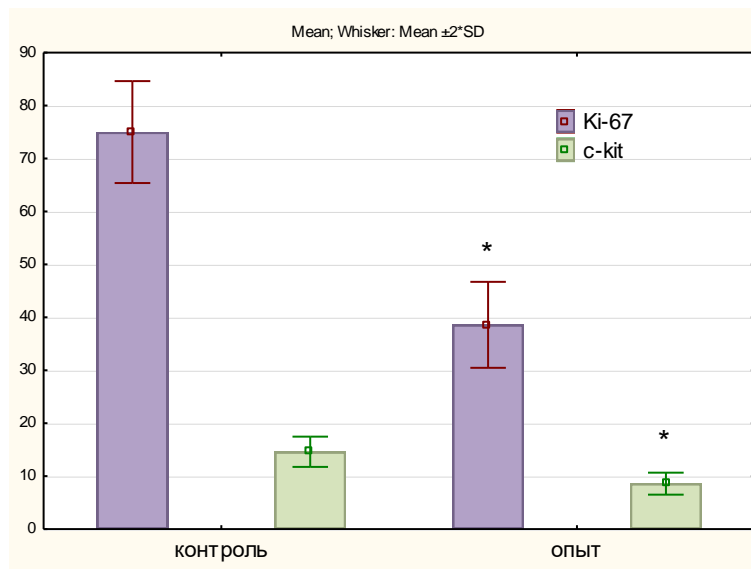


Рисунок 66. Доля Ki-67- и c-kit-иммунопозитивных клеток в ИСК семенников животных контрольной и опытной групп

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показывают, что негативное действие НЧ TiO₂ на морфологические параметры семенников крысы затрагивает ключевые для этой структуры характеристики, такие как, пролиферативная активность клеток и их способность к дифференцировке. В наших экспериментальных условиях обнаруживались и специфические структурные изменения, свидетельствующие о неблагоприятном влиянии изучаемых НЧ на репродуктивную систему самцов крыс. Суммарный эффект обнаруженных нами изменений в семенниках крыс – это нарушение процессов

сперматогенеза. Однако полученные результаты проведенных нами исследований могут свидетельствовать не только о прямом воздействии НЧ TiO₂, но и являться следствием их влияния на гуморальные системы организма, что требует проведения дальнейших исследований. Результаты проведенного нами исследования хорошо согласуются с уже имеющимися сведениями о высокой чувствительности органов мужской репродуктивной системы к действию различных дестабилизирующих факторов, в том числе и наноматериалов (Jia F. et al., 2014; Morgan A.M., Ibrahim M.A., Noshay P.A., 2017).

3.5.2 Эффекты антенатального воздействия НЧ TiO_2 на эмбриональное и раннее постнатальное развитие

3.5.2.1 Токсические эффекты наночастиц диоксида титана, регистрируемые в антенатальном периоде развития

При наблюдении состояния беременных крыс в динамике не было выявлено клинических признаков интоксикации, таких как угнетения двигательной активности, гиперемии видимых слизистых оболочек, взъерошенности шерсти, снижения реакции на внешние раздражители и массы тела. Потребление воды и пищи животными опытной и контрольной групп не отличались. За все время наблюдения не было зафиксировано случаев патологического прерывания беременности в одном случае.

Результаты проведенного исследования показали, что крысы как контрольной, так и опытной групп на всем сроке беременности прибавляли вес. На 7-й, 14-й дни беременности существенных различий по этому показателю по сравнению с контрольной группой обнаружено не было ($p > 0,05$). Однако, к третьей недели беременности самки крыс опытной группы имели меньший вес, чем крысы контрольной группы ($p < 0,05$): общий прирост массы к исходной, по окончании эксперимента составил $29 \pm 2,5\%$ для контрольной группы и $25 \pm 2,8\%$ - для опытной (рис. 67).

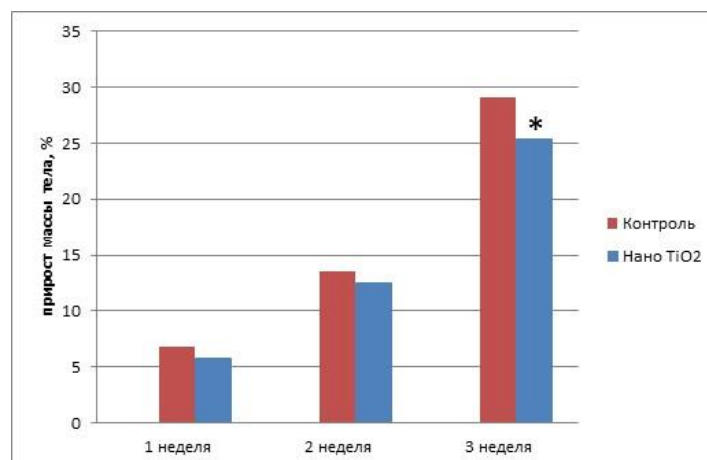


Рисунок 67. Динамика массы тела беременных крыс (+% к исходной).

На момент вскрытия все плоды в группах были живы и развиты соответственно сроку беременности. Результаты исследований свидетельствуют о том, что у самок крыс, получавших НЧ TiO_2 , такие показатели как продолжительность беременности, количество желтых тел, количество живых плодов и мест имплантации не отличались от соответствующих показателей интактных животных ($p > 0,05$) (табл. 14).

Однако, пренатальное введение НЧ TiO_2 приводит к существенному повышению таких показателей, как предимплантационная гибель зигот, постимплантационная гибель эмбрионов и общая эмбриональная смертность.

Т а б л и ц а 14

Результаты исследования влияния перорального введения крысам НЧ TiO_2 в течение всего срока беременности на эмбриональное развитие потомства ($M \pm Sd$)

Исследуемые показатели	Контроль	Опыт
Количество желтых тел на 1 крысу, <i>шт</i>	$10,5 \pm 1,38$	$11,2 \pm 1,51$
Количество мест имплантации на 1 крысу, <i>шт</i>	$9,40 \pm 1,25$	$9,13 \pm 1,18$
Количество плодов на 1 крысу, <i>шт</i>	$8,5 \pm 1,24$	$8,02 \pm 1,05$
Предимплантационная смертность, %	10,48	18,48*
Постимплантационная смертность, %	9,57	12,16*
Общая эмбриональная смертность, %	19,05	28,39*
Кранио-каудальный размер плода, <i>см</i>	$2,8 \pm 0,05$	$2,97 \pm 0,04$
Масса плода, <i>г</i>	$1,95 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,01$

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Обнаружено, что в результате введения НЧ TiO_2 в антенатальный период развития на 76,34% повышается предимплантационная гибель зигот (табл. 16), на 27,06 % – постимплантационная гибель эмбрионов и на 49,03% – общая эмбриональная смертность, что свидетельствует о негативном влиянии исследуемых НЧ на антенатальное развитие потомства, приводящее к снижению их внутриутробной выживаемости. Первые стадии беременности – периоды зачатия и завершения плацентации – являются наиболее чувствительными к повреждающим факторам у млекопитающих и человека. Характерным признаком

предимплантационного периода развития является отсутствие морфологической связи между эмбрионом и матерью. Обнаруженные нами отклонения эмбриогенеза от нормального и, в частности, повышение предимплантационной смертности являются, по-видимому, суммарными последствиями как опосредованного, так и прямого действия НЧ TiO_2 на развивающийся плод.

Постимплантационная смертность определяется количеством участков резорбции эмбрионов в матке, которые после гибели вместе с окружающими его оболочками обезвоживаются и подвергаются аутолизу. У самок, получавших НЧ TiO_2 во время беременности, по сравнению с контролем наблюдается тенденция уменьшения количества мест имплантаций и живых плодов, что указывает на увеличение числа резорбций (табл.14). На рисунке 68 представлены результаты вскрытия матки крысы опытной группы с участками резорбций, определяющиеся как уплотнения черного цвета размером 7-8 мм.

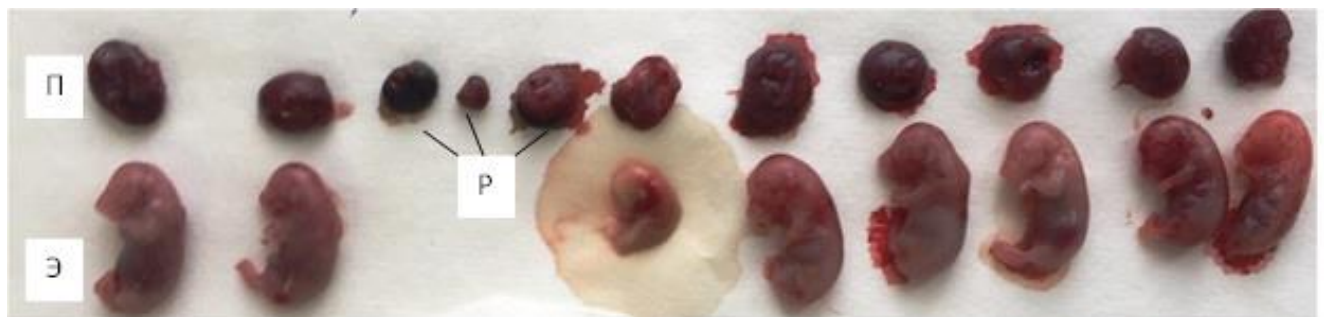


Рисунок 68. Результаты вскрытия матки крысы опытной группы. Обозначения: П – плацента, Р – участки резорбций, Э – эмбрион

При оценке влияния изучаемого препарата на антропометрические показатели плодов крыс установлено, что введение крысам на протяжении всего периода беременности изучаемого соединения не вызывало статистически значимых изменений кранио-каудального размера и веса плодов (табл. 17).

При морфометрическом исследовании потомства крыс установлено, что только среди плодов опытной группы встречаются случаи гиперемии кожных покровов с сопутствующим поражением сосудов (кровоизлияния, гематомы).

Таким образом, пероральное введение НЧ TiO_2 беременным самкам крыс оказывает выраженное эмбриотоксическое действие, которое выражается в

значимом увеличении показателей эмбриотоксического эффекта — предимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности.

3.5.2.2 Эффекты воздействия НЧ TiO₂ в антенатальный период на раннее постнатальное развитие потомства

Хорошо известно, что при введении ксенобиотиков, как чужеродных для живых организмов химических веществ, во время беременности, их отрицательное влияние может проявляться не только в гибели и уродствах эмбрионов, но и в разнообразных отклонениях развития, наблюдаемых в постнатальный период (Вокон Д.А. et al., 2015). Поэтому при изучении эмбриональной токсичности обязательными являются исследования возможного неблагоприятного антенатального воздействия изучаемых соединений на развитие потомства в раннем постнатальном периоде онтогенеза. В связи с этим, изучены отдаленные эффекты воздействия НЧ TiO₂ в антенатальный период на раннее постнатальное развитие потомства. Проводилось наблюдение за 88 крысятами контрольной группы, 83 крысятами опытной группы.

Установлено, что пероральное введение НЧ TiO₂ не влияет на продолжительность беременности самок, которая составила в среднем 22-23 дня. Среднее количество плодов на одну самку и соотношение крысят по полу во всех группах было одинаковым.

Однако, наблюдение за потомством самок крыс в течение месяца позволило установить, что развитие крысят в опытной группе и контроле происходит с некоторыми отличиями. Прежде всего, эти различия затронули важные основополагающие показатели эмбриогенеза, которые позволяют судить о характере и выраженности действия ксенобиотиков. К ним можно отнести постнатальную смертность и прирост массы тела (табл. 15). В опытной группе крыс, гибель крысят в период вскармливания была выше, чем в группе контроль ($p < 0,05$). Взвешивание крысят на 4-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после родов показало,

что масса тела крысят в группе крыс, которым перорально вводили НЧ TiO_2 была ниже.

Т а б л и ц а 15

Влияние перорального введения НЧ TiO_2 самкам крыс во время беременности на постнатальное развитие потомства ($M \pm Sd$)

Исследуемые показатели	Контроль	Опыт
Среднее число крысят на самку при рождении	8,8±1,5	8,3±1,8
Число мертвых крысят	8,8±1,5	8,3±1,8
Гибель крысят в период вскармливания, %	6,81%	13,97%*
Соотношение полов (самки/самцы)	1,29	1,33
День отлипания ушной раковины	4,09 ± 0,5	4,68 ± 0,5*
День появления первичного волосяного покрова	5,71 ± 0,23	5,48 ± 0,15*
День прорезывания резцов	10,75 ± 1,71	11,5 ± 1,8*
День открытия глаз	15,87 ± 1,04	16,9 ± 2,4*
Масса тела крысят на 4-й день, г	8,07 ± 0,3	7,45 ± 0,2*
Масса тела крысят на 7-ый день, г	14,03 ± 0,2	13,15 ± 0,3 *
Масса тела крысят на 14-ый день, г	18,06 ± 1,7	16,60 ± 1,04*
Масса тела крысят на 21-ый день, г	27,51 ± 2,3	25,5 ± 1,5*
Гибель самок в период вскармливания	0	0

В опытной группе нами было обнаружено, что основные морфологические признаки созревания крысят, такие как отлипание ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открывание глаз ($p < 0,05$) формировались позже, чем у крыс контрольной группы (табл. 15).

Таким образом, при изучении антенатального воздействия НЧ TiO_2 на постнатальное развитие потомства было выявлено повышение смертности крысят в период их вскармливания, отставание в наборе веса и задержка морфофункционального созревания на постнатальном этапе онтогенеза.

Обобщая полученные данные следует отметить, что несмотря на существование гематических барьеров, которые в целом достаточно эффективно защищают развивающийся организм от вредных влияний, исследованные нами НЧ TiO_2 оказывают существенные эмбриотоксические эффекты, в том числе и отсроченные по их проявлению у подвергшегося антенатальному воздействию потомства.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффекты влияния НЧ TiO_2 , в том числе и токсические, молекулярные механизмы их воздействия на различные ткани организма в последние годы активно изучаются. На различных моделях показано, что воздействие НЧ TiO_2 приводит к повышенной генерации АФК многими клетками организма, что является одним из основных повреждающих факторов для большинства из них (Sha B. et al., 2013; Azim S.A. et al., 2015; Suker D.K., Jasim F.A. et al., 2018). Выявлено, что НЧ TiO_2 вызывают усиление ПОЛ, активацию ряда каспаз, в конечном итоге повреждение ДНК и, как следствие этого, последующую апоптотическую гибель клеток (Pele L.C., 2015; Zhang Z. et al., 2018). В качестве определяющего фактора неблагоприятных последствий воздействия НЧ TiO_2 в литературе выделяют размер и кристаллическую фазу. Две аллотропные формы НЧ – анатаз и рутил – имеют разные поверхностные свойства и реакционную способность. В зависимости от кристаллической структуры токсические свойства НЧ TiO_2 могут варьировать. На сегодняшний день в литературе существует противоречивая информация относительно негативных эффектов разных кристаллических форм НЧ TiO_2 . Показано, что анатазная структура НЧ TiO_2 в 100 раз более токсична, чем его рутильная форма (Xue Y., 2010; Smith M.A. et al., 2014). Обе фазы – анатаз и рутил – широко используются при производстве солнцезащитных кремов, красок, пластмасс, бумаги и др. Однако последняя, ввиду более высокой поглощающей способности, твердости и химической стойкости, используется гораздо чаще. Вместе с тем в последние годы появились данные о сходных по силе и направленности эффектах этих форм НЧ TiO_2 (Xu Y. et al., 2017), в связи с чем, возникает необходимость изучения последствий воздействия НЧ TiO_2 рутильной модификации на клетки и ткани организма. Кроме того, в большинстве работ авторы не всегда уточняют кристаллическую фазу НЧ, что затрудняет интерпретацию данных и указывает на дефицит информации относительно неблагоприятных эффектов различных форм НЧ TiO_2 .

Основные пути поступления в организм НЧ, как и любых ксенобиотиков, – желудочно-кишечный тракт, кожа и дыхательные пути. В экспериментах показано, что НЧ TiO_2 легко проникают в организм при вдыхании, после чего накапливаются в головном мозге, проходя гематоэнцефалический барьер, и обнаруживаются преимущественно в гиппокампе и коре головного мозга (Wang J., 2008), где они контактируют с различными клетками ЦНС, вызывая апоптоз, повреждение органелл клетки, сигнальных путей, нарушение регуляции синаптической пластичности, окислительный стресс (ОС) и даже воспалительную реакцию (Hu R.P. et al., 2011; Marazziti D. et al., 2012; Li J. et al., 2013; Feng X.L. et al., 2015). Обнаружено, что НЧ TiO_2 вызывают нейровоспалительный ответ, о чем свидетельствует повышение уровня противовоспалительных цитокинов, высвобождаемых активированной микроглией мозга мышей (Su M. et al., 2015). Выявлено нарушение экспрессии генов, связанных с сигнальными путями нейротропина, такими как фактор роста нервов (NGF) и нейротрофический фактор мозга (BDNF). В экспериментах *in vitro* показано, что НЧ TiO_2 (20 нм) повышают образование агрегатов бета-амилоидного пептида в нейронах ЦНС, который является отягчающим фактором развития нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, НЧ TiO_2 способны вызывать дисбаланс между процессами образования и инактивации свободных радикалов: повышение образования АФК, индуцированное воздействием НЧ, превосходит способность биологических антиоксидантов предотвращать ОС, что в конечном счете приводит к нарушениям функций ЦНС.

Наиболее чувствительной к любым неблагоприятным воздействиям среды является иммунная система, представленная тимусом, селезенкой, лимфатическими узлами, а также система крови (Ерофеева Л. М. и др., 2005; Васендин Д. В., 2011; 2014; Бгатова Н.П. и др., 2014; Кварацхелия А.Г. и др., 2016; Susan A. Elmore, 2012; Ngobili T.A., Daniele M.A., 2016). Вместе с тем данные о морфофункциональных изменениях лимфоидных органов при воздействии НЧ TiO_2 носят фрагментарный характер. Уже хорошо известно (Рассказова В.Ю. и др., 2013; Златник, Е.Ю. и др., 2017) что результатом негативного воздействия

различных НЧ на иммунную систему человека является угнетение ее функций и как следствие этого увеличение частоты и тяжести инфекционных заболеваний, а также повышение риска злокачественных новообразований (Бородин Ю.И. 1993; Бгатова, Н.П. и др., 2014; Wang X. et al., 2013; Ngobili T.A., Daniele M.A., 2016). Кроме того, нарушение иммунологических функций организма, вызванное воздействием НЧ, может спровоцировать развитие аллергических и аутоиммунных заболеваний (Шевелева С.А. и др., 2010; van Loveren H. et al., 1996). Это связано, в том числе, и с процессами, происходящими в этих условиях в тимусе (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000; Акмаев И.Г., 2001; Лебединская Е.А. и др., 2016; Бобрышева И.В., Кащенко С.А., 2017; Ngobili T.A., Daniele M.A., 2016; Hong F. et al., 2017), который является одним из ключевых звеньев иммунной системы, обеспечивающим антигеннезависимую дифференцировку Т-лимфоцитов и секрецию гормонов, поддерживающих численность этих клеток. По этой причине тимус особенно восприимчив к действию различных токсикантов, в том числе как за счет непосредственного контакта с ними, так и за счет высвобождения высоких доз глюкокортикоидов (Кварацхелия А. Г. и др., 2016; Susan A. Elmore, 2012). Вот почему любые негативные изменения его структурно-функциональных характеристик под воздействием тех или иных токсикантов могут иметь для организма фатальные последствия. Однако, до сих пор нет полных сведений о структурных нарушениях в этой железе при воздействии наноматериалов, в частности НЧ TiO_2 , что объясняется, в том числе, и низкой информативностью применяемых ранее классических морфологических подходов.

Нами установлено, что под воздействием НЧ TiO_2 в тимусе крыс обнаруживаются признаки акцидентальной инволюции со снижением объемной доли коркового вещества, усилением гибели лимфоцитов по пути апоптоза, снижением интенсивности пролиферации клеток, приводящее к падению численности лимфоцитов в тимусе с одновременным возрастанием содержания $CD68^+$ макрофагов. Выявленные морфофункциональные изменения могут быть связаны в том числе с повреждением ДНК лимфоцитов, что проявляется в обнаруженном нами снижении их пролиферативной активности и усилением

апоптоза. Наши данные хорошо согласуются с результатами проведенных в последние годы исследований токсического действия НЧ TiO_2 на других моделях (Dua Y. et al., 2010; Moon E.Y. et al., 2011), которые свидетельствуют об их иммуносупрессивном действии. Так, при изучении влияния НЧ TiO_2 на иммунные клетки и рост клеток меланомы B16/F10 у мышей Мун Е. и соавт. (2011) обнаружили угнетение пролиферации В- и Т-лимфоцитов, усиление процессов апоптоза различных видов клеток, активацию макрофагов, а также значительное увеличение размера опухоли (Moon E.Y. et al., 2011). В другой работе обнаружено снижение активности В- и Т-лимфоцитов (Т-хелперов, Т-цитотоксических/супрессоров, а также изменение их соотношения в печени), усиление процессов апоптоза и активация макрофагов.

Обнаруженное нами уменьшение площади коркового вещества тимуса при воздействии НЧ TiO_2 может свидетельствовать о снижении его функциональных возможностей и является стереотипным ответом на различные антигенные и стрессорные воздействия (Зайратьянц О.В., Берщанская А.М., 1998; Косырева А.М. и др., 2016; Пауков В.С. и др., 2018). Уменьшение числа лимфоцитов в корковом веществе тимуса в конечном итоге может привести к сокращению их популяции и в периферической крови, что было показано нами при исследовании соотношения разных видов лейкоцитов (лейкоцитарного профиля) крови крыс на фоне перорального введения НЧ TiO_2 . Развивающаяся в тимусе акцидентальная инволюция является стереотипным реактивным процессом, который развивается при тяжелых патологических стрессах и воспалительных заболеваниях и сопровождается снижением количества лимфоцитов за счет их активной миграции и гибели, что в сочетании с результатами анализа гематологических показателей может свидетельствовать о развитии декомпенсированного вторичного иммунодефицита (Макарова О.В., Постовалова Е.А., 2018).

В качестве одной из причин негативного эффекта НЧ TiO_2 , как уже отмечалось выше, рассматривается индукция образования активных форм кислорода в большинстве различных клеточных типах организма, а иммунокомпетентные клетки являются высокочувствительными к действию

свободных радикалов, которые вызывают в них развитие окислительного стресса (Park E. et al., 2008).

Еще одним важным звеном органов иммунной защиты, обеспечивающим развитие как клеточного, так и гуморального иммунитета является селезенка. Проведенное нами исследование структурных особенностей селезенки крыс продемонстрировало, что пероральное введение НЧ TiO_2 приводит к редукции белой пульпы с уменьшением абсолютного количества клеток и плотности их расположения, обусловленной снижением пролиферативного потенциала клеток и повышением активности апоптоза; гиперпластической реакции с расширением герминативных центров лимфоидных узелков (атрофия В-зон); увеличению числа макрофагов в красной пульпе.

Полученные нами данные в целом согласуются с результатами других исследований (Li N. et al., 2010; Sheng L., et al., 2014), в которых показано, что при ежедневном внутрибрюшинном введении мышам НЧ TiO_2 в течение 45 дней наночастицы обнаруживаются в селезенке, что приводит к гиперемии красной и белой пульпы, усилению пролиферативных процессов в лимфатических узелках и интенсивности апоптоза клеток. Кроме того, в селезенке таких животных обнаруживается высокая скорость накопления АФК, активация каспазы-3 и -9, ингибирование экспрессии Bcl-2 и изменения в уровнях Вах, а также цитохрома с (Li N. et al., 2010). Другими авторами показано, что через 30 дней перорального введения НЧ TiO_2 в клетках ткани селезенки возникает окислительный стресс, опосредованный активацией p38-Nrf-2 сигнального пути и снижение эффективности иммунного ответа (Heringa M. B. et al., 2018). Санг Х. и соавт. (Sang X. Z. et al., 2012; Sang X. Z. et al., 2014) при хроническом введении мышам различных доз НЧ TiO_2 (2,5; 5 и 10 мг) в течение 90 дней обнаружили морфологические признаки повреждения селезенки, которые сопровождались снижением иммунной функции организма, о чем свидетельствовали гематологические и биохимические показатели (число лейкоцитов, кровяных пластинок, лимфоцитов, содержание гемоглобина, иммуноглобулинов). Более того, у таких животных существенно изменялась экспрессия воспалительных и

апоптотических цитокинов, что приводило к развитию воспаления и усилению процессов апоптоза (Sang X. Z. et al., 2012).

Результаты, полученные нами при изучении морфофункциональных особенностей лимфатических узлов и показателей периферической крови экспериментальных животных хорошо дополняют и согласуются с описанными выше структурными изменениями в тимусе и селезенке. В поверхностных лимфатических узлах шеи нами было обнаружено, что введение НЧ TiO_2 приводит к увеличению площади коркового вещества и паракортикальной области, повышение макрофагальной реакции во всех структурно-функциональных зонах узла, за исключением герминативных центров и паракортикальной области лимфоидных узелков, повышение пролиферативной активности клеток в герминативных центрах лимфоидных узелков.

По мнению многих авторов, подобные морфо-функциональные изменения лимфатических узлов обусловлены антигенным воздействием и свидетельствуют об интенсивной миграции лимфоцитов в лимфатический узел и его высокой функциональной активности (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000; Бгатова Н.П. и др., 2014; Постовалова Е.А., 2016). Описанный комплекс изменений в структурно-функциональной организации поверхностных шейных лимфатических узлов может рассматриваться как усиление лимфоцитопоза в В-зависимой зоне (центрах размножения) и в Т-зависимой паракортикальной зоне (Гао Ю. и др., 2018; Пауков В.С. и др., 2018).

Краевой и мозговые синусы расширены, количество клеточных элементов в них увеличено, и они представлены лимфоцитами и макрофагами с преобладанием последних. Результаты иммуногистохимического типирования показали увеличение числа $CD68^+$ макрофагов в мозговых синусах, что, с точки зрения многих авторов, является стереотипной морфологической реакцией на антигенные воздействия лимфоидных органов и сопряжено с их участием в межклеточных кооперациях при формировании иммунного ответа и при фагоцитозе собственных деструктивно измененных клеток (Ерофеева Л.М., 2002; Григоренко Д. Е., Хребтовский А.М., 2006; Бгатова Н.П. и др., 2014; Пауков В.С. и др., 2018). Так,

при исследовании влияния многократного введения наноразмерных частиц лития в структуре регионарного пахового лимфатического узла было обнаружено увеличение числа вторичных лимфоидных фолликулов, в которых возрастала плотность макрофагов, значительное расширение краевого и мозговых синусов. В совокупности эти признаки свидетельствуют о возрастании дренажной и детоксикационной функции этого лимфоидного органа при воздействии НЧ лития (Бгатова Н.П. и др., 2014).

Таким образом, в поверхностных лимфатических узлах шеи при пероральном введении НЧ TiO_2 , по данным морфологического анализа, выявлена гиперплазия коркового вещества и выраженная макрофагальная реакция в синусах. Нами показано, что в этих зонах сохраняется пролиферативная активность клеток, которая превосходит контрольные значения, что свидетельствует об активации В-звена иммунного ответа у опытной группы животных.

Хорошо известно, что иммунные функции организма определяются не только участием лимфоцитов и антиген представляющих клеток, но реализуются, в том числе и за счет всех видов лейкоцитов. Наиважнейшая роль в развитии иммунных реакций организма принадлежит самым многочисленным из лейкоцитов – нейтрофилам. Естественно, не остаются эти клетки в стороне и в условиях воздействия на организм НЧ. Рядом исследователей на различных моделях обнаружено, что НЧ провоцируют развитие пневмонии, при этом преобладающим типом клеток в легких и в бронхоальвеолярном лаваже после ингаляции или интрахеальном введении НЧ являются нейтрофилы (Ma-Nock L et al., 2009). Нейтрофилы периферической крови человека – наиболее чувствительные к различным воздействиям и мобильные элементы системы неспецифической резистентности организма. В ходе миграции к месту инфекции и воспаления нейтрофилы непрерывно подвергаются адгезии к эндотелию сосудов, что сопровождается их структурными изменениями. Время, необходимое нейтрофилам для деформации в микрокапиллярах, имеющих меньший диаметр, чем диаметр самих нейтрофилов определяется реологией нейтрофилов. Таким образом, упругие свойства нейтрофилов тесно связаны с их иммунной функцией. Вот почему,

исследование реологических свойств нейтрофилов, т.е. их вязкоупругих характеристик в дополнении к морфометрическим характеристикам клеток имеет решающее значение для понимания механизмов патологических изменений в органах и тканях, инициированных нейтрофилами в ответ на воздействие НЧ. Однако, в литературе явно недостаточно сведений о непосредственном воздействии НЧ TiO_2 на нейтрофилы. Кроме того, как уже отмечалось выше, НЧ TiO_2 уже используются в различных областях промышленности и входят в состав самых разных изделий, в связи с чем велика вероятность их попадания в организм и взаимодействия с иммунокомпетентными клетками.

Несмотря на то, что современный уровень методических подходов позволяет с высокой точностью оценивать структурные особенности отдельных клеток, автоматизированные методы для оценки их морфофункционального статуса в подавляющем большинстве случаев предполагают использование фиксированных и окрашенных объектов. Одним из перспективных методов для изучения этих характеристик клеток является атомно-силовая микроскопия (АСМ), которая стала мощным инструментом в различных биомедицинских исследованиях, поскольку позволяет комплексно рассмотреть структурные и вязко-упругие особенности любых клеток и в частности нейтрофилов, отказавшись от использования жестких методов фиксации и тем самым свести к минимуму повреждение клеток (Плескова С. и др., 2011). С помощью АСМ изучены адгезионные и механические характеристики клеток крови при различных патологиях (Гайнитдинова В.В. и др., 2015; Lekka M. et al., 2005; Zheng Y. et al., 2015). Однако, как изменяются разнообразные характеристики нейтрофилов при прямом воздействии на них НЧ TiO_2 пока не известно.

Проведенные нами АСМ-исследования показали, что нейтрофилы периферической крови после воздействия НЧ TiO_2 претерпевают структурные преобразования, заключающиеся в уменьшении диаметра клетки, увеличении ее высоты и степени шероховатости их поверхности. Результаты наших исследований показали, что наряду с изменением цитометрических параметров на фоне воздействия НЧ TiO_2 происходит и изменение особенностей поверхности

нейтрофилов, и в частности увеличение степени ее шероховатости. При АСМ-сканировании клеток обнаружено, что на поверхности нейтрофилов, обработанных НЧ TiO_2 , определяются многочисленные инвагинации, что не может не сказаться негативно на их функциях. Результаты наших исследований согласуются с имеющимися в литературе данными об увеличении степени механической неоднородности поверхности нейтрофилов в результате воздействия НЧ (Katsnelson B. et al., 2010; Ogneva I. et al., 2014; Плескова С. и др., 2017). Так, в экспериментах с НЧ Fe_3O_4 было показано, что размер инвагинаций напрямую зависит от размера частиц и является следствием повышения фагоцитарной активности клетки (Katsnelson B. et al., 2010). Эта обратная зависимость размера частиц от способности нейтрофилов к фагоцитозу продемонстрирована и в экспериментах с другими НЧ (оксида железа, серебра и золота), и подтверждена результатами биохимических исследований, свидетельствующих об увеличении концентрации в нейтрофилах лизосомальных ферментов в ответ на воздействие НЧ (Плескова С.Н. и др., 2017; Goncalves D.M., Girard D., 2011; Babin K. et al., 2013). Вместе с тем, применительно к другим клеткам, уже известно, что воздействие НЧ серебра способствует повышению шероховатости и высоты альвеолярных эпителиальных клеток, фибробластов, а НЧ SiO взаимодействуют с мембраной мезенхимных стволовых клеток, вызывая их морфологические изменения (Ogneva I. et al., 2014).

Нами было показано, что механические свойства мембраны нейтрофилов после воздействия НЧ TiO_2 изменяются, а именно модуль упругости клеток значительно повышается, что свидетельствует об увеличении жесткости нейтрофилов. Механизм таких изменений до сих пор остается не ясным. Предполагается, что это может быть связано со структурной реорганизацией сократительных белков цитоскелета, в частности изменением соотношения F-актина/G-актина (Zheng Y. et al., 2015). Другой возможной причиной увеличения жесткости поверхности нейтрофилов является, уже обозначенная выше повышенная генерация активных форм кислорода на фоне воздействия НЧ, которая может способствовать окислительным модификациям собственных клеточных

компонентов. Показано, что ОС приводит к повышению микровязкости мембраны лейкоцитов крови, и как следствие, уменьшению ее пластичности (Zheng Y. Et al., 2015), а это негативно сказывается на функциональных свойствах клеток. В свете этих представлений возрастает диагностическая ценность показателей нарушения подвижности нейтрофилов крови, а знание их реологии необходимо для лучшего понимания патофизиологических последствий изменения механических характеристик нейтрофилов.

В последнее время появилось много работ, свидетельствующих о том, что биофизические свойства ряда клеток крови могут служить диагностическим критерием различных патологии (Гайнитдинова В.В. и др., 2015; Столбовская О.В. и др., 2015; Lekka M. et al., 2005; Dulinska I. et al., 2006; Roca-Cusachs P. et al., 2006). Механические свойства нейтрофилов, и те изменения, которые сопровождают их во время активации, играют ключевую роль в определении их функции в ответ на воспалительные раздражители. Действительно, возрастание жесткости нейтрофилов приводит к уменьшению скорости движения, задержке и агрегации в микрокапиллярах, последующей их адгезии к эндотелию в крупных кровеносных сосудах, снижению миграции в участок воспаления и тем самым ослаблению противоинфекционной защиты. Таким образом, обнаруженные изменения биофизических свойств поверхности нейтрофилов в результате взаимодействия с НЧ могут служить одним из самых ранних маркеров их цитотоксического действия.

Поскольку при исследовании лимфоидных органов экспериментальных животных нами были получены результаты, свидетельствующие о существенных изменениях соотношения различных иммунокомпетентных клеток, то логично предположить, что такие сдвиги в их содержании не могут не затронуть систему крови. Анализ гематологических показателей животных на фоне введения НЧ TiO_2 свидетельствует об отсутствии выраженных изменений со стороны красной крови. Изучение количественных показателей лейкоцитов крови животных на фоне перорального введения исследуемых НЧ выявил лейкоцитоз, который формируется за счет гранулоцитов, абсолютное число которых к концу срока

наблюдений возрастает. Увеличение количества гранулоцитов в периферической крови, можно объяснить уменьшением скорости миграции нейтрофилов, задержкой и агрегацией их в микроциркуляторном русле, связанными с полученными нами данными об изменении вязко-упругих свойств поверхности нефиксированных нейтрофилов человека при их взаимодействии с НЧ TiO_2 . В крови животных опытной группы снижается число лимфоцитов, что можно объяснить обнаруженным нами нарушением их пролиферативной активности в тимусе. Выявленные отклонения количественных характеристик лейкоцитов от контрольных значений свидетельствуют об изменении состояния иммунной системы организма животных опытной группы и в целом согласуются с результатами, полученными другими авторами (Becker K. et al., 2014; Kongseng S. et al., 2016).

Обобщая результаты исследования морфофункциональных изменений лимфоидных органов и системы крови, можно заключить, что при пероральном введении рутильной формы нанодисперсного TiO_2 наблюдается: умеренная акциентальная инволюция тимуса, редукция белой пульпы селезенки, обусловленная снижением пролиферативного потенциала и усилением апоптоза; гиперплазия коркового вещества и выраженная макрофагальная реакция в синусах лимфатических узлов; увеличение числа гранулоцитов и снижение количества лимфоцитов в периферической крови, нарушение процессов миграции нейтрофилов, связанная с повышением ригидности их поверхности. Указанные изменения можно трактовать с позиции индуцированного вторичного иммунодефицита, который развивается на фоне воздействия НЧ (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999; Новиков Д.К. и соавт., 2011; Постовалова Е.А., 2018; Vaillant A.J., Qurie A., 2018).

Еще одним важным барьером на пути, в том числе любого не природного агента является печень, важнейшей функцией которой является обеспечение процессов деинтоксикации, которые идут с участием специфических органелл микросом (Улумбеков Э.Г., Чельшев Ю.А., 1997; Данилов Р.К. и др., 2003). Как показали результаты наших биохимических исследований, в крови животных

экспериментальной группы повышается активность таких индикаторных ферментов печени, как АсАТ и АлАТ, что может свидетельствовать о нарушении целостности мембран гепатоцитов и является признаком повреждения печеночной ткани. Вывод о негативном действии исследуемых НЧ в отношении клеток печени, выявленном с помощью биохимического анализа, был подтвержден нами при изучении морфологии этого органа. Так, нами было обнаружено, что НЧ TiO_2 вызывают значительные ультраструктурные изменения двух основных клеточных популяций печени — гепатоцитов и эндотелиоцитов синусоидов, а также реактивные изменения перисинусоидальных липоцитов и мигрирующих в пространство Диссе клеток Купфера. Основные структурные изменения гепатоцитов заключаются в выраженном повреждении тонкой структуры митохондрий, конденсации хроматина, значительной редукции гладкой ЭПС, вакуолизации цитоплазмы, снижении числа свободных рибосом и полисом, жировой дистрофии, уменьшении плотности гликогена, изменении конфигурации микроворсинок гепатоцитов. Описанные нами изменения хорошо согласуются с данными других авторов, которые показали, что такие структурно-функциональные изменения органа связаны со сложностью процессов их детоксикации при длительном воздействии: НЧ аккумулируются в гепатоцитах и оказывают на них токсическое действие (Сизов, Е.А. и др., 2012; Мильто И.В. и др., 2012; Сипайлова О.Ю. и др., 2017; Onishchenko, G.E. et al., 2012; Chen J. et al., 2009; Shukla R.K. et al, 2013; Alarifi S. et al., 2013). Предполагается, что НЧ попадают в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, фагоцитоза и обнаруживаются как свободно распределенными в цитоплазме, так и заключенными в эндосомы и лизосомы (Oc L., et al., 2009; Mano S.S. et al, 2013; Teubl V.J., 2015). В конечном счете, в клетках печени НЧ TiO_2 , взаимодействуя с белками, препятствуют механизмам антиоксидантной защиты и приводят, как и во множестве других клеток, к генерации активных форм кислорода (Sha B. et al., 2014; Natarajan V. et. al, 2015; Jafari A. et al., 2018). Развитие окислительного стресса увеличивает ПОЛ в мембране митохондрий и проницаемость ЭПС, что приводит к нарушению энергетического метаболизма и может стать основной причиной

обнаруженных нами ультраструктурных изменений гепатоцитов. Более того, в ряде исследований показано, что НЧ TiO_2 по своему действию похожи на эффекты вируса гепатита, который проникая в ядро гепатоцита, связывается с ДНК (Long T.C. et al., 2006; Azim S.A. et al., 2015, Khaled M.A., 2017), а это приводит к изменению экспрессии генов, связанных с пролиферацией гепатоцитов, трансдукцией сигналов и клеточным циклом (Cui Y. et al., 2011) и, в конечном счете, способствует апоптозу и некрозу (Бгатова Н.П. и др., 2017; Nassanein K.M., El-Amir Y.O., 2017). Однако следует отметить, что выявленные нами нарушения могут являться результатом как прямого действия НЧ на клетки, но возможно и опосредованы, например, нарушениями функциональных свойств микроциркуляторного русла органа под воздействием НЧ.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования демонстрируют возможное неблагоприятное воздействие НЧ TiO_2 на морфофункциональные свойства клеток печени у крыс, что хорошо согласуется с имеющимися сведениями о высокой чувствительности органа к действию различных дестабилизирующих и токсичных факторов, в том числе и наноматериалов.

Отдельный интерес и исключительную актуальность представляют вопросы нейротоксичности любых НЧ. Эта актуальность обусловлена, с одной стороны, чрезвычайной уязвимостью нейронов, а с другой, фатальными последствиями для всего организма гибели даже незначительной части этих клеток. Такая чувствительность нейронов к любым токсикантам объясняется в первую очередь их невысоким регенераторным потенциалом, что обусловлено их нахождением в G_0 стадии клеточного цикла, и способны эти клетки в большей степени к внутриклеточной регенерации. Вот почему любые деструктивные процессы в нервных клетках, как последствия различных повреждающих действий, зачастую являются необратимыми. В рамках проблемы повреждений нейронов и их последствий несомненный интерес представляют клеточные механизмы, лежащие в основе неблагоприятного воздействия НЧ на ЦНС. Показано, что НЧ TiO_2 при их интраназальном введении самкам мышей (80 нм, рутил и 155 нм анатаз; 500 мкг,

через день в течение 30 дней), проникали в головной мозг через обонятельный тракт и аккумулировались в значительном количестве в коре головного мозга, таламусе, обонятельной луковице и гиппокампе (преимущественно в СА1 и СА3 регионах) (Wang J. Y. et al., 2008). В качестве возможного механизма транслокации НЧ рассматривается их эндоцитоз чувствительными нервными окончаниями эпителия воздухоносных путей, в частности через обонятельный и тройничный нерв. По мнению многих исследователей (Као Y.Y. et al., 2012; Song B. et al., 2015), обонятельный тракт может быть критическим путем попадания НЧ в ЦНС человека, особенно при их высоких концентрациях в воздухе, например, рабочей зоны при длительном их воздействии, связанном с профессиональной деятельностью. В совокупности, указанные выше данные свидетельствует о проникании НЧ в организм человека и высокой уязвимости к их воздействию ряда структур головного мозга, а для гиппокампа это справедливо даже за короткое время контакта с этими агентами. Согласно данным ряда исследований (Dan M. et al., 2018), нейроны гиппокампа в большей степени по сравнению с клетками других отделов головного мозга чувствительны к действию различных неблагоприятных факторов. Однако причины такой уязвимости, морфофункциональные изменения подкорковых структур и гиппокампа, являющихся частью лимбической системы головного мозга, на фоне воздействия НЧ TiO_2 , до сих пор исследованы не в полной мере.

Результаты проведенных нами исследований выявили, что в областях СА1 и СА3 гиппокампа и ЦЯ миндалевидного комплекса головного мозга определяются признаки повреждения нейронов. Количественный анализ показал снижение плотности упаковки нейронов, уменьшение площади ядра и перикариона клеток указанных областей мозга опытной группы животных. Полученные нами результаты электронно-микроскопических исследований этих областей головного мозга животных на фоне введения НЧ свидетельствуют о критических повреждениях энергетического и белоксинтетического аппаратов нейронов. Аналогичные данные о нарушении структуры митохондрий на фоне воздействия НЧ TiO_2 ранее были получены для клеток микроглии (Yu K.N. et al., 2013).

Установлено, что указанные НЧ вызывают повышение генерации АФК в этих клетках, изменение электрогенных характеристик мембраны митохондрий с последующим увеличением доли маркеров апоптоза Bax/Bcl-2, что указывает на уже хорошо известную сопряженность процессов нарушения функционирования митохондрий и вероятностью вступления клеток в апоптоз (Huerta-Garcia E. et al., 2014).

Обнаруженные нами структурные изменения могут быть объяснены с возможно развивающимся в этих регионах мозга воспалительным ответом на воздействие НЧ, который, по мнению многих авторов, является еще одним важным механизмом проявления нейротоксичности НЧ TiO₂ (Younes N.R. et al., 2015; Syed N.S. et al., 2017). Ранее было показано, что НЧ TiO₂ вызывают воспалительный ответ в мозге мышей и повышение уровня воспалительных цитокинов, высвобождаемых клетками активированной микроглии (Shimizu M. et al., 2009). Причем в этих условиях была обнаружена повышенная пролиферативная активность клеток как макро-, так и микроглии и некроз нервной ткани в гиппокампе.

Для нормальной деятельности различных структур ЦНС важнейшим фактором является уровень васкуляризации. Структурно-функциональные характеристики микроциркуляторного русла головного мозга напрямую зависят от чувствительности ряда клеток к обеспечивающим ангиогенез гуморальным факторам. Одним из таких ключевых факторов является эндотелиальный сосудистый фактор роста (VEGF) – специфический митоген, который индуцирует ангиогенез, участвует в кроветворении, регуляции васкулогенеза (Shibuya M. et al., 1990; Ransohoff R. M. et al., 2004.). Этот белок является мощным медиатором проницаемости сосудов в норме и при патологии, поскольку является частью системы, отвечающей за восстановление подачи кислорода к тканям в ситуации, когда циркуляция крови недостаточна (Тырзина Е.Г., Никулицкий С.И., 2015). Под влиянием VEGF происходит пролиферация и миграция эндотелиоцитов с образованием незрелых кровеносных сосудов, а в дальнейшем этот ростовой фактор способствует выживанию эндотелиальных клеток, ингибируя апоптоз, что,

в конечном счете обеспечивает «созревание» капилляров. Значение VEGF для формирования нормальной сосудистой системы в эмбриогенезе столь велико, что повреждение даже одной аллели гена VEGF-A приводит к внутриутробной гибели плода (Shrivastava R. et al., 2014). Помимо участия в регуляции ангиогенеза, во взрослом организме, заметную роль начинают играть и «неэндотелиальные» биологические эффекты VEGF. Исследования последних лет подтверждают его эффекты на целый ряд клеток, в том числе и на нейроны (Рославцева В.В. и др., 2016). Обнаружено, что этот гормон способствует выживанию нейронов при различных патологиях ЦНС, таких как инсульт и нейродегенеративные заболевания, а также после нейротравм (Рославцева В.В. и др., 2016).

Таким образом, VEGF в настоящее время рассматривается и как митоген, который способствует пролиферации эндотелиальных клеток, и как нейротрофический и нейропротекторный фактор, стимулирующий нейрогенез и рост аксонов как в периферической, так и в центральной нервной системе. Это свидетельствует о том, что существует тесная функциональная взаимосвязь нейрогенеза и ангиогенеза, опосредованная физиологическими функциями и состоянием рецепторов VEGF в головном мозге. Известно, что наивысшей константой связывания с VEGF обладает рецептор VEGFR-1/Flt-1 (Тырзина Е.Г., Никулицкий С.И., 2015). Однако до сих пор нет ясной картины распределения рецепторов к VEGF в головном мозге крыс, в том числе и при воздействиях различных НЧ. Мы использовали рецептор VEGFR-1/Flt-1 в качестве маркера для иммуногистохимического изучения чувствительности клеток гиппокампа и МК мозга к этому гуморальному фактору. Результаты иммуногистохимического типирования показали, что в изученных областях мозга интактных животных Flt-позитивное окрашивание рецепторов к VEGF наблюдалось как в нейронах и глиальных элементах, так и эндотелиальных клетках сосудов. При количественном анализе среднего числа иммунопозитивных клеток в гиппокампе и ЦЯ МК головного мозга животных, подвергнутых воздействию НЧ TiO_2 , было выявлено снижение числа нейронов, экспрессирующих VEGFR-1 по сравнению с группой интактных животных. В то же время в клетках глиии и в эндотелиальных клетках

сосудов изученных областей мозга опытной группы крыс иммунопозитивная реакция к антителам была значительно выше в сравнении с группой контрольных животных, что свидетельствует о повышении чувствительности клеток к этому гормону как проявление компенсаторной реакции.

Полученные нами данные хорошо согласуются с известными фактами о том, что экспрессия VEGFR-1 и -2 во взрослом организме определяется в различных областях в ходе спонтанного нейрогенеза (Yang S. Z. et al., 2003; Wittko-Schneider I.M. et al., 2013). Поскольку эндотелиальная экспрессия VEGFR-1 и -2 связана с ангиогенной активностью в ткани, а в физиологических условиях в головном мозге взрослых ангиогенной активности практически нет, то экспрессия VEGFR в эндотелиальных клетках головного мозга снижена (Yang S. Z. et al., 2003). Однако показано, что она может быть активирована в ответ на повреждения, вызванные воздействием различных факторов (Plate K.H. et al. 1999; Beck H. et al., 2002). Так, исследование экспрессии генов VEGFR-2 и VEGFR-1 с помощью нозерн-блот-анализа при гипоксии выявило увеличение экспрессии VEGFR-1, но не VEGFR-2 в легких, сердце и головном мозге животных (Marti H.H., Risau W., 1998). С помощью двойного иммуногистохимического окрашивания антителами к VEGF и GFAP было показано, что реактивные астроциты гиппокампа мышей на фоне деннервации афферентных путей энторинальной коры экспрессируют VEGFR. При этом в течение всего периода наблюдения уровень экспрессии рецепторов Flt-1 в гиппокампе оставался постоянным (Wang W.Y. et al., 2005), указывая на возможное участие VEGF в структурной реорганизации в деафферентном (лишенном афферентной иннервации) гиппокампе, посредством стимулирования роста аксонов. В другой работе в первые дни после повреждения спинного мозга крыс выявлен высокий уровень экспрессии мРНК Flt-1 и Flk-1 в микроглии/макрофагах и эндотелиальных клетках сосудов, в то время как в последующие дни наблюдений экспрессия этих рецепторов значительно возрастала в реактивных астроцитах, расположенных в непосредственной близости от очага поражения, что свидетельствует об участии VEGF в воспалительных реакциях через специфические рецепторы после травмы спинного мозга у крыс. При этом наряду

с экспрессией рецепторов Flt-1 или Flk-1 активированные астроциты были и нестин-позитивными, что может свидетельствовать о том, что они приобретают черты стволовых клеток, изменив фенотип в незрелую форму. Кроме того, если активация VEGF-R1 на моноцитах и макрофагах вызывает их миграцию из сосудистого русла, то их стимуляция на нейронах предотвращают гибель клеток при ряде воздействий (Proescholdt M.A., 1999; Croll S.D. et al., 2004). В последнем случае, как полагают, VEGF-R1, связываясь со своим специфическим лигандом VEGF-B, приводит к антиапоптотическому эффекту за счет ингибирования каспазы-9 и белка BAD. Действительно, на клеточной модели болезни Паркинсона было показано уменьшение числа гибнущих нейронов под влиянием введенного VEGF-B (Тырзина Е.Г., Никулицкий С.И., 2015). В другой работе с применением технологии РНК-интерференции было показано, что отсутствие рецептора второго типа на опухолевых клетках никак не сказывалось на их выживаемости, тогда как напротив, нокаут гена VEGFR-1 приводил к выраженному увеличению количества апоптотически гибнущих клеток. Предполагается, что VEGFR-1 локализован преимущественно на ядерной мембране во взаимосвязи с ламинами А/С и деградация этих белков, ответственных за формирование ядерной оболочки и организацию нижележащего хроматина приводит к апоптозу клетки (Тырзина Е.Г., Никулицкий С.И., 2015).

Полученные нами данные иммуногистохимического исследования об уменьшении экспрессии рецепторов VEGFR-1 нейронами и увеличение иммунопозитивных глиальных и эндотелиальных клеток на фоне воздействия НЧ TiO₂ хорошо согласуются с результатами работ Чой Дж. С. и соавт. (Choi J. S. et al., 2007). Так, с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) было изучено распределение двух типов рецепторов к VEGF - Flt-1 и Flk-1 в гиппокампе крыс при транзиторной ишемии переднего мозга. У контрольной группы животных незначительная экспрессия мРНК Flt-1 и Flk-1 была выявлена в нейронах пирамидного и гранулярного слоев гиппокампа, тогда как после ишемии экспрессия этих рецепторов была обнаружена у активированных астроцитов, клеток микроглии и эндотелиальных клеток сосудов, но не в нейронах.

По-видимому, обнаруженное нами уменьшение экспрессии нейронами гиппокампа рецептора первого типа к VEGF у животных на фоне воздействия изучаемых наночастиц и уменьшение среднего числа нейронов, обнаруженное нами при проведении морфометрических исследований в гиппокампе и амигдале головного мозга крыс может быть связано с гибелью клеток в результате апоптоза, что согласуется с результатами исследований Сонг Б. и др. (Lai J.C. et al., 2008; Li X. et al., 2009; Song B. et al., 2016), которые показали, что НЧ TiO_2 вызывают апоптоз в нейронах гиппокампа крыс.

Глиальные клетки давно перестали рассматриваться как пассивные элементы нервной ткани. По мнению многих исследователей одним из маркеров повреждающего действия неблагоприятных факторов и развития патологических процессов в тканях мозга является активация астроглии (Tishkina A.O. et al., 2013; Muhamedshina Y.A. et al., 2014; Smirnov A.V. et al., 2017). В силу непосредственного контакта астроцитов с микрососудами, именно эти клетки являются первыми на пути иммунокомпетентных клеток и патогенных молекул, проникающих в ЦНС. Учитывая, что астроциты, наряду с микроглией, являются резидентными иммунокомпетентными клетками мозга и в условиях патологии инициируют развитие врожденного и приобретенного иммунитета, есть основания полагать, что это в значительной степени может определять их высокую реактивность. Известно, что универсальной адаптивной реакцией астроцитов на все формы повреждения мозга является астроглиоз, сопровождающийся рядом фенотипических изменений, заключающихся в увеличении размеров как перикариона, так и отростков, активации синтеза ряда белков, в том числе и GFAP. Предполагая возможное участие VEGF в активации астроцитов при различных патофизиологических процессах, играющих ключевую роль в процессе восстановления нервной ткани после повреждениях разного характера, и опосредованное VEGF-R1-влияние на пролиферацию клеток, и в частности астроцитов, нами было проведено исследование реактивных изменений астроцитов в ответ на воздействие НЧ TiO_2 . Мы провели иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP, маркера промежуточных филаментов. Выявленное нами увеличение числа GFAP-

позитивных клеток в зонах СА1 и СА3 гиппокампа крыс и ЦЯ МК мозга, подвергнутых воздействию НЧ TiO_2 , свидетельствует об увеличении числа реактивных астроцитов. Эффекты активации астроцитарной глии в изученных областях головного мозга животных опытной группы, по-видимому, отражают перестройку цитоскелета глиальных клеток и, как следствие этого, происходят негативные изменения архитектоники отростков астроцитов и, что особенно важно при этом нарушаются взаимодействия астроцитов с нейронами. Нейропротекторная функция астроцитов заключается, в том числе и способностью поддерживать целостность ГЭБ, осуществлять защиту от окислительного стресса за счет синтеза глутатиона, продуцировать как противовоспалительные цитокины, так и гормоны воспаления, что показано при различных видах повреждения ЦНС (Kolomeec N.S., Uranova N.A. 2015). Кроме того, астроциты при выраженных реактивных изменениях в ЦНС формируют глиальные рубцы, тем самым ограничивая зону распространения воспалительного процесса, некрозов и аутоиммунного поражения. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что глиальные изменения являются значительной частью комплексных токсических проявлений в мозге, связанных с воздействием изученных НЧ. Основываясь на данных об экспрессии GFAP при интраназальном введении НЧ TiO_2 , можно предположить, что реактивные изменения астроцитов в гиппокампе и МК мозга, по-видимому, способствуют поддержанию жизнедеятельности нейронов и купируют негативные последствия активации микроглии, поскольку астроцитарные изменения, как правило, рассматривают как вторичные по отношению к активации микроглии (Коломеец Н.С., Уранова Н.А., 2014).

Таким образом, можно заключить, что деструктивные изменения различных клеток гиппокампа и ЦЯ миндалевидного комплекса при интраназальном введении НЧ TiO_2 идет за счет индукции оксидативного стресса, апоптоза, повреждения ряда органелл клеток, появления воспалительных реакций (Feng X.L. et al., 2015; Mushtaq G. Et al., 2015; Shah S.N.A. et al., 2017), что находит отражение в обнаруженных нами макро- и микроструктурных изменениях изученных структур

мозга крыс. В совокупности выявленное нами увеличение экспрессии GFAP наряду с резким увеличением числа поврежденных пирамидных нейронов и уменьшение их числа позволяет заключить о развитии атрофических изменений и компенсаторных реакций в полях CA1 и CA3 гиппокампа и ЦЯ МК мозга, сопровождаемых активацией астроцитов, процессов ангиогенеза и изменением нейро-глиального соотношения в ответ на воздействие НЧ TiO₂.

Полученные нами данные о реактивных структурных, иммуногистохимических и ультрамикроскопических изменениях гиппокампа и миндалевидного комплекса мозга на фоне интраназального введения НЧ TiO₂ крысам позволило нам сделать предположение и наличии дисфункциональных расстройств ЦНС у животных, связанных с негативными процессами, вызванными воздействием НЧ TiO₂. Одним из эффективных методов оценки функционального состояния структур головного мозга и нейрофизиологических механизмов развития различных видов патологий ЦНС является анализ спектральной мощности электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Этот метод является адекватным инструментом выявления различных психоневрологических расстройств (Uhlhaas R.J. et al., 2008). При изучении амплитудных и спектральных характеристик ЭЭГ крыс опытной группы выявлено повышение средней амплитуды ритмов и выраженные изменения биоэлектрической активности нейронов префронтальной области коры головного мозга экспериментальных животных в виде преобладания медленноволновой активности θ – и Δ - диапазона, сопряженное с уменьшения относительной мощности α -, β_1 -, β_2 -ритмов. По мнению многих авторов, появление медленноволновых θ - и Δ -ритмов является неблагоприятным признаком, причем чем ниже их частота и выше амплитуда, тем более выражен патологический процесс, который согласно существующим представлениям возможно связан с дистрофическими, демиелинизирующими и дегенеративными поражениями головного мозга, со сдавлением мозговой ткани, гипертензией, а также с наличием некоторой заторможенности, явлениями деактивации, снижением активизирующих влияний ствола головного мозга (Поворинский А. Г., Заболотных В. А., 1987; Javitt D.C. et al., 2008). Поскольку известно, что Δ -

ритм (1-4 Гц) играет большую роль в реализации когнитивных задач, участвует в мотивационных ситуациях, связанных с опасностью или удовлетворением различных потребностей мозга, то увеличение мощности ритма на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 свидетельствует об увеличении поведенческой активности и усилении панического состояния животных (Kustubayeva A.M., 2012). Таким образом, обнаруженное нами увеличение соотношения θ - и Δ -ритмов во фронтальной коре головного мозга крыс на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 позволяет заключить о возможном развитии дегенеративных изменений, характерных для неврозоподобного синдрома.

Префронтальная кора имеет богатые связи с полями зрительных и речевых зон коры больших полушарий и выполняет ключевую роль в переработке и передаче информации на систему двигательного анализатора (Богданов О.В. и др., 1986; Оленев С.Н., 1987; Савельев С.В., 2001, 2005). Кроме того, этот отдел коры обладает двусторонними связями не только с нижележащими образованиями ствола и межучного мозга, но и практически со всеми остальными структурами коры больших полушарий (Саркисов С.А., 1949; Krettek J.E., Price J.L., 1974; Middleton F.A., Strick P.L. 2002; Roberts A.C. et al., 2007). Префронтальная кора – важнейший интегративный центр нервной системы, а в совокупности с образованиями лимбической системы и гиппокампом представляют собой единый функциональный комплекс (Оленев С.Н., 1987; Зайцев А.В., 2014). Этой области принадлежит важная роль в организации психической деятельности человека, в частности социального поведения, эмоциональной реакции и в создании алгоритмов наиболее сложных поведенческих программ (Лурия А.П., 1973). При повреждении структур префронтального отдела коры отмечается нарушение процесса принятия решений при выполнении задач (Боголепова И.Н. и др., 2015; Tranel D. et al., 2005; Janson С.Н., 2007). Префронтальная кора вовлечена в ряд патологий, в связи с чем в настоящее время ведутся интенсивные исследования клеточных нейрофизиологических механизмов осуществления функций этой зоной.

Полученные нами данные об изменениях биоэлектрической активности префронтальной области коры коррелируют с результатами проведенных нами исследований поведенческих реакций, которые напрямую связаны с морфофункциональными характеристиками нейронов как центральной, так и периферической нервных систем. При анализе поведения животных на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 нами было обнаружено повышение степени тревожности крыс. Такие поведенческие особенности этих животных помимо изменения биоэлектрической активности нейронов головного мозга можно объяснить также уменьшением содержания некоторых нейромедиаторов, таких как норадреналин, дофамин и их метаболитов в условиях воздействия НЧ (Ходанович, М.Ю. и др.; Zhang L. et al., 2012; Hu R. P. et al., 2013).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что НЧ TiO_2 при интраназальном введении крысам оказывают негативное влияние на структурные характеристики изученных зон мозга и функции ЦНС, что хорошо согласуется с результатами других исследований, которые показали, что ОС и нарушение функционирования ГЭБ, вызванное НЧ TiO_2 , приводит к гибели нейронов, когнитивным нарушениям и нейрональной дисфункции (Feng X.L. et al., 2015; Notter T. et al., 2018).

Как уже отмечалось выше, на организменном уровне, НЧ оказывают негативное воздействие не только на соматические клетки, но, в этих условиях их токсические эффекты проявляются и на процессах гаметогенеза, а нарушение последних неизбежно будет сказываться на качестве потомства. Кроме того, следует учитывать и то обстоятельство, что органы, обеспечивающие процессы гаметогенеза являются важнейшим компонентом эндокринной системы, регулирующей практически все процессы в организме.

Сперматогенез представляет собой сложный биологический процесс, который особенно чувствителен к любым неблагоприятным воздействиям (Боков Д.А., Шевлюк Н.Н. 2014; Шевлюк Н.Н. 2007; Ong C. Et al., 2016). Исследования последних лет убедительно доказывают, что в неблагоприятных экологических условиях контакт с различными химическими соединениями приводит к снижению

качества спермы, уменьшению количества сперматозоидов и в конечном счете к снижению мужской фертильности (Xu Y. et al., 2014). Результаты исследований последних лет (Lan, Z. Et al., 2012; Lennert Morgan A.M. et al., 2017; Karimipour M. et al., 2018; Zhang L. et al., 2018; Wang R. et al., 2018) показали, что НЧ TiO_2 оказывают негативное влияние как на соматические, так и на половые клетки организма человека и животных. Так, Коматсу и др. в экспериментах *in vitro* (Komatsu T., et al., 2008) обнаружили, что НЧ TiO_2 , мигрируя в клетки Лейдига семенников мыши, вызывали снижение их пролиферативного потенциала и жизнеспособности. Одновременно с этим обнаруживалось увеличение уровня экспрессии генов одного из ключевых антиоксидантных ферментов - маркера окислительного стресса - гемоксигеназы-1 и стероидогенного острого регуляторного белка (StAR), напрямую связано с синтезом андрогенов этими клетками. Еще одним подтверждением прямого воздействия НЧ на органы репродуктивной системы являются данные, полученные при подкожной инъекции НЧ TiO_2 в организм беременных самок мышей, которые показали у их половозрелого потомства мужского пола накопление наночастиц в сперматиде, клетках Сертоли и Лейдига, патологические изменения в тканях семенников и нарушение сперматогенеза (Guo L.L et al., 2009). В других работах (Gao G.D. et al., 2013) внутрибрюшинная инъекция НЧ TiO_2 самцам мышей вызывала заметное снижение числа сперматозоидов в эякуляте, их подвижности и усиление процессов апоптоза клеток сперматогенного эпителия и формирования гамет. Снижение подвижности сперматозоидов и их фертильности является надежным маркером токсичности агента и может быть следствием развивающегося окислительного стресса, вызванного воздействием НЧ TiO_2 на исследованные клетки (Griveau J.F., et al., 1995). Это тем более очевидно ввиду того, что мембрана сперматозоидов богата полиненасыщенными жирными кислотами, и это делает их чрезвычайно чувствительными к воздействию активных форм кислорода.

Тем не менее, клеточные механизмы, лежащие в основе нарушения сперматогенеза под влиянием НЧ остаются практически не изученными, а имеющиеся данные зачастую противоречивы. С появлением разнообразных

специфичных маркеров, позволяющих оценивать функциональное состояние клеток, стало возможным проведение такого исследования. Применительно к СЭ для исследования целесообразно использование маркера стволовых клеток – c-kit, экспрессия которого позволяет отслеживать количество стволовых клеток, расположенных на его базальной мембране и маркера пролиферации Ki-67.

Результаты проведенного нами исследования демонстрируют возможное неблагоприятное воздействие НЧ TiO_2 на морфофункциональные свойства семенников крыс, что хорошо согласуется с имеющимися сведениями о высокой чувствительности органов мужской репродуктивной системы к действию различных токсических факторов, в том числе и наночастиц. С использованием иммуногистохимических маркеров нами выявлено нарушение процессов пролиферации и дифференцировки клеток сперматогенного эпителия, о чем свидетельствует снижение экспрессии поверхностного рецептора c-kit – белка, который поддерживает трансформацию недифференцированных сперматогоний типа A_{al} в сперматогонии класса А, и маркера пролиферации ki-67 в условиях экспериментального воздействия НЧ TiO_2 .

Одним из адекватных методов исследования изменений структуры органов репродукции мужского организма при различных физиологических и патологических состояниях является количественная оценка морфометрических параметров семенников (Noorafshan A., 2014). В нашем исследовании выявлены специфические структурные изменения, обусловленные неблагоприятным влиянием изучаемых НЧ на морфологические характеристики репродуктивной системы самцов крыс. К ним можно отнести: уменьшение толщины сперматогенного эпителия, диаметра ИСК, дезорганизация слоев и отрыв сперматогенных клеток от базальной мембраны. Согласно существующим представлениям (Li C. et al., 2009), толщина сперматогенного эпителия коррелирует с количеством клеток в его составе и, применительно к СЭ уменьшение его толщины может быть обусловлено, в том числе редукцией числа герминативных клеток. Этот факт указывает на низкую регенерационную способность СЭ как тканевой системы и, в условиях воздействия НЧ TiO_2 ,

сперматогенез, характеризующийся высокой пролиферативной активностью вовлеченных в него клеток, оказывается уязвимым. Негативное воздействие исследованных нами НЧ проявляется и в нарушении эндокринной функции репродуктивной системы самцов крыс. Известно, что количественные и морфометрические параметры клеток Лейдига хорошо коррелируют с уровнем тестостерона (Heller C.G., Leach D.R., 1971), а поскольку размер ядер клеток косвенно свидетельствует об уровне их функциональной активности, нами был проведен сравнительный морфометрический анализ площади ядра клеток Лейдига на фоне введения НЧ TiO_2 . Результаты проведенного исследования показали, что по сравнению с контрольной группой животных, средняя площадь ядра клеток Лейдига уменьшается ($p < 0,05$). Полученные нами данные сопоставимы с результатами ряда работ, в которых показано, что НЧ TiO_2 вызывают угнетение процесса пролиферации клеток Лейдига и снижение уровня тестостерона в семенниках (Khorsandi L. et al., 2016).

Сведения о негативном влиянии НЧ на репродуктивную систему самцов экспериментальных животных были получены и другими авторами на разнообразных моделях. Так, в исследованиях генотоксичности НЧ TiO_2 показано, что одним из неблагоприятных эффектов НЧ является окислительный стресс, который приводит к нарушению хода клеточного цикла и, как следствие, к угнетению клеточной пролиферации (Guo L.L. et al., 2009; Bogdan J. et al., 2017). В других работах (Garcia T.X et al., 2014) продемонстрировано негативное влияние внутривенного введения НЧ Ag (1 мг/кг) самцам мышей в течение 12 дней на сперматогонию, заключающееся в подавлении их вступления в процесс дифференцировки и снижении пролиферативного потенциала. Показано, что именно сперматогенные стволовые клетки наиболее чувствительны к воздействию НЧ TiO_2 (Braydich-Stolle L.K., et al., 2010).

Подобные морфологические изменения со стороны сперматогенного эпителия описаны и рядом других исследователей. Так, пероральное введение НЧ TiO_2 мышам (10-300 мг/кг) в течение 35 дней вызывало значительные морфофункциональные изменения ИСК, заключающиеся в некротизации и

слушивании сперматогенных клеток (Khorsandi L. et al., 2016). Исследование Ли и его коллег (2009), посвященное изучению эффекта НЧ выхлопных газов дизельных двигателей (NRDE) выявило дегенеративные и некротические изменения СЭ с уменьшением числа сперматогенных клеток в его составе, а также отек интерстициальной ткани яичка в семенниках экспериментальной группы животных (Li S. M. et al., 2009). Внутривенное введение в организм мышей НЧ Ag вызывают уменьшение высоты СЭ, увеличение диаметра просвета ИСК и усиление процессов апоптоза сперматогенных клеток (García T.X. et al., 2014). Подобный эффект был обнаружен и при пероральном введении НЧ Zn в организм мышей (50-300 мг/кг) (Talebi A.R. et al., 2013). В этой же работе продемонстрировано наличие значительного числа вакуолей в клетках Сертоли мышей, что, по мнению авторов, является ранним морфологическим признаком повреждения семенников и рассматривается как основной ответ клеток Сертоли на многие ксенобиотики и связано с угнетением их функции. Подтверждением этого тезиса является исследование *in vitro* (Hong F., et al., 2016), в которых показано, что НЧ TiO₂ вызывают повышение генерации активных форм кислорода в клетках Сертоли, усиление перекисного окисления липидов, повреждение ДНК, активацию ряда каспаз с последующей гибелью этих клеток. В другой работе интратрахеальное введение наночастиц углерода (14, 56 и 95 нм, 0,1 мг /кг) вызвало частичную вакуолизацию клеток Сертоли (Yoshida S., et al., 2009).

Общепризнанно, что достаточные уровни ЛГ, ФСГ и тестостерона имеют решающее значение для сперматогенеза, однако, вредные вещества могут нарушить продукцию и регуляцию синтеза этих гормонов, что может привести к структурным изменениям семенников, нарушениям сперматогенеза и в конечном счете к мужскому бесплодию. Таким образом, нами показано, что негативное действие НЧ TiO₂ на морфологические параметры семенников крысы затрагивает ключевые для клеток этой структуры характеристики, такие как, пролиферативная активность и способность к дифференцировке, а суммарный эффект обнаруженных нами изменений в семенниках крыс – это нарушение процессов сперматогенеза. Однако это может быть следствием не только прямого воздействия НЧ TiO₂ на

гонады, но являться и следствием их негативного влияния на гуморальную систему организма. Результаты проведенного нами исследования хорошо согласуются с уже имеющимися сведениями о высокой чувствительности органов мужской репродуктивной системы к действию различных дестабилизирующих факторов, в том числе и наноматериалов (Jia F. et al., 2014; Tassinari, R. et al., 2014; Morgan A.M., Ibrahim M.A., Noshay P.A., 2017).

Следует отметить, что негативное влияние НЧ TiO_2 на репродуктивную систему не ограничивается влиянием на сперматогенез, но затрагивает как овогенез, так и эмбриональное развитие (Mohammadipour A. et al., 2014; Kiss A., 2015; Rollerova E. et al., 2015; Warheit D.B., 2015) и несмотря на то, что этим вопросам посвящено достаточно большое количество исследований (Zhao X. et al., 2013; Engler-Chiurazzi E.B. et al., 2016; Notter T. et al., 2018), механизмы этих нарушений и клетки-мишени для НЧ в органах женской репродуктивной системы до сих пор не исследованы, а имеющиеся в литературе сведения, посвященные данной проблеме, во многом противоречивы. В связи с этим, несмотря на то, что использование НЧ TiO_2 в быту по-прежнему считается относительно безопасным по сравнению с другими наноматериалами, достаточных доказательств такого утверждения пока нет, так как процессы гаметогенеза и эмбриогенеза в условиях воздействия НЧ не исследованы в полной мере. Практически отсутствуют данные о том, как воздействие НЧ TiO_2 может повлиять на наиболее восприимчивые к токсическим воздействиям группы населения, такие как беременные женщины и развивающийся плод. Вместе с тем, любые данные о «репродуктивной» токсичности НЧ TiO_2 и их влиянии на генеративную функцию, развитие плода и потомства, безусловно, окажутся востребованными в практической медицине.

Полученные нами данные о негативном влиянии перорального введения беременным самкам НЧ TiO_2 , заключающемся в увеличении предимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности, а также в нарушении постнатального развития потомства крыс, хорошо согласуются с результатами исследования других авторов. Так, ранее показано (Shimizu M. et al., 2009), что подкожное введение беременным самкам

мышей НЧ TiO_2 приводит к определенным повреждениям репродуктивных органов и нейронов ЦНС потомства. По данным Шимизу М. и соавт. (2009) подкожная инъекция беременным самкам мышей НЧ TiO_2 вызывает изменение экспрессии генов, связанных с развитием мозга, гибелью нейронов, оксидативным стрессом и повышением активности митохондрий в головном мозге в перинатальный период (Shimizu M. et al., 2009).

В других исследованиях обнаружено (Engler-Chiurazzi E.V. et al., 2016), что НЧ TiO_2 (70 и 35 нм) при внутривенном введении беременным самкам мышей также провоцирует осложнение беременности. При этом НЧ были обнаружены в плаценте, печени и головном мозге плодов. Наблюдение за развитием потомства крыс, которым во время беременности интраназально вводили НЧ TiO_2 , продемонстрировало нарушение поведения и когнитивных функций крысят в возрасте пяти месяцев (Engler-Chiurazzi E.V. et al., 2016). При исследовании влияния внутрижелудочного введения НЧ TiO_2 беременным крысам в дозе 100 мг/кг на пролиферативную активность клеток головного мозга потомства показано, что в нейронах гиппокампа значительно снижается число Ki-67-иммунопозитивных клеток. В этой же работе результаты теста Морриса свидетельствовали о том, что НЧ TiO_2 вызывают ухудшение памяти и способности к обучению у потомства таких самок. Таким образом, выше сказанное указывает на нейротоксический эффект НЧ TiO_2 при пренатальном введении беременным самкам крыс (Mohammadipour A. et al., 2014).

Сравнительное изучение эмбриотоксического действия водных дисперсий микро- и наночастиц (40 нм, смесь рутила и анатаза) НЧ TiO_2 при пероральном введении крысам во время беременности (Tochilkina L.P. et al., 2014) в дозе 100 мг/кг показало, что наночастицы и микрочастицы оказывают на лабораторных крыс-самок сходное слабовыраженное общетоксическое действие. Однако при исследовании пренатального воздействия НЧ TiO_2 авторами описаны разнонаправленные проявления процессов морфофункционального созревания потомства и зарегистрирован комплекс отклонений в развитии, что явилось следствием воздействия на материнский организм TiO_2 разной размерности.

Таким образом, несмотря на существование гематических барьеров, которые в целом достаточно эффективно защищают развивающийся организм от вредных влияний, исследованные нами НЧ TiO_2 оказывают существенные эмбриотоксические эффекты, в том числе и отсроченные по их проявлению у подвергшегося антенатальному воздействию потомства.

Проведенное нами исследование морфофункциональных изменений органов лимфоидной, нервной и репродуктивной систем при воздействии нанодисперсного TiO_2 рутильной модификации свидетельствует о негативном их влиянии на различные клетки и ткани (рис. 69).

ИММУННАЯ СИСТЕМА		НЕРВНАЯ СИСТЕМА		РЕПРОДУКТИВНАЯ СИСТЕМА	
ТИМУС	Акцидентальная инволюция ↑ апоптоз ↓ пролиферация	Дегенеративные изменения нейронов	↓ плотность расположения ↓ площадь ядра и перикариона повреждение синтетического и энергетического аппарата	Нарушение сперматогенеза	Дистрофические изменения СЭ ↓ толщина деорганизация слоев дегенерация клеток СЭ и Лейдига ↓ c-kit ⁺ стволовых клеток ↓ пролиферация
СЕЛЕЗЕНКА	Редукция белой пульпы ↑ апоптоз ↓ пролиферация	Активация астроглии	↑ GFAP ⁺ - клеток	Эффекты воздействия НЧ TiO ₂ в антенатальный период на эмбриональное и раннее постнатальное развитие	↑ предимплантационная смертность ↑ постимплантационная смертность ↑ общая эмбриональная смертность ↓ скорость роста и морфофункционального созревания потомства в ранний постнатальный период развития
ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ	Гиперплазия В, Т-зон	Активация ангиогенеза	↑ rVEGF ⁺ - клеток глии и эндотелия сосудов		
МАКРОФАГИ CD68	↑ в тимусе, селезенке, лимфатических узлах (мозговое вещество, синусный гистиоцитоз), печени	Функциональные изменения ЦНС	↓ амплитуда ритмов ЭЭГ (префронтальная, теменная области коры) преобладание медленноволновой активности θ- и Δ-диапазона нейронов префронтальной коры		
НЕЙТРОФИЛЫ	↑ ригидность поверхности ↑ количество в периферической крови		↑ тревожность и ↑ уровень исследовательской активности крыс		
ЛИМФОЦИТЫ	↓ в крови				
ИНДУЦИРОВАННЫЙ ВТОРИЧНЫЙ ИММУНОДЕФИЦИТ (по Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999)		НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ РАССТРОЙСТВА		НАРУШЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ	

Рисунок 69. Морфологические изменения иммунной, нервной и репродуктивной систем при воздействии рутинной модификации нанодисперсного TiO₂

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В экспериментальных условиях изучены последствия введения нанодисперсного диоксида титана рутильной модификации крысам в концентрации, сопоставимой со среднесуточной дозой потребления человеком в составе различных продуктов. Изучены морфофункциональные изменения лимфоидных органов, системы крови, головного мозга, репродуктивной системы на фоне перорального и интраназального введения НЧ TiO_2 .

Результаты исследования выявили морфофункциональные изменения иммунной системы, которые можно трактовать с позиции индуцированного вторичного иммунодефицита, развивающегося на фоне воздействия НЧ TiO_2 . Определяется умеренная акцидентальная инволюция тимуса, редукция белой пульпы селезенки, обусловленная снижением пролиферативного потенциала и усилением апоптоза, гиперплазия коркового вещества и синусная реакция в лимфатических узлах, увеличение числа гранулоцитов и снижение количества лимфоцитов в периферической крови, нарушение процессов миграции нейтрофилов, связанное с выявленным нами повышением ригидности их поверхности.

Изучение последствий интраназального введения НЧ TiO_2 на морфофункциональные показатели гиппокампа и МК головного мозга показало дегенеративные изменения нейронов, активацию астроглии, что негативно сказывается на функциональном состоянии нейронов (увеличивается амплитуда ритмов ЭЭГ в префронтальной и теменной областях коры, преобладает медленноволновая активность нейронов префронтальной коры, повышается уровень тревожности крыс). Обнаруженные изменения в совокупности с результатами иммуногистохимического исследования можно отнести к нейродегенеративным расстройствам, вызванным интраназальным введением исследуемых НЧ. Вместе с тем увеличение чувствительности ряда клеток изученных структур мозга к VEGF, одной из функций которого является

поддержание в нативном состоянии микроциркуляторного русла, свидетельствует о развитии в мозге процессов адаптации в ответ на действие НЧ.

Наше исследование выявило, что изученные НЧ вызывают деструктивные процессы в органах репродуктивной системы самцов крыс, а у самок негативно сказываются на процессах внутриутробного развития плода и раннего постэмбриогенеза. В семенниках крыс нарушаются процессы сперматогенеза, затрагивающие такие важные для клеток сперматогенного эпителия характеристики, как пролиферативная активность, а также способность к дифференцировке, а подобные негативные изменения не могут не сказаться на качестве гамет. Результаты изучения эмбриотоксического действия НЧ TiO_2 при пероральном введении самкам крыс в течение всего периода беременности показали увеличение показателей пред-, постимплантационной и общей эмбриональной смертности, а также признаки снижения скорости роста и морфофункционального развития потомства в период раннего постнатального онтогенеза.

Таким образом, вопреки устоявшемуся мнению о «безвредности» рутильной формы нанодисперсного диоксида титана, это соединение, обладая способностью проникать через гематические барьеры и аккумулироваться, оказывает неблагоприятное воздействие на самые разнообразные по происхождению и строению ткани и органы. Негативное влияние этих наночастиц заключается в нарушении таких ключевых для любой клетки характеристик, как способность к пролиферации и дифференцировке, а также устойчивости к апоптозу. Как уже было отмечено выше, свои эффекты НЧ TiO_2 реализуют в клетках за счет индукции образования значительного количества АФК и, как следствие этого, развития ОС.

Полученные данные о влиянии длительного воздействия рутильной формы нанодисперсного TiO_2 в концентрации, эквивалентной среднесуточному потреблению человеком на иммунную, нервную и репродуктивную системы, целесообразно использовать для установления безопасных уровней его содержания в продовольственных товарах, лекарственных препаратах, средствах гигиены и т.д., так как их использование никак не регламентировано санитарно-

эпидемиологическими правилами и нормативами, а концентрация устанавливается технологическими инструкциями, то есть – самим производителем.

ВЫВОДЫ

1. Нанодисперсная форма TiO_2 при пероральном и интраназальном введении (рутил, 10 мг/кг массы тела, 30 дней) вызывает морфофункциональные изменения иммунной, нервной и репродуктивной систем.

2. При ежедневном пероральном введении крысам НЧ TiO_2 в лимфоидных органах развиваются морфофункциональные изменения:

- в тимусе – акцидентальная инволюция с уменьшением площади коркового вещества, усиление гибели лимфоцитов по пути апоптоза, снижение пролиферативной активности клеток, повышение содержания CD68^+ макрофагов;

- в селезенке – редукция белой пульпы с уменьшением абсолютного количества клеток и плотности их расположения, но увеличение числа лимфоидных узелков, уменьшение количества пролиферирующих Ki-67^+ -клеток; увеличение апоптотически гибнущих p53 -иммунопозитивных клеток и содержания CD68^+ макрофагов;

- в поверхностных шейных лимфатических узлах – гиперпластическая реакция с возрастанием количества вторичных лимфоидных узелков, усилением в их герминативных центрах пролиферативной активности клеток, а также увеличение числа CD68 -иммунопозитивных клеток в мозговом веществе.

3. В нейтрофилах периферической крови человека с помощью атомно-силовой микроскопии в условиях *in vitro* при непосредственном контакте с НЧ TiO_2 выявлены цитофизиологические нарушения: уменьшение размеров клеток, увеличение высоты и степени шероховатости их поверхности с одновременным увеличением ее ригидности.

4. При ежедневном пероральном введении крысам НЧ TiO_2 в печени определяются:

- дистрофические изменения гепатоцитов, характеризующиеся на ультраструктурном уровне конденсацией хроматина, редукцией гладкой эндоплазматической сети, снижением числа свободных рибосом и полисом;

- избыточная активация перисинусоидальных липоцитов и резидентных

макрофагов печени, а также реактивные изменения микроциркуляторного русла, сопровождающиеся появлением эндотелиоцитов с признаками апоптоза;

- увеличение числа CD68⁺ резидентных макрофагов
- увеличение пролиферативной активности с повышением числа Ki-67-иммунопозитивных клеток.

5. При ежедневном интраназальном введении крысам НЧ TiO₂ в гиппокампе и миндалевидном комплексе головного мозга наблюдаются:

- снижение плотности расположения нейронов, уменьшение площади ядра и перикариона клеток пирамидного слоя CA1, CA3 полей, зубчатой извилины гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса;

- ультраструктурные изменения нейронов, косвенно отражающие повреждение их энергетического аппарата (разрушение наружных мембран митохондрий, значительная деструкция крист) и нарушение синтетической функции (увеличение просвета цистерн гранулярной эндоплазматической сети, уменьшение числа рибосом, разрыхление ядерной оболочки с множественными инвагинациями);

- активация астроцитов, характеризующаяся увеличением плотности GFAP⁺ клеток;

- усиление процессов ангиогенеза, характеризующееся увеличением количества rVEGF-иммунопозитивных клеток.

6. При интраназальном введении крысам НЧ TiO₂ развиваются функциональные изменения ЦНС – снижение средней амплитуды ритмов ЭЭГ и изменение биоэлектрической активности нейронов префронтальной области коры в виде преобладания медленноволновой активности θ - и Δ -диапазона; повышение степени тревожности и уровня исследовательской активности крыс.

7. При ежедневном пероральном введении крысам НЧ TiO₂ в семенниках крыс наблюдаются признаки нарушения сперматогенеза: дистрофические изменения сперматогенного эпителия, проявляющиеся уменьшением его толщины, дезорганизацией слоев, появлением клеток с признаками дегенерации, вакуолизацией sustentоцитов; деструктивные изменения клеток Лейдига;

уменьшение количества c-kit⁺ стволовых клеток в сочетании со снижением их пролиферативной активности, о чем свидетельствует уменьшение числа Ki-67-иммунопозитивных клеток.

8. В результате ежедневного перорального введения беременным самкам крыс НЧ TiO₂ возрастают пред-, постимплантационная, общая эмбриональная смертность и смертность крысят в период вскармливания; наблюдаются признаки задержки роста и морфофункционального созревания потомства в ранний постнатальный период развития.

Список сокращений

АГ — аппарат Гольджи

АЛТ — аланинаминотрансфераза

АСМ — атомно-силовая микроскопия

АСТ — аспартатаминотрансфераза

АФК — активные формы кислорода

ЗИ — зубчатая извилина

ИСК — извитые семенные канальца

МК — миндалевидный комплекс головного мозга

НЧ — наночастицы

ПОЛ — перекисное окисление липидов

СЭ — сперматогенный эпителий

ЦНС — центральная нервная система

ЦЯ — центральное ядро

ЭПС — эндоплазматическая сеть

ЭЭГ — электроэнцефалограмма

CD68 — маркер макрофагов

GFAP — маркер астроцитов

Ki-67 — маркер пролиферирующих клеток

p53 — ядерный маркер апоптоза

PCNA — ядерный антиген пролиферирующих клеток

TiO₂ — диоксид титана

VEGFR-1 (flt-1) — рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста

c-kit — маркер стволовых клеток

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия // М.: Медицина, 1990. – С. 383.
2. Акмаев, И.Г. Нейроиммунноэндоринные взаимодействия: их роль в дисрегуляторной патологии/ И.Г. Акмаев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2001. – № 4. – С. 3–10.
3. Аляхнович, Н.С. Взаимодействие диоксида титана с биологическими средами организма/ Н.С. Аляхнович, Д.К.Новиков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2016. – № 1. – С. 37–42
4. Аляхнович, Н.С. Распространенность, применение и патологические эффекты диоксида титана / Н.С. Аляхнович, Д.К.Новиков // Вестник ВГМУ. – 2016. – Т. 15. – №2. – С. 7–16.
5. Арианова, Е.А. Влияние наночастиц диоксида титана на показатели иммунной системы у крыс / Е.А.Арианова, А.А.Шумакова, О.Н. Тананова Э.Н. Трушина О.К. Мустафина, Н.Э. Шаранова И.В. Гмошинский, С.А.Хотимченко // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81. – № 6.– С. 47–53.
6. Бгатова, Н.П. Апоптоз и аутофагия в клетках гепатокарциномы, индуцированные различными формами солей лития / Н.П. Бгатова, Ю.С. Гаврилова, А.П. Лыков, А.О. Соловьева, В.В. Макарова, Ю.И. Бородин, В.И. Коненков // Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 3. – С. 178–184
7. Бгатова, Н.П. Влияние наноразмерных частиц лития на локальные и системные структурно–функциональные преобразования в организме при опухолевом росте / Н.П. Бгатова, О.П. Макарова, А.А. Пожидаева, Ю.И. Бородин, Л.Н. Рачковская, В.И. Коненков // Успехи наук о жизни. – 2014. – № 9. – С. 17–34.
8. Беляева, А.С. Нейтрофильные гранулоциты как регуляторы иммунитета / А.С. Беляева, Л.В. Ванько, Н.К. Матвеева, Л.В.Кречетова // Иммунология. – 2016. Т.37. – №2. – С. 129–133.
9. Бобрышева, И.В. Мморфометрическое исследование тимуса крыс после экспериментальной иммуносупрессии / И.В. Бобрышева, С.А. Кащенко // Украинский морфологический альманах имени профессора В.Г. Ковешникова. – 2017. –Т.15 –№ 3. – С.13–18.
10. Богданов, О.В. Структурно-функциональное развитие конечного мозга / О.В. Богданов, М.В. Медведева, Н.Н. Василевский. — Л: Наука, 1986. — 152 с.
11. Боголепова, И. Н. Морфометрические исследования цитоархитектоники префронтальной коры мозга мужчин / И. Н. Боголепова, С. Н. Иллариошкин, Л. И. Малофеева, П. А. Агапов, И. Г. Малофеева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2015. – Т. 4. – № 2. – С. 23-26.
12. Боголепова, И.Н. Структурные особенности соотношений ретикулярной формации, гиппокампа и лимбической области коры у некоторых млекопитающих / И.Н.Боголепова, В.В.Амунц, В.С.Кесарев // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1977. – Т. 77. – № 12. – С. 1766-1770.
13. Богословская, О.А. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физико–химическими характеристиками в организм животных / О.А.

Богословская, Е.А. Сизова, В.С. Полякова, С.А. Мирошников, И.О. Лейпунский, И.П. Ольховская, Н.Н. Глушченко // Вестник ОГУ. – 2009. – №2. – С. 124–127.

14. Боков, Д.А. Характеристика сперматогенеза у мышей СВАхС57В16 при комбинированном действии хрома и бензола / Д.А. Боков, Н.Н. Шевлюк // Проблемы репродукции. – 2014. – №2. – С. 7–11.

15. Бородин, Ю.И. Лимфатический узел как маркер средового прессинга на биосистему / Ю.И.Бородин // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 1993. – № 2. – С. 5–9.

16. Бузулуков, Ю. П. Изучение бионакопления наночастиц серебра и золота в органах и тканях крыс методом нейтронно–активационного анализа/ Ю. П. Бузулуков, Е. А. Арианова, В. Ф. Демин, И. В. Сафенкова, И. В. Гмошинский, В. А. Тутельян // Известия РАН. Серия биологическая. – 2014. – № 3. – С. 286–295.

17. Букреева, Т.В. Частицы карбоната кальция и диоксида титана как основа контейнеров для доставки соединений в мозг / Т.В. Букреева, И.В. Марченко, Т.Н. Бородина, И.В. Дегтев, С.Л. Ситников, Ю.В. Моисеева, Н.В. Гуляева, М.В.Ковальчук // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 440. – № 2. – С.191–194.

18. Васендин, Д.В. Особенности микроструктурных изменений в корковом веществе тимуса крыс в катаболической фазе после воздействия экспериментальной гипертермии / Д.В. Васендин, С.В. Мичурина, И.Ю. Ищенко//Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. – 2011. – № 4 (20). – С. 75–79.

19. Васендин, Д.В. Особенности структурных изменений в тимусе при повреждающих воздействиях (обзор литературы) / Д.В. Васендин //Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2014. –№ 2 (139). – С. 59–64.

20. Васюков, Г.Ю. Влияние магнитомицелл на основе наночастиц железа, покрытых углеродом, на структуру печени крыс / Г.Ю. Васюков, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, И.В. Митрофанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14. – №2. – С. 5–11.

21. Васюков, Г.Ю. Ультрасруктура печени и легких крыс после однократного внутривенного введения магнитомицелла на основе покрытых углеродом наночастиц железа / Г.Ю. Васюков, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, И.В. Митрофанова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. –№ 2 (15). –С. 146–150.

22. Гайнитдинова, В.В. АСМ–исследование структурно–функциональных особенностей нейтрофилов у больных хронической обструктивной болезнью легких в фазе обострения / В.В. Гайнитдинова, Л.А. Шарафутдинова, И.М. Камалтдинов, С.Н. Авдеев// Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60. – № 5. – С. 17–22.

23. Гао, Ю. Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке при экспериментальном хроническом язвенном колите / Ю.Гао, Е.А.Постовалова, М.Т.Добрынина,О.В. Макарова //Иммунология. – 2018. –Т. 39. – № 1. С. 32–38.

24. Гланц, С. Медико–биологическая статистика. Пер. с англ./ С.Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

25. Гмошинский, И.В. Наноматериалы в пищевой продукции и ее упаковке: сравнительный анализ рисков и преимуществ / И.В. Гмошинский, В.А. Шипелин, С.А. Хотимченко // Анализ риска здоровью. – 2018. – № 4. – С. 134–142.
26. Григоренко, Д.Е. Печеночные лимфатические узлы крыс после действия СС14 / Д.Е. Григоренко, А.М.Хребтовский // Морфология. – 2006 – Т. 129. – №4. – С.40
27. Гусев, А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии / А. И. Гусев. – М.: Физматлит, 2007. – 416 с.
28. Гусейнов, Т.С. Морфология лимфоидных узелков толстой кишки у человека в онтогенезе /Т.С. Гусейнов, С.Т. Гусейнова, А.Э. Эседова, А.Ш. Кадиев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2015. – № 3 (35). – С. 5–14.
29. Данилов, Р.К. Гистология человека в мультимедиа: учебник/ Р.К.Данилов, А. А. Клишов, Т. Г. Боровая. – СПб.: ЭЛБИ–СПб. – 2003. – 361 с.
30. Ерофеева, Л.М. Морфология тимуса при моделировании экстремальных воздействий (гипергравитации и ионизирующих излучений). Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Москва. – 2002.
31. Ерофеева, Л.М. Особенности цитоархитектоники тимуса крыс при повторном воздействии гипергравитации / Л.М. Ерофеева, И.Б. Краснов, М.Р. Сапин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т.140. – №8. – С. 218.
32. Зайратьянц, О.В. Строение и развитие вилочковой железы. / О.В.Зайратьянц, А.М.Берщанская // В кн. Харченко В.Г. Саркисов Д.С., Ветшев П.С., Галил–Оглы Г.А., Зайратьянц О.В. Болезни вилочковой железы. М. – «Триада–Х». – 1998.– С. 6–46
33. Зайцев, А.В. Морфофункциональные свойства разных типов нейронов и их синаптические связи в префронтальной коре макаки и крысы. Автореферат дис. ... доктора биологических наук / Ин-т эволюц. физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Санкт-Петербург, 2014.
34. Зайцева, Н.В. Влияние наночастиц диоксида кремния на морфологию внутренних органов у крыс при пероральном введении / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, В.Н. Звездин, А.А. Довбыш, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко // Анализ риска здоровью. – 2016. – № 4. – С. 80–94.
35. Звездин, В.Н. Оценка влияния нанодисперсных частиц оксида марганца на гепато–билиарную систему крыс линии Wistar при вынужденном введении через зонд / В.Н. Звездин, Т.И. Акафьева // Здоровье населения и среда обитания. – 2013. – №12. – С. 24–26.
36. Златник, Е.Ю. Морфологические особенности тимуса и селезенки мышей–опухоленосителей при введении металлических наночастиц /Е.Ю. Златник, Е.М. Непомнящая, О.Г. Шульгина, Е.И. Золотарева //Известия высших учебных заведений. Северо–Кавказский регион. Серия: Естественные науки. – 2017. –№ 4–2 (196–2). – С. 41–47.

37. Каркищенко, Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов/ Каркищенко Н.Н. // Биомедицина. – 2009. – № 1. – С. 5–27.

38. Кварацхелия, А.Г. Морфологическая характеристика тимуса и селезенки при воздействии факторов различного происхождения/А.Г. Кварацхелия, С.В. Ключкова, Д.Б. Никитюк, Н.Т. Алексеева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2016. – Т.5, №3. – С. 77–83.

39. Коломеец, Н. С. Современные представления о реактивности астроцитов при шизофрении [Текст] = Current conceptions about astrocyte reactivity in schizophrenia / Н. С. Коломеец, Н. А. Уранова // Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова. – 2014. – Т. 114. – № 5, вып. 1. – С. 92–99.

40. Косырева, А.М. Возрастные особенности и половые различия морфофункциональных изменений тимуса у крыс вистар при системном воспалительном ответе / А.М.Косырева, О.В.Макарова, Е.Ю.Осмоловская // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – № 1 (17). – С. 18–26.

41. Ланг, Т.А. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т.А. Ланг, М. Сесик. –М.: Практическая Медицина, 2011. – 480 с.

42. Лаштур, А.Л. Маркетинг рынка диоксида титана/ А.Л. Лаштур, В.В.Ерёмин// В сборнике: Экономика России в XXI веке. Сборник научных трудов XII Всероссийской научно-практической конференции «Экономические науки и прикладные исследования». В 2-х томах. Под редакцией Г.А. Барышевой, Л.М. Борисовой; Томский политехнический университет. – 2015. – С. 223–227.

43. Лебединская, Е.А. Иммуноморфологические особенности тимуса крыс на фоне введения цитостатика в эксперименте / Е.А. Лебединская, О.В. Лебединская, А.П. Годовалов, В.С. Прокудин //Саратовский научно-медицинский журнал. – 2016. – Т.12, № 1. – С.12–14.

44. Лукутцова, Н.П. Фотокаталитическое покрытие на основе добавки нанодисперсного диоксида титана// Н.П.Лукутцова, О.А. Постникова, Г.Н. Соболева, Д.В. Ротарь, Е.В.Оглоблина // Строительные материалы. – 2015. – № 11. – С. 5–8.

45. Лурия, А.П. Основы нейропсихологии.– М.: Наука, 1973. – 192 с.

46. Лушников, Е.Ф. Гибель клетки (апоптоз) / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов, – Москва: Медицина, 2001. –189 с.

47. Макарова, О.В. Морфологические изменения тимуса, состава его клеток и субпопуляций лимфоцитов периферической крови при экспериментальном остром язвенном колите / О.В. Макарова, Е.А.Постовалова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163.–№5. – С. 641–646.

48. Масютин, А.Г. Многостенные углеродные нанотрубки индуцируют патологические изменения в органах пищеварительной системы мышей / Масютин А.Г., М.В. Ерохина, К.А. Сычевская, А.А Гусев, И.А. Васюкова, А.Г. Ткачев, Е.А Смирнова, Г.Е. Онищенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161.– № 1.– С. 143–148.

49. Мильто, И.В. Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe₃O₄ / И.В.

Мильто, Г.А. Михайлов, А.В. Ратькин, А.А. Магаева // Бюл. сиб. медицины. – 2008. – Т. 7. – № 1. – С. 32–36.

50. Мильто, И.В. Структура печени, легкого, почек, сердца и селезенки крыс после многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита / И.В. Мильто, И.В.Суходоло // Вестник РАМН. – 2012. –№ 3. – С. 75–79.

51. Мильто, И.В. Структура семенников крыс после внутривенного введения модифицированных наноразмерных частиц магнетита / Мильто И.В., Суходоло И.В., Иванова В.В., Усов В.Ю. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166.– № 11.– С. 632–637.

52. Мильто, И.В. Электронно–микроскопическое исследование печени крыс после внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.А. Миллер // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153. – № 4. – С. 510–513.

53. Митрофанова, И.В. Возможности биомедицинского примененияуглеродных нанотрубок / И.В.Митрофанова, И.В.Мильто, И.В.Суходоло, Г.Ю.Васюков// Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т.13, № 1. – С. 135–144.

54. Михеева, Н.А. Влияние наночастиц золота на митохондриальный потенциал и концентрацию активных форм кислорода опухолевых клеток в различные периоды клеточного цикла *in vitro* / Н.А. Михеева, М.А. Семенова, Г.С. Терентюк, Р.М. Хайруллин, В.А. Михеев, О.В. Столбовская, А.В.Гальчин // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 504.

55. МУ 1.2.2520–09 «Токсиколого–гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» https://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4802

56. Никитенко, О.В. Сравнительная оценка структурных изменений лимфоидных органов при различных способах экспериментального токсического селенового воздействия/ О.В. Никитенко, И.Н.Путалова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т.18, № 2. – С.145–147.

57. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Новикова В.И. Иммунодефицитные инфекционные болезни // Медицинские новости. – 2011. – №5. – С. 1–10.

58. Оленев, С.Н. Конструкция мозга / С.Н. Оленев. — Л.: Медицина, 1987. – 206 с.

59. Пауков, В.С. Клиническая патология: руководство для врачей / В.С. Пауков, И.В. Баринаова, А.В. Берестова, Г.Н. Берченко, В.А. Варшавский, И.Н. Волошук, А.С. Гавриш, Л.Е. Гуревич, Е.А. Дубова, О.В. Зайратьянц, Ю.Р. Зюзя, И.А. Казанцева, Л.В. Кактурский, Е.А. Коган, Н.И. ондриков, А.В. Кононов, А.М. Косырева, Ю.В. Кудрявцев, П.Ф. Литвицкий, О.В.Макарова и др. Москва. – 2018.

60. Петров, Р.В. Иммунология/ Р.В. Петров. – М.: Медицина. – 1987.– 416 С.

61. Плескова, С.Н. Влияние наночастиц магнетита и бактерий на активность надфн–оксидазы и миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов крови человека/ С.Н.Плескова, Э.Р.Михеева, Е.В. Разумкова, Е.Е.Горностаева // Цитология. – 2017. – Т.59. – № 12. – С. 867–873.

62. Плескова, С.Н. Изменения архитектоники и морфометрических характеристик эритроцитов под воздействием наночастиц магнетита / С.Н. Плескова,

Е.Е. Горностаева, Р.Н. Крюков, А.В. Боряков, С.Ю. Зубков// Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 12. – С. 874–880.

63. Плескова, С.Н. Исследование биосовместимости наночастиц с флуоресцирующим центром Er/Yb в ситсеме с нейтрофильными гранулоцитами // С. Н. Плескова, Е.Н. Горшкова, Э.Р. Михеева, А.Н. Шушунов // Цитология. – 2011. – Т. 53. – № 5. – С. 444–449.

64. Плескова, С.Н. Исследование морфологии и ригидности мембран нейтрофильных гранулоцитов в режиме реального времени методом сканирующей зондовой микроскопии / С.Н.Плескова, Ю.Ю.Гущина, М.Б.Звонкова, А.Е.Хомутов Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. –Т. 141.– № 6. – С. 712–714.

65. Плескова, С.Н. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии / С.Н.Плескова, Ю.Ю.Гущина, М.Б. Звонкова// Поверхность. Рентгеновские, синхронные и нейтронные исследования. – 2005. – №1. – С. 48–53.

66. Плотников, Е.Ю. Межклеточный транспорт митохондрий (обзор)/ Е.Ю. Плотников, В.А. Бабенко, Д.Н. Силачев, Л.Д. Зорова, Т.Г.Хряпенкова, Е.С. Савченко, И.Б. Певзнер, Д.Б. Зоров // Биохимия. – 2015. –Т. 80. –№ 5. –С. 642–650.

67. Поворинский, А. Г. Пособие по клинической электроэнцефалографии / А. Г.Поворинский, В.А.Заболотных; АН СССР, Ин-т физиологии им. И. П. Павлова, Ленингр. ин-т усоверш. врачей-экспертов Минсобеса РСФСР. - Л.: Наука: Ленингр. отд-ние, 1987. – 64 с.

68. Подосинников, И.В. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов /И.В.Подосинников, Л.Г.Нилова, И.В. Бабичев // Лаб. Дело. – 1981. – №8. – С. 68–70.

69. Постовалова, Е.А. Морфологические изменения ободочной кишки и субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при экспериментальном остром язвенном колите разной тяжести / Е.А. Постовалова, О.В. Макарова, Ю. Гао // Иммунология. – 2016. – №3.

70. Постовалова, Е.А. Морфофункциональные изменения иммунной ситсемы при экспериментальном язвенном колите. Автореферат дисс. М. – 2018.

71. Почепцов, А.Я. Влияние наночастиц золота на пролиферативную активность половых клеток крыс / А.Я. Почепцов, Ю.И. Великородная, Б.Н. Филатов//Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. –№ 2 (42). – С. 47–50.

72. Распопов, Р.В. Токсиколого–гигиеническая характеристика наночастиц диоксида титана, вводимых в виде дисперсии в желудочно–кишечный тракт крыс. Сообщение 1. Интегральные, биохимические и гематологические показатели, степень всасывания макромолекул в тонкой кишке, повреждение ДНК /Р.В. Распопов, В.М. Верников, А.А. Шумакова, Т.Б. Сенцова, Э.Н. Трушина, О.К. Мустафина, Л.В. Кравченко, И.В. Аксенов, А.В. Селифанов, Г.В. Гусева, Л.И. Авреньева, Н.В. Лашнева, Г.Н. Иванова, И.В. Гмошинский, В.В. Бессонов, С.А. Хотимченко, В.А.Тутельян // Вопросы питания. – 2010. – Т. 79. – № 4. – С. 21–30.

73. Рассказова, В.Ю. Морфофункциональное состояние тимуса под влиянием золотых наночастиц в эксперименте / В.Ю. Рассказова, О.В. Злобина, С.С. Пахомий, А.Б. Бучарская // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2013. – Т.3. – №5. – С.928–930.

74. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: «МедиаСфера», 2000. – 312 с.

75. Рославцева, В.В. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в регуляции развития и функционирования головного мозга: новые молекулы–мишени для фармакотерапии / В.В. Рославцева, А.Б. Салмина, С.В. Прокопенко, Е.А. Пожиленкова, И.В. Кобаненко, Г.Г. Резвицкая // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, №2. – С. 124–133.

76. Русакова, Е.А. Гепатотоксические, гематологические изменения и элементный статус у беременных крыс линии Wistar при действии наночастиц Zn и ZnO / Е.А. Русакова, Е.А. Сизова, С.А. Мирошников, О.Ю. Сипайлова, Ш.А. Макаев // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 4. – С. 524–532.

77. Савельев, С.В. Происхождение мозга / С.В. Савельев. — М.: ВЕДИ, 2005. — 368 с.

78. Савельев, С.В. Сравнительная анатомия нервной системы позвоночных / С.В. Савельев. — М.: Гэотар-мед, 2001. — 272 с.

79. Сапин, М.Р. Иммунная система человека / М.Р. Сапин, Л.Е. Этинген. – М.: Медицина, 1996. – 246 с.

80. Сапин, М.Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит / М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк. – Элиста: Джангар. – 2000. – 184 с.

81. Саркисов, С.А. Цитоархитектоника коры большого мозга человека. Под ред. С.А. Саркисова. М.: Медгиз. – 1949. – 449 с.

82. Семченко, В.В. Гемостаз и сосудистый эндотелий при черепно–мозговой травме / В.В. Семченко, А.Ю. Войнов, З.Ш. Голевцова, Н.В. Говорова, П.Н Щербаков. – Омск–Надым: Омская областная типография. – 2003. – 168 с.

83. Серов, В.В. Соединительная ткань/ В.В. Серов, А.Б. Шехтер–М.: Медицина. —1981. —312 С.

84. Сизова, Е.А. Влияние многократного введения наночастиц меди на элементный состав печени крыс / Е.А. Сизова, С.А. Мирошников, С.В. Лебедев, Н.Н. Глущенко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 6. – С. 142–145.

85. Симонов, П.В. Исследование острой токсичности наночастиц меди и конъюгата наночастиц меди с цефтриаксоном при внутривенном введении / П.В. Симонов // Рецепт. – 2015. – № 3 (101). – С. 66–83.

86. Сипайлова, О.Ю. Гепатотоксический эффект наночастиц оксидов металлов (ZnO и CuO) / О.Ю.Сипайлова, Г.И.Корнеев, С.А.Мирошников, Е.А.Сизова, Е.А.Русакова// Морфология. – 2017. – №1.–С.39–43.

87. Соколова, О.С. Наночастицы диоксида титана в различных кристаллических формах в составе солнцезащитных кремов/ О.С.Соколова // Токсикологический вестник. – 2012. – № 3.– С.38–42.

88. Столбовская, О.В. Атомно–силовая микроскопия морфологических и биофизических особенностей лимфоцитов крови при разных типах сахарного диабета / О.В. Столбовская, Р.М. Хайруллин, Б.Б. Костишко, Е.С. Пчелинцева // Морфологические ведомости. – 2015. – №3. – С. 52–57.

89. Струков, А.И. Патологическая анатомия/ А.И. Струков, В.В. Серов. –М.: Медицина, 1995. –688 с.

90. Тананова, О.Н. Влияние наночастиц диоксида титана на белковый профиль микросом печени крыс / Тананова О.Н., Арианова Е.А., Гмошинский И.В., Аксенов И.В., Згода В.Г., Хотимченко С.А. // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81. – № 2. – С. 18–22.

91. Тырсина, Е.Г. Роль регуляторной VEGF/ VEGF–R1–системы в опухолевом ангиогенезе (обзор литературы) / Е.Г.Тырсына, С.И. Никулицкий // Онкогинекология. – 2015. – № 4. – С.4–12.

92. Улумбеков, Э.Г. Гистология (введение в патологию) / Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Челышев // Издательство: М.: Гэотар Медицина. – 1997.

93. Фатхутдинова, Л.М. Токсичность искусственных наночастиц /Л.М. Фатхутдинова, Т.О. Халиуллин, Р.Р.Залялов // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90. – № 4. – С. 578–584.

94. Филатов, Б.Н. Производство и применение наноматериалов (токсиколого–гигиенические проблемы) / Б.Н. Филатов, Л.И.Бочарова, В.В.Клаучек, А.А.Масленников, А.Я.Почепцов, Л.П. Точилкина // Фармакология. – 2015. – Т.16. – С. 259–266.

95. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: классификация, фармакологическое действие, клиническое применение. // Фарматека. – 2004 – № 7. — С. 10–15.

96. Ходанович, М.Ю. Влияние диоксида титана на некоторые функции центральной нервной системы крыс/ М.Ю. Ходанович, Н.А. Кривова, Т.А. Замощина, Р.Т. Тухватулин, О.Б. Заева, Д.Я. Суханов, А.Е. Зеленская, Е.В., Гуль, А.В.Микрюкова // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – № 2(14). – С. 96–109.

97. Хотимченко, С.А. Безопасность пищевой продукции: новые проблемы и пути решений/ С.А. Хотимченко, В.В. Бессонов, О.В. Багрянцева, И.В. Гмошинский // Медицина труда и экология человека. – 2015. – № 4. – С. 7– 14.

98. Шевелева, С.А. Токсиколого–гигиеническая характеристика наночастиц диоксида титана, вводимых в желудочно–кишечный тракт крыс. Сообщение 2. Состояние микробиоценоза толстой кишки, продукция цитокинов, аллергическая чувствительность / С.А. Шевелева, Г.Г. Кузнецова, С.Ю. Батищева, Н.Р. Ефимочкина, В.М. Верников, В.В. Смирнова, Н.Э. Шаранова, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко, В.А. Тутельян // Вопросы питания. – 2010. – Т. 79. – №5. – С. 29–34.

99. Шевлюк, Н.Н. Гипоталамо–гипофизарно–гонадная система млекопитающих при воздействии на организм дестабилизирующих факторов различной интенсивности/ Н.Н. Шевлюк, А.А. Стадников, Д.А. Боков, Е.В. Блинова// Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007.–№ 78.– С. 185–187.

100. Ярилин А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2010. – 752 с.: ил.
101. Abbas, A. K. Cellular and molecular immunology/ A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai. – 7 th ed. – Philadelphia: Elsevier Saunders. – 2012. – P. 560.
102. ACGIH. Documentation of the threshold limit values for chemical substances. 7. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 2001. Titanium dioxide.
103. Adebambo, O. A. Toxicological responses of environmental mixtures: environmental metal mixtures display synergistic induction of metal-responsive and oxidative stress genes in placental cells/ O. A. Adebambo, P. D. Ray, D. Shea, R. C. Fry // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 289, № 3. – P. 534–541.
104. Adler, S. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects / S. Adler, D. Basketter, S. Creton, O. Pelkonen, V. J. Benthem, J. Van, V. Zuang// *Arch. Toxicol.* – 2010. – Vol. 85, № 5. —P. 367–485.
105. Aggarwal, P. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy / J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil// *Adv. Drug Deliv. Rev.* —2009. —Vol. 61, № 6. – P. 428–437.
106. Ahamed, M. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles/ M. Ahamed, H. A. Alhadlaq, M. A. Khan, P. Karupiah, N. A. Al-Dhabi, J. Nanomater // *ACM DL.* – 2014. P. 1–4.
107. Ahamed, M., Silver nanoparticle applications and human health/ M. Ahamed, M. S. AlSalhi, M. K. J. Siddiqui // *Clinica Chimica Acta.* – 2010. – V. 411, № 23–24. – P. 1841–1848.
108. Alarifi, S. Histologic and apoptotic changes induced by titanium dioxide nanoparticles in the livers of rats / S. Alarifi, D. Ali, A. A. Al-Doaiss, B. A. Ali, M. Ahmed, A. A. Al-Khedhairi // *International Journal of Nanomedicine.* – 2013. – Vol. 8. – P. 3937–3943.
109. Alexander, J.W. History of the medical use of a silver. Organization of ‘nanocrystal molecules’ using DNA / J. W. Alexander, A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng // *Surg. Infect. Nature.* – 2009. – Vol. 10 – P. 289–292.
110. Alivisatos A. P., Johnsson K. P., Peng X., et al. Organization of ‘nanocrystal molecules’ using DNA. *Nature.* – 1996. – Vol. 382. – № 6592. – P. 609–611.
111. Almansour, M. In vivo investigation on the chronic hepatotoxicity induced by intraperitoneal administration of 10–nm silicon dioxide nanoparticles / M. Almansour, S. Alarifi, B. Jarrar // *Int. J. Nanomedicine.* — 2018. – Vol. 13 – P. 2685–2696.
112. Almeida, J. P. In vivo biodistribution of nanoparticles / J. P. Almeida, A. L. Chen, A. Foster, R. Drezek // *Nanomedicine.* – 2011. —Vol. 10, № 3. – P. 815–835.
113. Amara, S. Effects of nanoparticle zinc oxide on emotional behavior and trace elements homeostasis in rat brain/ S. Amara, I.B. Slama, K. Omri, J. El. Ghoul, L. El Mir, K.B. Rhouma, H. Abdelmelek, M. Sakly// *Toxicol. Ind. Health.* – 2015. – Vol. 12. – P. 1202–1209.

114. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) Threshold limit values and biological exposure indices for 1992–1993. Cincinnati: Ohio: American Conference of Governmental industrial hygienists; 1992.
115. Ananth, C. V. Maternal cigarette smoking as a risk factor for placental abruption, placenta previa, and uterine bleeding in pregnancy / C. V. Ananth, D. A. Savitz, E. R. Luther // *Am. J. Epidemiol.* – 1996. – Vol. 144. – P. 881–889.
116. Andersson, P. O. Polymorph– and Size–Dependent Uptake and Toxicity of TiO₂ Nanoparticles in Living Lung Epithelial Cells / P. O. Andersson, C. Lejon, B. Ekstrand–Hammarstrom, C. Akfur, L. Ahlinder, A. Bucht, L. Osterlund // *Small.* – 2011. – Vol. 7. – P. 514–523.
117. Andersson–Willman, B. Effects of subtoxic concentrations of TiO₂ and ZnO nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production / B. Andersson–Willman, U. Gehrman, Z. Cansu, T. Buerki–Thurnherr, H. F. Krug, S. Gabrielsson // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 264, № 1. – P. 94–103.
118. Andreescu, S. Fine Particles in Medicine and Pharmacy. Biomedical applications of metal oxide nanoparticles / S. Andreescu, M. Ornatska, J. S. Erlichman, A. Estevez, J. C. Leiter // Springer. – 2012. – P. 57–100.
119. Anway, M. D. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility / M. D. Anway, A. S. Cupp, M. Uzumcu, M. K. Skinner // *Science.* – 2005. – Vol. 308. – P. 1466–1469.
120. Armenti, A. E. Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats / A. E. Armenti, A. M. Zama, L. Passantino, M. Uzumcu // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 233. – P. 286–296.
121. Arvizo, R.R. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future / R. R. Arvizo, S. Bhattacharyya, R.A. Kudgus, K. Giri, R. Bhattacharya, P. Mukherjee // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – Vol. 41. – P. 2943–2970.
122. Azim, S. A. Amelioration of titanium dioxide nanoparticles–induced liver injury in mice: possible role of some antioxidants / S. A. Azim, H. A. Darwish, M. Z. Rizk, S. A. Ali, M. O. Kadry // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2015. – Vol. 67. – P. 305–314.
123. Baan, R. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc / R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Coglianò // *Lancet Oncol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 295–296.
124. Babin, K. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils / K. Babin, F. Antoine, D.M. Goncalves, D. Girard // *Toxicol Lett.* – 2013. Jul 31. – Vol. 221, № 1. – P. 57–63.
125. Bachler, G. Using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling for dietary risk assessment of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles / G. Bachler, N. von Goetz, K. Hungerbuhler // *Nanotoxicology.* – 2015. – Vol. 9. – P. 373–380.
126. Bahadar, H. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models / H. Bahadar, F. Maqbool., K. Niaz., M. Abdollahi // *Iran. Biomed.* – 2016. – Vol. 20. – P. 1–11.
127. Balenga, N. A. Protective efficiency of dendrosomes as novel nano–sized adjuvants for DNA vaccination against birch pollen allergy / N. A. Balenga, F. Zahedifard,

R. Weiss, M. N. Sarbolouki, J. Thalhamer, S. Rafati // *J. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 124. – P. 602–614.

128. Ban, M. Effect of submicron and nano-iron oxide particles on pulmonary immunity in mice / M. Ban, I. Langonné, N. Huguet, M. Goutet // *Toxicol. Lett.* – 2012. – Vol. 210. – P. 267–275.

129. Bartłomiejczyk, T. Silver nanoparticles allies or adversaries? / T. Bartłomiejczyk, A. Lankoff, M. Kruszewski // *Ann Agric Environ Med.* – 2013. – Vol. 20, № 1. – P. 48-54.

130. Basarkar, A. Poly (lactide-co-glycolide)- Polymethacrylate nanoparticles for intramuscular delivery of plasmid encoding interleukin-10 to prevent autoimmune diabetes in mice / A. Basarkar, J. Singh // *Pharm. Res.* – 2009. – Vol. 26. – P. 72–81.

131. Beck, H. Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling // *J. Neuropathol. Exp, Neurol.* – 2002. Vol. 61. – P. 339–350.

132. Becker K, Schroecksnadel S, Geisler S, et al. TiO₂ nanoparticles and bulk material stimulate human peripheral blood mononuclear cells. *Food Chem Toxicol.* – 2014. – Vol. 65, № 100. – P. 63–69.

133. Bednarski, M. The influence of the route of administration of gold nanoparticles on their tissue distribution and basic biochemical parameters: In vivo studies / M. Bednarski, M. Dudek, J. Knutelska, L. Nowinski, J. Sapa, M. Zygmunt, G. Nowak, M. Luty-Blocho, M. Wojnicki, K. Fitzner, M. Tesiorowski // *Pharmacol. Rep.* – 2015. – Vol. 67. – P. 405.

134. Ben-David Makhlef, S. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality / S. Ben-David Makhlef, R. Qasem., S. Rubinstein., A. Gedanken., H. Breitbart // *Langmuir.* – 2006. – Vol. 22. – P. 9480–9482.

135. Benezra, M. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma / M. Benezra, O. Penate-Medina, P. Zanzonico // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, № 7. – P. 2768–2780.

136. Bennat, C. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter / C. Bennat, C. C. Muller-Goymann // *Int. J. Cosmet. Sci.* – 2000. – Vol. 22. – P. 271–283.

137. Bettini, S. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon / S. Bettini, E. Boutet-Robinet, C. Cartier, et al. // *Sci. Rep.* – 2017. №. 7. – P. 40.

138. Bianco, A. Applications of carbonnanotubesindrugdelivery / A. Bianco, K. Kostarelos., M. Prato // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2005. – Vol. 9. – P. 674–679.

139. Blander, J. M. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation / J. M. Blander, R. Medzhitov // *Nat. Immunol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 1029–1035.

140. Blum, J. L. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth / J. L. Blum, J. Q. Xiong, C. Hoffman, J. Zelikoff // *Toxicol. Sci.* – 2012. – Vol. 126. – P. 478–486.

141. Böckmann, J. Blood levels of titanium before and after oral administration of titanium dioxide / J. Böckmann, H. Lahl, T. Eckhert, B. Unterhalt // *Pharmazie.* – 2000. – Vol. 55. – P. 140–143.

142. Bogdan, J. Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review / J. Bogdan, J. Pławińska-Czarnak, J. Zarynska // *Nanoscale. Res. Lett.* – 2017. – Vol. 12, № 1. – P. 225.
143. Boisen, A. M. Z. NanoTiO₂ (UV-Titan) does not induce ESTR mutations in the germline of prenatally exposed female mice / A. M. Z. Boisen, T Shipley, P. Jackson, K. S. Hougaard, H Wallin, C. L. Yauk // *Part. Fibre. Toxicol.* – 2012. – Vol. 9. – P. 19.
144. Bokov, D. A. Eksperimentalnoe modelirovanie toksikogennoi patologii embriogeneza: ekologicheskie aspekti / D. A. Bokov, P. S. Neverova, M.P. Obidchenko, M. A. Senchukova, N. N. Shevlyuk // *Vestnik OGU.* – 2015. – Vol. 10, № 185. – P. 203–207.
145. Bonner, J.C. Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium / J. C. Bonner, R. M. Silva, A. J. Taylor // *Environ. Health Perspect.* – 2013. – Vol. 121, № 6. – P. 676–682.
146. Boraschi, D. Interaction of nanoparticles with immunocompetent cells: nanosafety considerations / D. Boraschi, L. Costantino, P. Italiani // *Nanomedicine (London).* – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 121–131.
147. Braciale, T. J. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection / T. J. Braciale, J. Sun, T. S. Kim // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 295–305.
148. Braydich-Stolle, L. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells / L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, M. C. Hofmann // *Toxicol. Sci.* – 2005. – Vol. 88. – P. 412–419.
149. Braydich-Stolle, L. K. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells / L. K. Braydich-Stolle, B. Lucas, A. Schrand, R. C. Murdock, T. Le, J. J. Schlager // *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* – 2010. – Vol. 116. – P. 577–589.
150. Bregoli, L. Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines / L. Bregoli, F. Chiarini, A. Gambarelli, G. Sighinolfi, A. M. Gatti, P. Santi // *Toxicology.* – 2009. – Vol. 262. – P. 121–129.
151. Brieger, K. Reactive oxygen species: from health to disease / K. Brieger, S. Schiavone, F.J. Miller, K. H. Krause // *Swiss. Med. Wkly.* – 2012. – Vol. 142. – P. w13659.
152. Brohi, R.D. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review/ R.D. Brohi, L. Wang, H.S. Talpur et al. // *Front Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 606.
153. Brown, D. M. An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis / D. M. Brown, I. A. Kinloch, U. Bangert, A. H. Windle, D. M. Walter, G. S. Walker, C. A. Scotchford, K. Donaldson, V. Stone // *Carbon.* – 2007. – Vol. 45. – P. 1743–1756.
154. Calixto, G. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review / G. Calixto, J. Bernegossi, L. de Freitas, C. Fontana, M. Chorilli // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21. – P. 342.
155. Cao, Y. C. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection / Y. C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin // *Science.* – 2002. – Vol. 297, № 5586. – P. 1536–1540.

156. Carlson, C. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species / C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand, K. Braydich-Stolle, L. Hess, K. L. Jones, R. L. Schlager // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112. – P. 13608–13619.
157. Celardo, I. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles / I. Celardo, J. Z. Pedersen, E. Traversa, L. Ghibelli // *Nanoscale*. – 2011. – Vol. 3, № 4. – P. 1411–1420.
158. Cesta, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen // *Toxicol. Pathol.* – 2006. – Vol. 34, № 5. – P. 455–465.
159. Cha, C. Carbon-based nanomaterials: multi-functional materials for biomedical engineering / C. Cha, S. R. Shin, N. Annabi, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7, № 4. – P. 2891–2897.
160. Chaudhry, Q. Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS)—revision of the opinion on the safety of the use of titanium dioxide, nano form, in cosmetic products // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 73. – P. 669–670.
161. Chen, J. Y. Effects of titanium dioxide nano-Particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure / J.Y. Chen, X. Dong, Y. Y Xin, M. R. Zhao // *Aquat Toxicol.* – 2011. – Vol. 101, № 3–4. – P. 493–499.
162. Chen, J. Y. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection / J. Y. Chen, X. Dong, J. Zhao, G. P. Tang // *J. Appl. Toxicol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 330–337.
163. Chen, P. C. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing / P. C. Chen, S. C. Mwakwari, A. K. Oyelere // *Nanotechnology, Science and Applications*. – 2008. – Vol. 1. – P. 45–66.
164. Chen, Q. Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo / Q. Chen, Y. Xue, J. Sun // *Int. J. Nanomedicine*. – 2013. —Vol. 8. – P. 1129–1140.
165. Chen, Y. Sodium chloride modified silica nanoparticles as a non-viral vector with a high efficiency of DNA transfer into cells / Y. Chen, Z. Xue, D. Zheng, K. Xia, Y. Zhao, T. Liu // *Curr. Gene Ther.* – 2003. – Vol. 3. – P. 273–279.
166. Chen, Y. W. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperused lungs / Y. W. Chen, K. C. Hwang, C. C. Yen, Y. L. Lai // *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. R21–R26.
167. Chen, Z. Application of DODMA and Derivatives in Cationic Nanocarriers for Gene Delivery / Z. Chen, A. Zhang, Z. Yang, X. Wang, L. Chang, Z. Chen, L. J. Lee // *Curr. Org. Chem.* – 2016. – Vol. 20. – P. 1813–1819.
168. Chen, Z. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro / Z. Chen, Y. Wang, T. Ba, Y. Li, J. Pu, T. Chen, Y. Song, Y. Gu, Q. Qian, J. Yang, G. Jia // *Toxicology Letters*. – 2014. – Vol. 226, № 3. – P. 314–319.
169. Cheng, L. Functional Nanomaterials for Phototherapies of Cancer / L. Cheng, C. Wang, L. Feng, K. Yang, Z. Liu // *Chem. Rev.* – 2014. – Vol. 114. – P. 10869–10939.
170. Cheng, Y. Multifunctional Nanoparticles for Brain Tumor Diagnosis and Therapy / Y. Cheng, R. Morshed, B. Auffinger, A. L. Tobias, M. S Lesniak // *Advanced drug delivery reviews*. – 2014. – Vol. 0. – P. 42–57.

171. Cheng, Y. Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy / Y. Cheng, H. Cheng, C. Jiang, X. Qiu, K. Wang, W. Huan, A. Yuan, J. Wu, Y. Hu // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6.

172. Cho, W. S. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration / W. S. Cho, B. C. Kang, J. K. Lee, J. Jeong, J. H. Che, S. H. Seok // *Part Fibre Toxicol.* – 2013. – Vol. 10, № 9.

173. Choi, E. W. The effect of gene therapy using CTLA4Ig/silica–nanoparticles on canine experimental autoimmune thyroiditis / E. W. Choi, I. S. Shin, C. W. Lee, H. Y. Youn // *J. Gene Med.* – 2008. – Vol. 10. – P. 795–804.

174. Choi, H. Sol–gel preparation of mesoporous photocatalytic TiO₂ films and TiO₂/Al₂O₃ composite membranes for environmental applications / H. Choi, E. Stathatos, D. D. Dionysiou // *Appl. Catal. B.* – 2006. – Vol. 63. – P. 60–67.

175. Choi, Jeong–Sun. Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors Flt–1 And Flk–1 in Rat Hippocampus after Transient Forebrain Ischemia/ Choi, Jeong–Sun & Kim, Ha–Young & Cha, Jung–Ho & Choi, Jae–Youn & Chun, Myung–Hoon & Lee, Mun–Yong // *Journal of Neurotrauma.* – 2007. – Vol. 24, №3.

176. Chouikrat, R. Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments / R. Chouikrat, A. Seve, R. Vanderesse, H. Benachour, M. Barberi–Heyob, S. Richeter, L. Raehm, J. O. Durand, M. Verelst, C. Frochot // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 19. – P. 781–792.

177. Christian, V. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions / V. Christian, F. Heidi, C. Rachel, V. Marie–Bernadette, M. Patrice // *Journal of Nanoparticle Research.* – 2010. – Vol. 12. – P. 55–60.

178. Chu, M. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier / M. Chu, Q. Wu, H. Yang, R. Yuan, S. Hou, Y. Yang // *Small.* – 2010. – Vol. 6. – P. 670–678.

179. Chun–Mei, L. I. Effects of exposure to nanoparticle–rich diesel exhaust on pregnancy in rats / L. I. Chun–Mei, L. I. Xuezheng, A. K. Suzuki, Y. Zhang, Y. Fujitani, K. Nagaoka // *J. Reprod. Dev.* – 2013. – Vol. 59. – P. 145–150.

180. Coll, C. Enzyme–mediated controlled release systems by anchoring peptide sequences on mesoporous silica supports / C. Coll, L. Mondragón, R. Martínez–Máñez // *Chem. Int. Ed.* – 2011. – Vol. 50, № 9. – P. 2138–2140.

181. Colombeau, L. Light–Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine / L. Colombeau, S. Acherar, F. Baros, P. Arnoux, A. M. Gazzali, K. Zaghdoudi, M. Toussaint, R. Vanderesse, C. Frochot // *Inorganic Nanoparticles for Photodynamic Therapy.* – 2016. – Vol. 370 Springer; Cham, Switzerland. – P. 113–134.

182. Colvin, V. The potential environmental impact of engineered nanomaterials // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, № 10. – P. 1166–1170.

183. Croll, S. D. VEGF–mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain / S. D. Croll, R. M. Ransohoff, N. Cai, Q. Zhang, F. J. Martin, T. Wei // *Exp. Neurol.* – 2004. – Vol. 187. – P. 388–402.

184. Cui, Y. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles / Y. Cui, L. H. Liu, T. M. Zhou, Y. Duan, M. N. Li, X. Gong, L. R. P. Hu, M. M. Hong, F. S. Hong // *J. Biomed. Mater.* – 2011.
185. Dan, M. Silver Nanoparticle Exposure Induces Neurotoxicity in the Rat Hippocampus Without Increasing the Blood-Brain Barrier Permeability / M. Dan, H. Wen, A. Shao, L. Xu // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2018. – Vol. 14, № 7. – P. 1330-1338.
186. Daubeshies, I. Ten lectures on wavelets, SIAM, 1992. Русский перевод: Добеши И. Десять лекций по вейвлетам. Ижевск: РХД. – 2001.
187. De La Zerda, A. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agent in living mice / A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren // *Nat. Nanotechnol.* – 2008. — Vol. 9, № 3. – P. 557–562.
188. De Matteis, V. Toxicity assessment in the nanoparticle era / V. De Matteis, R. Rinaldi, Q. Saquib, M. Faisal, A. A. Al-Khedhairy, A. A. Alatar // *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*. Cham: Springer International Publishing. – 2018. – P. 1–19.
189. de Vries, C. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor / C. de Vries, J. A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, Ferrara N., L. T. Williams // *Science*. – 1992. – Vol. 255. – P. 989–991.
190. Di Bona, K. R. Short- and long-term effects of prenatal exposure to iron oxide nanoparticles: influence of surface charge and dose on developmental and reproductive toxicity / K. R. Di Bona, Y. Xu, M. Gray, D. Fair, H. Hayles, L. Milad // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 30251–30268.
191. Ding, D. MoO_{3-x} quantum dots for photoacoustic imaging guided photothermal/photodynamic cancer treatment / D. Ding, W. Guo, C. Guo, J. Sun, N. Zheng, F. Wang, M. Yan, S. Liu // *Nanoscale*. – 2017. – Vol. 9. – P. 2020–2029.
192. Disdier, C. Tissue biodistribution of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat / C. Disdier, J. Devoy, A. Cosnefroy, M. Chalansonnet, N. Herlin-Boime, E. Brun // *Part. Fibre. Toxicol.* – 2015. – Vol. 12. – P. 27.
193. Dobrovolskaia, M. A. Dendrimer-induced leukocyte procoagulant activity depends on particle size and surface charge / M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, T. M. Potter, J. C. Rodriguez, J. B. Hall, S. E. McNeil // *Nanomedicine (Lond)*. – 2012. – Vol. 7. – P. 245–256.
194. Dobrzynska, M. M. Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo / M. M. Dobrzynska, A. Gajowik, J. Radzikowska, A. Lankoff, M. Dusinska, M. Kruszewski // *Toxicology*. – 2014. – Vol. 315. – P. 86–91.
195. Dobson, J. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects / J. Dobson, G. F. de Queiroz, J. P. Golding // *Vet. J.* – 2018. – Vol. 233. – P. 8–18.
196. Dua, Y. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice / Y. Dua, J. Liu, L. Ma, N. Li, H. Liu, J. Wang, L. Zheng, C. Liu, X. Wang, X. Zhao, J. Yan, S. Wang, H. Wang, X. Zhang, G. F. Hang // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – P. 894–899.
197. Dulinska, I. Stiffness of normal and pathological erythrocyte studied by means of atomic force microscopy / I. Dulinska, M. Targosz, W. Strojny // *J. Biochem. Biophys. Methods*. – 2006. – Vol. 9, № 1–3. – P. 1–11.

198. Dziadek, M. Biodegradable ceramic– Polymer composites for biomedical applications: a review. *Materials Science & Engineering* / M. Dziadek, E. Stodolak–Zych, K. Cholewa–Kowalska. – 2017. – Vol. 71. – P. 1175–1191.
199. Easo, S. L. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vitro studies / S. L. Easo, P.V. Mohanan // *Int. J. Pharm.* – 2016. – Vol. 509. – P. 28.
200. Ebabe Elle, R. Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation / R. Ebabe Elle, S Gaillet, J. Vide, C. Romain, C. Lauret, N. Rugani, J. P. Cristol, J. M. Rouanet // *Food Chem. Toxicol.* – 2013. – Vol. 60. – P. 297.
201. El–Daly, A.A. The Histopathological, Ultrastructural and Immunohistochemical Effects of Intraperitoneal Injection with Titanium Dioxide Nanoparticles and Titanium Dioxide Bulk on the Liver of the Albino Mice/ A.A. El–Daly // *J. Anim. Health Behav. Sci.*– 2017, №1. – P. 104.
202. Elder, A. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system / A. Elder, R. Gelein, V. Silva, T. Feikert, L. Opanashuk, J. Carter, R. Potter, A. Maynard, Y. Ito, J. Finkelstein // *Environ. Health Perspect.* – 2006. – Vol. 114. – P. 1172–1178.
203. El–Say, K. Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery / K. El–Say, H. S. El–Sawy // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2017. – Vol. 528, № 1–2. – P. 675–691.
204. El–Sayed, I. H. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti–EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer / I. H. El–Sayed, X. Huang, M. A. El–Sayed // *Nano Letters.* – 2005. – Vol. 5, № 5. – P. 829–834.
205. Engler–Chiurazzi, E. B. Impacts of prenatal nanomaterial exposure on male adult Sprague–Dawley rat behavior and cognition // *J. Toxicol. Environ. Health Part A.* – 2016. – Vol. 79. – P. 447–452.
206. Eom, H. J. P38 MAPK Activation, DNA Damage, Cell Cycle Arrest and Apoptosis As Mechanisms of Toxicity of Silver Nanoparticles in Jurkat T Cells / H. J. Eom, J. Choi // *Environmental Science & Technology.* – 2010. – Vol. 44. – P. 8337–8342.
207. Farokhzad, O. C. Impact of nanotechnology on drug delivery / O. C. Farokhzad, R. Langer // *ACS Nano.* – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 16– 20.
208. Fatouh, A.M. Intranasal agomelatine solid lipid nanoparticles to enhance brain delivery: formulation, optimization and in vivo pharmacokinetics/ atouh AM, Elshafeey AH, Abdelbary A. // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2017. –№. 11. – P. 1815–1825.
209. FDA. Code of Federal Regulations Title 21–Food and Drugs. 21 CFR 73.2575. Washington, DC: US Government Printing Office; 2002. Listing of color additives exempt from certification.
210. Feng, X. L. Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles / X. L. Feng, A. J. Chen, Y. L. Zhang, J. F. Wang, L. Q. Shao, L. M. Wei // *Int. J. Nanomed.* – 2015. – Vol. 10. – P. 4321–4340.
211. Flores, J. O. Food–grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model / J. O. Flores, A. Gonzalez–Robles, J. Pedraza–Chaverri,

R. Hernandez– Pando, M. Rodriguez–Sosa, S. Leon–Cabrera // *Food Chem. Toxicol.* – 2016. – Vol. 93. – P. 20–31.

212. Ford, J. Review of Silver–Coated Urinary Catheters—Draft / J. Ford, G. Hughes, P. Phillips // *Literature SMTL.* – 2014.

213. Frick, R. Comparison of manganese oxide nanoparticles and manganese sulfate with regard to oxidative stress, uptake and apoptosis in alveolar epithelial cells / R. Frick, B. Müller–Edenborn, A. Schlicker // *Toxicology Letters.* – 2011. – Vol. 205, № 2. – P. 163–172.

214. Fröhlich, E. Cellular Targets and Mechanisms in the Cytotoxic Action of Non–biodegradable Engineered Nanoparticles // *Curr. Drug. Metab.* – 2013. – Vol. 14, № 9. – P. 976–988.

215. Gaca, J. G. Prevention of acute lung injury in swine: depletion of pulmonary intravascular macrophages using liposomal clodronate / J. G. Gaca, D. Palestrant, D. J. Lukes, M. Olausson, W. Parker, Jr. Davis // *J. Surg. Res.* – 2003. – Vol. 112. – P. 19–25.

216. Gaiser, B. K. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro / B. K. Gaiser, S. Hirn, A. Kermanizadeh, N. Kanase, K. Fytianos, A. Wenk, N. Haberl, W. Kreyling, V. Stone // *Toxicol Sci.* – 2013. – Vol. 131. – P. 537–547.

217. Gamer, A. O. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin / A. O. Gamer, E. Leibold, B. van Ravenzwaay // *Toxicol. In Vitro.* – 2006. —Vol. 20. – P. 301–307.

218. Gao, G. D. Titanium dioxide nanoparticle–induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice / G. D. Gao, Y. G Ze, X. Y. Zhao, X. Z. Sang, L. Zheng, X. Ze, S. X. Gui, L. Sheng., Q. Q. Sun, J. Hong, X. H. Yu, L. Wang, F. S. Hong, X. G. Zhang // *J. Hazard. Mater.* – 2013. – Vol. 258. – P. 133–143.

219. Gao, G. Ovarian dysfunction and gene–expressed characteristics of female mice caused by long–term exposure to titanium dioxide nanoparticles / G. Gao, Y. Ze, B. Li, X. Zhao, T. Zhang, L. Sheng // *J. Hazard. Mater.* – 2012. – Vol. 243. – P. 19–27.

220. Gao, H. From the cover: mechanics of receptor–mediated endocytosis / H. Gao, W. Shi, L. B. Freund // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2005. – Vol. 102, № 27. – P. 9469–9474.

221. Garcia, T. X. Sub–acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels / T. X. Garcia, G. M. Costa, L. R. França, M. C. Hofmann // *Reproductive Toxicology.* – 2014. – Vol. 45. – P. 59–70.

222. Geraets, L. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats / L. Geraets, A. G. Oomen, P. Krystek, N. R. Jacobsen, H. Wallin, M. Laurentie, H. W. Verharen, E. F. Brandon, W. H. de Jong // *Part Fibre Toxicol.* – 2014. – Vol. 11. – P. 30.

223. Ghaderi, S. Fluorescence nanoparticles ‘quantum dots’ as drug delivery system and their toxicity: a review / S. Ghaderi, B. Ramesh, A. M. Seifalian // *Journal of Drug Targeting.* – 2011. – Vol. 19, № 7. – P. 475–486.

224. Gómez, S. Allergen immunotherapy with nanoparticles containing lipopolysaccharide from *Brucella ovis* / S. Gómez, C Gamazo, B. San Roman, M. Ferrer, M. L. Sanz, S. Espuelas, J. M. Irache // *J. Pharm. Biopharm.* – 2008. Vol. 70. – P. 711–717.

225. Gómez, S. Nanoparticles as an adjuvant for oral immunotherapy with allergens / S. Gómez, C. Gamazo, B. S. Roman, M. Ferrer, M. L. Sanz, J. M. Irache, A. N. Gantrez // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – P. 5263–5271.
226. Goncalves, D.M. The inflammatory process in response to nanoparticles / D.M. Goncalves, R. de Liz, D. Girard // *ScientificWorldJournal*. – 2011. – Vol. 11. – P. 2441–2.
227. Griveau, J. F. Reactive oxygen species, lipid– Peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa / J. F. Griveau, E. Dumont, P. Renard, J. P. Callegari, D. L. Lannou // *J. Reprod. Fert.* –1995. – Vol. 103. – P. 17–26.
228. Guo, L. L. Effects of nanosized titanium dioxide on the reproductive system of male mice / L. L. Guo, X. H. Liu, D. X. Qin, L. L. Gao, H. M. Zhang // *National J. Androl.* – 2009. – Vol. 15, № 6. – P. 517–522.
229. Gustafson H. H., Holt–Casper D., Grainger D. W., Ghandehari H. Nanoparticle uptake: the phagocyte problem. *Nano Today*. – 2015. – Vol, № 4. – P. 487–510.
230. Gustafsson, Å. Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long–lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat / Å. Gustafsson, E. Lindstedt, L. S. Elfsmark, A. Bucht // *J. Immunotoxicol.* – 2011. – Vol. 8, № 2. – P. 111–121.
231. Haase, A. Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time–of–flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses / A. Haase, H. F. Arlinghaus, J. Tentschert, H. Jungnickel, P. Graf, A. Manton, F. Draude, S. Galla, J. Plendl, M. E. Goetz, A. Masic, W. Meier, A. F. Thunemann, A. Taubert, A. Luch // *ACS Nano*. – 2011. – Vol. 5, № 4. – P. 3059–3068.
232. Hadrup, N. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – A review / N. Hadrup, H. R. Lam // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 68, № 1. – P. 1–7.
233. Hagens, W. I. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? / W. I. Hagens, A. G. Oomen, W. H. de Jong, F. R. Cassee, A. J. A. M. Sips // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 49, № 3. – P. 217–229.
234. Han, D. D. Nano–zinc oxide damages spatial cognition capability via over–enhanced long–term potentiation in hippocampus of Wistar rats / D. D. Han, Y. T. Tian, T. Zhang, G. G. Ren, Z. Yang // *Int. J. Nanomedicine*. – 2011. – Vol. 6. – P. 1453–1461.
235. Han, J. W. Male– and female–derived somatic germ cell–specific toxicity of silver nanoparticles in mouse / J. W. Han, J. K. Jeong, S. Gurunathan, Y. J. Choi, J. Das, D. N. Kwon et al. // *Nanotoxicology*. – 2016. – Vol. 10, № 3. – P. 361–373.
236. Hanley, C. The Influences of cell type and ZnO nanoparticle size on immune cell cytotoxicity and cytokine induction / C. Hanley, A. Thurder, C. Hanna, A. Punnoose, J. Zhang, D. G. Wingett // *Nanoscale Res. Lett.* – 2009. – Vol. 4. – P. 1409–1420.
237. Hassanein K. M. Protective effects of thymoquinone and avenanthramides on titanium dioxide nanoparticles induced toxicity in Sprague–Dawley rats / K. M. Hassanein, Y. O. El–Amir // *Pathol. Res. Pract.* – 2017. – Vol. 213, № 1. – P. 13–22.
238. Heller, C. G. Quantification of Leydig cells and measurement of Leydig–cell size following administration of human chorionic gonadotrophin to normal men / C. G. Heller, D. R. Leach // *J. Reprod. Fert.* –1971. – Vol. 25, № 2. – P. 185–192.

239. Heng, B. Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles / B. Heng, X. Zhao, E. Tan, N. Khamis, A. Assodani, S. Xiong, C. Ruedl, K. Ng, J. Loo // *Arch. Toxicol.* – 2011. – Vol. 85, № 12. – P. 1517–1528.

240. Heringa, M. B. Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications / M. B. Heringa, R. J. B. Peters, R. L. A. W. Bleyes et al. // *Part. Fibre Toxicol.* – 2018. – Vol. 15, № 1. – P. 15.

241. Heringa, M. B. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations / M. B. Heringa, L. Geraets, J. C. van Eijkeren, R. J. Vandebriel, W. H. de Jong, A. G. Oomen // *Nanotoxicology.* – 2016. – Vol. 20, № 10. – P. 1515–1525.

242. Heringa, M.B. Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications / M.B. Heringa, R.J.B. Peters, R.L.A.W. Bleyes, et al. // *Part Fibre Toxicol.* – 2018. Vol .15, № 1. – P.15.

243. Heydrnejad, M. S. Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Liver and Some Hematological Parameters in Male and Female Mice (*Mus musculus*) / M. S. Heydrnejad, R. J. Samani and S. Aghaeivanda // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2015. – Vol. 165, № 2. – P. 153–158.

244. Higaki, M. Treatment of experimental arthritis with poly(D, L–lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate / M. Higaki, T. Ishihara, N. Izumo, M. Takatsu, Y. Mizushima // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64. – P. 1132–1136.

245. Hillier, S. G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis // *Hum. Reprod.* –1994. – Vol. 9, № 2. – P. 188–191.

246. Hillyer, J. F. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles / J. F. Hillyer, R. M. Albrecht // *J. Pharm. Sci.* – 2001. – Vol. 90, № 12. – P. 1927–1936.

247. Hong, F. Exposure to TiO₂ nanoparticles induces immunological dysfunction in mouse testitis / F. Hong, Y. Wang, Y. Zhou, Q. Zhang, Y. Ge, M. Chen et al. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2016. – Vol. 64, № 1. – P. 346–355.

248. Hong, F. Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO₂ / F. Hong, Y. Zhou, L. Wang // *Environ. Toxicol.* – 2017. – Vol. 32, № 10. – P. 2234–2243.

249. Hong, F. Maternal exposure to nanosized titanium dioxide suppresses embryonic development in mice / F. Hong, Y. Zhou, X. Zhao, L. Sheng, L. Wang // *Int. J. Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 6197–6204.

250. Hong, F. Progress of in vivo studies on the systemic toxicities induced by titanium dioxide nanoparticles / F. Hong, X. Yu, N. Wu, Y. Zhang // *Toxicol. Res.* – 2017. – Vol. 6, № 2. – P. 115–133.

251. Hong, F. TiO₂ nanoparticles–induced apoptosis of primary cultured Sertoli cells of mice / F. Hong, X. Zhao, M. Chen, Y. Zhou, Y. Ze, L. Wang et al. // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2016. – Vol. 104, № 1. – P. 124–135.

252. Hong, F. Exposure to TiO₂ nanoparticles induces immunological dysfunction in mouse testitis. / F.Hong, Y.Wang, Y.Zhou, Q.Zhang, Y.Ge, M.Chen et al. // *J. Agric. Food Chem.* 2015a. – Vol. 64. – P. 346–355.

253. Horie, M. Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells / M. Horie, K. Nishio, K. Fujita et al. // *Chem. Res. Toxicology.* – 2009. – Vol. 22, № 3. – P. 543–553.

254. Hou, C. C. Nanoparticles and female reproductive system: how do nanoparticles affect oogenesis and embryonic development / C. C. Hou, J. Q. Zhu // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 65. – P. 109799–109817.

255. Hu, R. P. Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles / R. P. Hu, L. Zheng et al. // *J. Hazard Mater.* – 2011. – Vol. 191, № 1–3. – P. 32–40.

256. Hu, R. P. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO₂ nanoparticles / R. P. Hu, X. L. Gong, Y. M. Duan et al. // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 31, № 31. – P. 8043–8050.

257. Hu, R.P. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO₂ nanoparticles/ R.P. Hu, X.L. Gong, Y.M. Duan et al // *Biomaterials.*– 2010. №3.

258. Huang, H. C. Photodynamic therapy synergizes with irinotecan to overcome compensatory mechanisms and improve treatment outcomes in pancreatic cancer / H. C. Huang, S. Mallidi, J. Liu, C. T. Chiang, Z. Mai, R. Goldschmidt, N. Ebrahim–Zadeh, I. Rizvi, T. Hasan // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 76, № 5. – P. 1066–1077.

259. Huerta–Garcia, E. Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells / E. Huerta–Garcia, J. A. Perez–Arizti, S. G. Marquez–Ramirez // *Free Radical Biol. Med.* – 2014. – Vol. 73. – P. 84–94.

260. Hunter, D. D. Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea / D. D. Hunter, B. J. Udem // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* –1999. – Vol. 159, № 6. – P. 1943–1948.

261. Hussain, M. Biomimetic strategies for sensing biological species / M. Hussain, J. Wackerlig, P. A. Lieberzeit // *Biosensors (Basel).* – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 89 –107.

262. Huybrechts, I. Long–term dietary exposure to different food colours in young children living in different European countries/ I. Huybrechts, I. Sioen , P.E. Boon , M. De Neve , P. Amiano, C. Arganini et al. // *EFSA Supporting publication* 2010. – Vol. 7. – P. 70.

263. IARC. Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. IARC Sci Publ. 2006;86

264. Idris, N. M. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote–controlled nanotransducers / N. M. Idris, M. K. Gnanasammandhan, J. Zhang, P. C. Ho, R. Mahendran, Y. Zhang // *Nat. Med.* – 2012. – Vol. 18. – P. 1580–1585.

265. Ilinskaya, A. N. Inhibition of phosphoinositol 3 kinase contributes to nanoparticle–mediated exaggeration of endotoxin–induced leukocyte procoagulant activity / A. N. Ilinskaya, S. Man, A. K. Patri, J. D. Clogston, R. M. Crist, R. E. Cachau et al. // *Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 9, № 9. – P. 1311–1326.

266. Inbaneson, J. S. Antibacterial potential of silver nanoparticles against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens / J. S. Inbaneson, S. Ravikumar, N. Manikandan // *Appl. Nanosci.* – 2011. – Vol. 1, № 4. – P. 231–236.

267. Ishida, T. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes / T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima, H. Kiwada // *J. Control. Release.* – 2006. – Vol. 112, № 1. – P. 15–25.

268. Ishida, T. PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner / T. Ishida, X. Wang, T. Shimizu, K. Nawata, H. Kiwada // *J. Control. Release.* – 2007. – Vol. 122, № 3. – P. 349–355.

269. Jackson, P. Prenatal exposure to carbon black (Printex 90): effects on sexual development and neurofunction / P. Jackson, U. Vogel, H. Wallin, K. S. Hougaard // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2011.– Vol. 109, № 6. – P. 434–437.

270. Jacobs, J. J. Release and excretion of metal in patients who have a total hip-replacement component made of titanium-base alloy / J. J. Jacobs, A. K. Skipor, J. Black, R. Urban, J. O. Galante // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 1991. – Vol. 73, № 10. – P. 1475–1486.

271. Jafari, A. Hepatoprotective effect of thymol against subchronic toxicity of titanium dioxide nanoparticles: Biochemical and histological evidences / A. Jafari, Y. Rasmi, M. Hajaghazadeh, M. Karimipour // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 58. – P. 29–36.

272. Jafari, A.R. Mixed metal oxide nanoparticles inhibit growth of Mycobacterium tuberculosis into THP-1 cells / A.R. Jafari, T. Mosavi, N. Mosavari., A. Majid, F. Movahedzade, M. Tebyaniyan, S. Arastoo // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2016. – Vol. 5. – P. 181–183.

273. Jain, S. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration / S. Jain, D. G. Hirst, J. M. O'Sullivan // *Br. J. Radiol.* – 2012. Vol. 85. – P. 101.

274. Jania, P. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration/ P.Jania, D. McCarthya, AT. Florence // *Int J Pharm.* – 1994. – Vol. 10.—P.157–168.

Janson, C.H. Experimental evidence for route integration and strategic planning in wild capuchin monkeys// *Anim. Cogn.* – 2007. – N 10(3). – P. 341-356.

275. Javitt, D.C. Neurophysiological biomarkers for drug development in schizophrenia / D.C. Javitt, K. M. Spencer, G. K. Thaker, G. Winterer, M. Hajos // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7. – P. 68–83.

276. Jeng, H. A. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells / H. A. Jeng, J. Swanson // *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* – 2006. —Vol. 41, № 12. – P. 2699–2711.

277. Jia, F. Effect of pubertal nano-TiO₂ exposure on testosterone synthesis and spermatogenesis in mice / F. Jia, Z. Sun, X. Yan, B. Zhou, J. Wang // *Arch Toxicol.* – 2014. – Vol. 88. – P. 781–788.

278. Jones, K. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles / K. Jones, J. Morton, I. Smith, K. Jurkschat, A. H. Harding, G. Evans // *Toxicol. Lett.* —2015. – Vol. 233. – P. 95–101.

279. Jovanović, B. Critical Review of Public Health Regulations of Titanium Dioxide, a Human Food Additive // Integrated Environmental Assessment and Management. – 2015. – Vol. 11, № 1. – P. 10–20.

280. Jovanović, B. Review of titanium dioxide nanoparticle phototoxicity: Developing a phototoxicity ratio to correct the endpoint values of toxicity tests/ B. Jovanović// Environ. Toxicol. Chem. – 2015. Vol. 34, № 5. – P. 070–1077.

281. Juan, H. Effects of titanium dioxide nanoparticles on development and maturation of rat preantral follicle in vitro / H. Juan, W. Xu Ying, W. Fei, X. Gui Feng, L. Zhen, Z. Tian Bao // Acad. J. Second Mil. Med. Univ. – 2009. – Vol. 30. – P. 869–873.

282. Justo–Hanani, R. The role of the state in regulatory policy for nanomaterials risk: Analyzing the expansion of state–centric rulemaking in EU and US chemicals policies / R. Justo–Hanani, T. Dayan // Res Policy. – 2014. —Vol. 43. —P. 169–178.

283. Kafshdooz, L. The application of gold nanoparticles as a promising therapeutic approach in breast and ovarian cancer / L. Kafshdooz, T. Kafshdooz, Z. Razban, A. Akbarzadeh // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. – 2016. – Vol. 44. – P. 1222–1227

284. Kaida, T. Optical characteristics of titanium oxide interference film and the film laminated with oxides and their applications for cosmetics / T. Kaida, K. Kobayashi, M. Adachi, F. Suzuki // J. Cosmet. Sci. – 2004. – Vol. 55. – P. 219–220.

285. Kalkanidis, M. Methods for nano– Particle based vaccine formulation and evaluation of their immunogenicity / M. Kalkanidis, G. A. Pietersz, S. D. Xiang, P. L. Mottram, B. Crimeen–Irwin, K. Ardipradja, M. Plebanski // Methods. – 2006. – Vol. 40. – P. 20–29.

286. Kao, Y. Y. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity / Y.Y. Kao, Y. C. Cheng, T. J. Cheng, Y. M. Chiung, P. S. Liu // Toxicol Sci. – 2012. – Vol. 125. —P. 462–472.

287. Kao, Y.Y. Demonstration of an olfactory bulb–brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo / Y.Y. Kao, T. J. Cheng, D. M. Yang, C. T. Wang, YM Chiung, P. S. Liu // J. Mol. Neurosci. – 2012. —Vol. 48, № 2. – P. 464–471.

288. Kapralov, A. A. Adsorption of Surfactant Lipids by Single–Walled Carbon Nanotubes in Mouse Lung upon Pharyngeal Aspiration / A. A. Kapralov, W. H. Feng, A. A. Amoscato, N. Yanamala, K. Balasubramanian, D. E. Winnica, E. R. Kisin, G. P. Kotchey, P. Gou, L. J. Sparvero, P. Ray, R. K. Mallampalli, J. Klein–Seetharaman, B. Fadeel, A. Star, A. A. Shvedova. V. E. Kagan // ACS Nano. – 2012.

289. Karimipour, M. Oral administration of titanium dioxide nanoparticle through ovarian tissue alterations impairs mice embryonic development / M. Karimipour, M. Zirak Javanmard, A. Ahmadi, A. Jafari // International Journal of Reproductive Biomedicine. – 2018. – Vol. 16, № 6. – P. 397–404.

290. Katsnelson, B. A. Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe₃O₄) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: Are we defenseless against nanoparticles? / B. A. Katsnelson, L. I. Privalova, S.V. Kuzmin, T. D. Degtyareva, M. P. Sutunkova, O. S. Yeremenko, I. A. Minigalieva, E. P. Kireyeva, M. Y. Khodos, A. N. Kozitsina // Int. J. Occup. Environ. Health. —2010. – Vol. 16. – P. 508–524.

291. Katsnelson, B. Experimental estimates of the toxicity of iron oxide Fe₃O₄ (magnetite) nanoparticles / B. Katsnelson, L. Privalova, T. Degtyareva // *Cent. Eur. J. Occup. Environ. Med.* – 2010. – Vol. 16. – P. 47–63.

292. Khaled, M. A. Protective effects of thymoquinone and avenanthramides on titanium dioxide nanoparticles induced toxicity in Sprague–Dawley rats / M. A. Khaled, Dr. Hassanein, O. El–Amir. Yasmin // *Pathology, research and practice.* – 2017. – Vol. 213, № 1. – P. 13–22.

293. Khan, M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles / M. Khan, A. H. Naqvi, M. Ahmad // *Toxicol Rep.* – 2015. – Vol. 2. – P. 765–774.

294. Khorsandi, L. Morphometric and stereological assessment of the effects of titanium dioxide nanoparticles on the mouse testicular tissue / L. Khorsandi, M. Orazizadeh, E. Mansouri, M. Hemadi, N. Moradi–Gharibvand // *Bratisl Lek Listy.* – 2016. —Vol. 117, № 11. – P. 659–664.

295. Kim, S. Near–infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping / S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand., J. Lee, A. Nakayama // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 93–97.

296. Kiss, A. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development / A. Kiss, S. Scsukova // *Europe PMC.* – 2015. – Vol. 49. № 2. – P. 97–112.

297. Kitchin, K. T. Oxidative stress studies of six TiO₂ and two CeO₂ nanomaterials: Immuno–spin trapping results with DNA / K. T. Kitchin, R.Y. Prasad, K. Wallace // *Nanotoxicology.* – 2010. – Vol. 5. – P. 546–556.

298. Kolomeec, N. S. Modern ideas of reactivity of astrocytes at schizophrenia / N. S. Kolomeec, N. A. Uranova // *Z. Hurnal nevrologii i psichiatrii.* – 2014. – Vol. 5. – P. 92–99.

299. Komatsu, T. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro / T. Komatsu, M. Tabata, M. Kubo–Irie, T. Shimizu, K.I. Suzuki, Y. Nihei, K. Takeda // *Toxicol in Vitro.* – 2008. – Vol. 22. – P. 1825–1831.

300. Kong, L. Mechanisms involved in reproductive toxicity caused by nickel nanoparticle in female rats / L. Kong, X. Gao, J. Zhu, K. Cheng, M. Tang // *Environ. Toxicol.* – 2016. – Vol. 31. – P. 1674–1683.

301. Kong, L. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats / L. Kong, M. Tang., T. Zhang, D. Wang, K. Hu., W. Lu // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 21253–21269.

302. Kongseng, S. Cytotoxic and inflammatory responses of TiO₂ nanoparticles on human peripheral blood mononuclear cells / S. Kongseng, K. Yoovathaworn, K. Wongprasert, R. Chunhabundit, P. Sukwong, D. Pissuwan // *J. Appl. Toxicol.* – 2016. – Vol. 36, № 10. – P. 1364–1373.

303. Krawczyńska, A. Silver and titanium dioxide nanoparticles alter oxidative/inflammatory response and renin–angiotensin system in brain / A. Krawczyńska, K. Dziendzikowska, J. Gromadzka–Ostrowska, A. Lankoff, A. P. Herman, M. Oczkowski, T. Królikowski, J. Wilczak, M. Wojewódzka, M. Kruszewski // *Food Chem. Toxicol.* – 2015. – Vol. 85. – P. 96–105.

Krettek, J.E. A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex / J.E.Krettek, J.L.Price // *Brain Res.* – 1974. – Vol. 67, № 1. – P. 169–74.

304. Kuempel, E. D. Lung dosimetry and risk assessment of nanoparticles: evaluating and extending current models in rats and humans / E. D. Kuempel, C. L. Tran, V. Castranova, A. J. Bailer // *Inhal Toxicol.* – 2006. – Vol. 18. – P. 717–724.

305. Kumari, M. Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats / M. Kumari, S. Rajak, S.P. Singh, U.S. Murty, M. Mahboob, P. Grover, M.F. Rahman // *Drug Chem. Toxicol.* – 2013. – Vol. 36. – P. 296.

306. Kunzmann, A. Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells / A. Kunzmann, B. Andersson, C. Vogt, N. Feliu, F. Ye, S. Gabrielsson, M. S. Toprak, T. Buerki-Thurnherr, S. Laurent, M. Vahter, H. Krug, M. Muhammed, A. Scheynius, B. Fadeel // *Toxicology and Applied Pharmacology.* – 2011. – Vol. 253. – P. 81–93.

307. Kunzmann, A. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation // *Biochim. Et. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1810. – P. 361–373.

308. Kustubayeva, A. M. Age dynamics of rhythms of brain electrical activity. Level of anxiety and EEG indices [Vozrastnaja dinamika ritmov `elektricheskoy aktivnosti mozga. Uroven' trevozhnosti i EEG–indeksy] // *Experimental Psychology [Eksperimental'naja psihologija].* – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 5– 20.

309. Lafuente, A. Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen / A. Lafuente, A. González-Carracedo, A. Romero, A.I. Esquifino // *J. Physiol. Biochem.* – 2003. Mar. – Vol. 59, № 1. – P.43–48.

310. Lafuente, D. Effects of oral exposure to silver nanoparticles on the sperm of rats. / D. Lafuente, T. Garcia, J. Blanco, D.J. Sánchez, J.J. Sirvent, J.L. Domingo et al. // *Reprod. Toxicol.* – 2016. – Vol. 60. – P. 133–139.

311. Lai, J. C. K. / J. C. K. Lai, M.B. Lai, S. Jandhyam, V.V. Dukhande, A. Bhushan, C.K. Daniels, S.W. Leung // *International Journal Nanomedicine.* – 2008. – Vol. 3. – P. 533–545.

312. Lan, Z. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier / Z. Lan, W.X. Yang // *Nanomedicine.* – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. 579–596.

313. Lankveld, D.K. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. / D.K. Lankveld, A.G. Oomen, P. Krystek, A. Neigh, A. Troost-de Jong, C.W. Noorlander, [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31, № 32. – P. 8350–8361.

314. Leclerc, L. Testicular biodistribution of silica–gold nanoparticles after intramuscular injection in mice / L. Leclerc, J.P. Klein, V. Forest, D. Boudard, M. Martini, J. Pourchez, [et al.] // *Biomed. Microdevices.* – 2015. – Vol. 17, № 4 – P. 66.

315. Lee, K.P. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years / K.P. Lee, H.J. Trochimowicz, C.F. Reinhardt // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 1985. – Vol. 79, № 2. – P. 179–192

316. Lee, T.Y. Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration / T.Y. Lee, M.S. Liu, L.J. Huang, S.I. Lue, L.C. Lin, A.L. Kwan, R.C. Yang // *Part Fibre Toxicol.* – 2013. Aug 19. – Vol. 10. – P. 40.

317. Lekka, M. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope / M. Lekka, M. Fornal, G. Pyka-Fosciak [et al.] // *Biorheology*. – 2005. – Vol. 9, № 4. – P. 307–317.
318. Lennert, K. The germinal center: morphology, histochemistry and immunohistology// *Lymphoproliferative Diseases*. Berlin. –1982.—P. 3–15.
319. Lewis, D.A. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia / D.A. Lewis, T. Hashimoto, D.W. Volk//*Nat. Rev. Neurosci.* – 2005. – Vol. 6, №4. – P. 312–324.
320. Li, C.M. Effects of inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust on regulation of testicular function in adult male rats/ C.M. Li, S.I. Taneda, K.I. Taya, G. Watanabe, X. Li , Y. Fujitani, Ito Yuki, T.K. Nakajima Akira. Suzuki // *Inhalation Toxicology*. – 2009. – Vol. 21, №10. – P. 803–811.
321. Li, J. Oxidative stress and neuro-degenerative disorders/ J. Li, O. W., W. Li, Z.G. Jiang, H.A. Ghanbari // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, № 12. – P. 24438–24475.
322. Li, N. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticules/ N. Li, Y.M. Duan, M.M. Hong, L. Zheng, M. Fei, X.Y. Zhao, J. Wang, Y.L. Cui, H.T. Liu, J.W. Cai, S.J. Gong, H. Wang, F.S. Hong // *Toxicol. Lett.* – 2010. Vol. 195, №2–3. – P. 161–168.
323. Li, X. Apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured murine microglia N9 cells / X. Li, S. Xu, Z. Zhang, H.J. Schluesener // *Chin Sci Bull.* – 2009. – Vol. 54, №20. – P. 3830–3836.
324. Li, Y. Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice / Y.Li, J. Li, J. Yin, W. Li, C. Kang, Q. Huang, Q. Li // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2010. – Vol.10. – P. 8544–8549.
325. Lin, Z. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles/ Z. Lin, N.A. Monteiro-Riviere, J.E. Riviere // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* – 2015. – Vol. 7, № 2. – P. 189–217.
326. Liu, H. Biochemical toxicity of nano-anatase TiO₂ particles in mice/ H.Liu, L. Ma, J. Zhao// *Biol Trace Elem Res.* – 2008. – Vol. 129, №13. – P. 170–180.
327. Liu, Y. Oxidative stress and acute changes in murine brain tissues after nasal instillation of copper particles with different sizes / Y.Liu, Y. Gao, Y. Liy, B. Li, C. Chen, G. Wu//*J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2014. – Vol.14, №6. – P. 4534–4540.
328. Liu, Y. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice/ Y.Liu, Z. Xu, X. Li, K. Yamashita, Y. Yoshioka, K. Higashisaka, K. Mimura, Y. Morishita, M. Nozaki[et. al.] // *Nat Nanotechnol.* – 2011. – Vol.6, №5. – P. 321–328.
329. Lomer, MC. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease/ MC.Lomer, R.P. Thompson, J.J. Powell // *Proc Nutr Soc.* – 2002. – Vol.61, №1. – P. 123–130.
330. Long, T C. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity / T C. Long, N. Saleh, R.D. Tilton, G.V. Lowry, B. Veronesi// *Environ Sci Technol.* – 2006. – Vol.40, №14. – P. 4346–4352.
331. Long, T. C. Nanosize Titanium Dioxide Stimulates Reactive Oxygen Species in Brain Microglia and Damages Neurons in Vitro/ T. C. Long, J. Tajuba, P. Sama, N. Saleh,

C. Swartz, J. Parker, S. Hester, G.V. Lowry, B. Veronesi // *Environ Health Perspect.* – 2007. – Vol.115, №11. – P. 1631–1637.

332. Lucarelli, M. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles / M. A.Lucarelli, M. Gatti, G. Savarino, P. Quattroni, L. Martinelli, E. Monari, [et al.] // *Eur Cytokine Netw.* – 2004. – Vol.15, №4. – P. 339–346.

333. Ma, L. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity/ L. Ma, J. Liu, N. Li, J. Wang, Y. Duan, J. Yan, H. Liu, H. Wang, F. Hong // *Biomaterials.* – 2010. – Vol.31, №1. – P.99–105.

334. Ma, L. The Acute Liver Injury in Mice Caused by Nano-Anatase TiO₂ / L. Ma, J. Zhao, J. Wang, et al. // *Nanoscale Res Lett.* – 2009. – Vol.4, №11. – P.1275–1285.

335. Ma, Y. Titanium dioxide-based nanomaterials for photocatalytic fuel generations/ Y. Ma, X. Wang, Y. Jia, X. Chen, H. Han, C. Li // *Chem Rev.* – 2014. – Vol.114, №19. – P.9987–10043.

336. Mac Nicoll, A. A study of the uptake and biodistribution of nano-titanium dioxide using in vitro and in vivo models of oral intake / A. MacNicoll, M. Kelly, H. Aksoy, E. Kramer, H. Bouwmeester, Q. Chaudhry // *J Nanopart Res.* – 2015. – Vol.17, №2. – P.66.

337. Ma-Hock L. Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance/ L. Ma-Hock, S. Burkhardt, V. Strauss [et al] // *Inhal. Toxicol.* – 2009. – Vol. 21, № 2. – P. 102–111.

338. Malam, Y. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer / Y. Malam, M. Loizidou, A.M. Seifalian // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2009. – Vol.30, №11. – P.592–599.

339. Maleki Dizaj, S. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles / S. Maleki Dizaj, A. Mennati, S. Jafari, K. Khezri, K. Adibkia // *Advanced Pharmaceutical Bulletin.* – 2015. – Vol.5, №1. – P.19–23.

340. Mano, S.S. Comparison of cellular uptake and inflammatory response via toll-like receptor 4 to lipopolysaccharide and titanium dioxide nanoparticles/ S.S. Mano, K. Kanehira, A. Taniguchi // *Int J Mol Sci.* – 2013. – Vol.14, №7. – P.13154–13170.

341. Manolova, V. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size / V. Manolova, A. Flace, M. Bauer, K. Schwarz, P. Saudan, M.F. Bachmann // *European Journal of Immunology.* – 2008. – Vol.38, №5. – P.1404–1413.

342. Marazziti, D. Psychiatric disorders and mitochondrial dysfunctions / D. Marazziti, S. Baroni, M. Picchetti [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol.* – 2012. – Vol.16, №2. – P. 270–275.

343. Marin, S. Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review/ S. Marin, G.M. Vlasceanu, R.E. Tiplea, I.R. Bucur, M. Lemnar, M.M. Marin and A.M. Grumezescu // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2015. – Vol.15, №16. – P.1596–1604.

344. Marti, H.H. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors / H.H. Marti, W. Risau // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95, №26. – P.15809–15814.

345. Massaad, C.A. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory / C.A. Massaad, E. Klann // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – Vol.14, №10. – P.2013– 2054.

346. Mauricio, M.D. Nanoparticles in Medicine: A Focus on Vascular Oxidative Stress / M.D. Mauricio, S. Guerra–Ojeda, P. Marchio et al. // *Oxid Med. Cell Longev.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–20.

347. Maysinger, D. Real–time imaging of astrocyte response to quantum dots: in vivo screening model system for biocompatibility of nanoparticles / D. M. Maysinger, Behrendt, M. Lalancette–Hebert, J. Kriz // *Nano Lett.* – 2007. – Vol.7, №8. – P.2513–2520.

348. Medina, C. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. / C. Medina, M.J. Santos–Martinez, A. Radomski, O.I. Corrigan, M.W. Radomski // *Br J Pharmacol.* – 2007. – Vol.150, №5. – P.552–558.

349. Meena R., Oxidative stress mediated cytotoxicity of TiO₂ nano anatase in liver and kidney of Wistar rat / R.Meena, R. Paulraj // *Toxicological & Environmental Chemistry.* – 2012. – Vol. 94, №1. – P. 146–163

350. Meena, R. Nano–TiO₂–Induced Apoptosis by Oxidative Stress–Mediated DNA Damage and Activation of p53 in Human Embryonic Kidney Cells / R. Meena, M. Rani, R. Pal [et al.] // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2012. – Vol. 167, №4. – P. 791–808.

351. Menon, R. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes / R. S. Menon, J. Fortunato, J. Yu, G.L. Milne, S. Sanchez, C.O. Drobek [et al.] // *Placenta.* – 2011. – Vol.32, №4. – P.317–322.

Middleton, F.A. Basal-ganglia 'projections' to the prefrontal cortex of the primate / F.A. Middleton, P.L Strick. // *Cereb Cortex.* – 2002. – Vol. 12, № 9 – P. 926-35.

352. Miglietta, M. L. Characterization of carbon based nanoparticles dispersion in aqueous solution using dynamic light scattering technique / M. L. Miglietta, G. Rametta, G. di Francia // *Macromolecular Symposia.* – 2009. – Vol.286, №1. – P.95–100.

353. Mirsattari, S.M. Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver/ S.M. Mirsattari, R.R. Hammond, M.D. Sharpe, F.Y. Leung, G.B. Young // *Neurology.* – 2004. – Vol.62, №8. – P.1408–1410.

354. Mitchell, L.A. Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice/ L.A. Mitchell, F.T. Lauer, S.W. Burchiel, J.D. McDonald // *Nat Nanotechnol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 451–456.

355. Moghimi, S.M. Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: towards development of stealth and target–specific nanocarriers/ S.M. Moghimi // *BiochimBiophysActa.* – 2002. – Vol.1590. – P.131–139.

356. Mohammadipour, A. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring / A.Mohammadipour, A. Fazel, H. Haghiri, F. Motejaded, H. Rafatpanah, H. Zabihi, M. Hosseini, A.E. Bideskan // *Environ Toxicol Pharmacol.* – 2014. – Vol.37. – P.617–625.

357. Montazer, M. Enhanced self–cleaning, antibacterial and UV protection properties of nano TiO₂ treated textile through enzymatic pretreatment / M. S. Montazer, Seifollahzadeh // *Photochem Photobiol.* – 2011. – Vol.87. – P.877–883.

358. Montazer, M. Photo induced silver on nano titanium dioxide as an enhanced antimicrobial agent for wool / A. Montazer, Behzadnia, E. Pakdel, M.K. Rahimi, M.B. Moghadam // *J Photochem Photobiol B.* – 2011. – Vol.103. – P. 207–214.

359. Moon, E.Y. An increase in mouse tumor growth by an in vivo immunomodulating effect of titanium dioxide nanoparticles/ E. Y. Moon, G.H. Yi, J.S. Kang, J.S. Lim, H.M. Kim, S. Pyo // *J Immunotoxicol.* – 2011. – Vol.8, №1. – P.56–67.
360. Morgan, A.M. Reproductive toxicity provoked by titanium dioxide nanoparticles and the ameliorative role of Tiron in adult male rats/ A.M.Morgan, M.A. Ibrahim, P.A. Noshay // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017. – Vol. 486, №2. – P. 595–600.
361. Morimoto, Y. Hazard Assessments of Manufactured Nanomaterials / Y. Morimoto, N. Kobayashi, N. Shinohara, T. Myojo, I. Tanaka, J. Nakanishi // *J Occup Health.* – 2010. – Vol.52. – P.325–324.
362. Muhamedshina, Y.A.O. Astrocytes and microglia of the mouse spinal cord under conditions of support of unloading of the hind limbs / Y.A.O. Muhamedshina, T.V. Povysheva, M.V. Nigmatzyanova, O.V. Tyapkina, R.R. Islamov, E.E. Nikol'skij, Y.U.A. Chelyshev // *Doklady akademii nauk.* – 2014. – Vol.456, №1. – P. 114–116.
363. Muhlfeld, C. Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature / C. M. Muhlfeld, Geiser, N. Kapp, P. Gehr, B. Rothen–Rutishauser // *Part Fibre Toxicol.* – 2007. – Vol.4, №7. – P. 1–8.
364. Muoth, C. Nanoparticle transport across the placental barrier: pushing the field forward! / C. Muoth, L. Aengenheister, M. Kucki, P. Wick, T. Buerki–Thurnherr // *Nanomedicine.* – 2016. – Vol.11. – P. 941–957.
365. Mushtaq, G. Nanoparticles, Neurotoxicity and Neurodegenerative Diseases/ G. J.A. Mushtaq, Khan, E. Joseph, M.A. Kamal // *Curr Drug Metab.* – 2015. – Vol.16, №8. – P.676–684.
366. Myllynen, P. K. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta / P. K. Myllynen, M.J. Loughran, C.V. Howard, R. Sormunen, A.A. Walsh, K.H. Vähäkangas // *Reprod. Toxicol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 130–137.
367. Natarajan, V. Titanium Dioxide Nanoparticles Trigger Loss of Function and Perturbation of Mitochondrial Dynamics in Primary Hepatocytes. López Lluch G, ed / V. Natarajan, C.L. Wilson, S.L. Hayward, S. Kidambi // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol.10, №8. – P.1–19.
368. Newman, M.D. The safety of nanosized particles in titanium dioxide– and zinc oxide–based sunscreens / M.D. Newman, M. Stotland, L. Ellis // *J Am Acad Dermatol.* – 2009. – Vol. 61. – P. 685–692.
369. Ngobili, T.A. Nanoparticles and direct immunosuppression / T.A. Ngobili, M.A. Daniele // *Experimental Biology and Medicine.* – 2016. – Vol.241, №10. – P.1064 – 1073.
370. Ni, M. A review and recent developments in photocatalytic water–splitting using TiO₂ for hydrogen production / M. Ni, M.K.H. Leung, D.Y.C. Leung, K. Sumathy // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2007. – Vol.11. – P.401–425.
371. NIOSH. Current Intelligence Bulletin 63. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health; Occupational Exposure to Titanium Dioxide. – 2011. – № 160.
372. Noorafshan, A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research/ A.Noorafshan// *Ann Anat.* – 2014. – Vol.196, №1. – P. 57–66.

373. Notter, T. Prenatal exposure to TiO₂ nanoparticles in mice causes behavioral deficits with relevance to autism spectrum disorder and beyond / T. Notter, L. Aengenheister, U. Weber–Stadlbauer [et al.] // *Translational Psychiatry*. – 2018. – Vol.8. – P.193.

374. Oberdorster, G. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury / G. J. Oberdorster, Ferin, B.E. Lehnert // *Environ Health Perspect*. – 1994. – Vol.102, №5. – P.173–179.

375. Oberdörster, G. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies/ G. Oberdörster // *Philos Transact R Soc Lond Ser A Math Phys a Eng Sci*. – 2000. – Vol. 358, №1775. – P. 2719–2739.

376. Ogneva, I. Mechanical characteristics of mesenchymal stem cells under impact of silica-based nanoparticles/ I. S. Ogneva, Buravkov, A. Shubenkov, L. Buravkova // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. – Vol. 9, №1. – P. 284–310.

377. Olivero, O. A. Transplacental effects of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys/ O. A. Olivero, S.H. Yuspa, M.C. Poirier, L.M. Anderson, A.B. Jones, C. Wang, [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst*. – 1997. – Vol.89. – P.1602–1608.

378. Ong, C. Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the *Drosophila testis* / C. Q.Ong, Y. Lee, Y. Cai, X. Liu, J. Ding, L.Y.L. Yung [et al.] // *Sci. Rep*. – 2016. – Vol.6.

379. Onishchenko, G.E. Effects of titanium dioxide nanoparticles on small intestinal mucosa in rats / G.E. Onishchenko, M.V. Erokhina, K.V. Shaitan, M.P. Kirpichnikov, R.V. Raspopov, V.V Smirnova. , L.S. Vasilevskaya, I.V. Gmoshinski, V.A. Tutelyan, Abramchuk S.S. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012. T. 154. № 2. C. 265–270.

380. Ortlieb, M. White Giant or White Dwarf? Particle Size Distribution Measurements of TiO₂/ M.Ortlieb // *GIT Lab J Eur*. – 2010. – Vol.14. – P. 42–43.

381. Otsuka, H. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications/ H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka // *Adv.Drug. Deliv. Rev*. – 2003. – № 55. – P. 403–419.

382. Panahi, Y. Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications/ Y. Panahi, M. Farshbaf, M. Mohammadhosseini [et al.] // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2017. – Vol.45, №4. – P. 788–799.

383. Park, E. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS–2B cells/ E. Park, J. Yi, K. Chung // *Toxicology Letters*. – 2008. – Vol.180, №3. – P. 222–229.

384. Participants IRSIW. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. // *Inhal Toxicol*. – 2000. – Vol.12, №1–2. – P.1–17.

385. Patel, T. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system / T. Patel, J. Zhou, J.M. Piepmeier, W.M. Saltzman // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – Vol.64, №7. – P.701–705.

386. Patlolla, A.K. / A.K. Patlolla, D. Hackett, P.B. Tchounwou // *Mol. Cell. Biochem.* – 2015. – Vol. 399, №1–2. – P. 257–268.
387. Patra, C. R. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer/ C. R. Patra, R. Bhattacharya, D. Mukhopadhyay, P. Mukherjee // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2010. – Vol.62, №3. – P.346–361.
388. Patra, M. Changes in agglomeration of fullerenes during ingestion and excretion in *Thamnocephalus platyurus*/ M. Patra, X. Ma, C. Isaacson [et al.]//*Environmental Toxicology and Chemistry.* – 2011. – Vol.30, №4. – P.828–835.
389. Patri, A. Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice / A. Patri, T. Umbreit, J. Zheng, K. Nagashima, P. Goering, S. Francke–Carroll, E. Gordon, J. Weaver, T. Miller, N. Sadrieh // *J Appl Toxicol.* – 2009. – Vol.29, №8. – P.662–672.
390. Paunovic, J. D. Effects Of Metallic Nanoparticles On Physiological Liver Functions/ J. D. Paunovic, Vucevic, T. Radosavljevic, S. Pantic, D. Nikolovski, S. Dugalic and I. Pantic. // *Rev. Adv. Mater. Sci* – 2017. – Vol.49. – P.123–128.
391. Pelaz, B. [et al.] Diverse applications of nanomedicine. // *ACS Nano.* – 2017. – Vol.11, №3. – P.2313–2381.
392. Pele, L.C. Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers/ LC. Pele, V. Thoree, S.F. Bruggraber, D. Koller, R.P. Thompson, M.C. Lomer, J.J. Powell // *Part Fibre Toxicol.* – 2015. – Vol.12, №26. – P. 1–6.
393. Perera, F. P. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population/ F. P. Perera, V. Rauh, W.Y. Tsai, P. Kinney, D. Camann, D. Barr [et al.] // *Environ Health Perspect.* – 2003. – Vol. 111, №2. – P. 201–205.
394. Peters, R.J.B. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles / R.J.B. Peters, G. van Bommel, Z. Herrera–Rivera, H.P.F.G. Helsper, H.J.P. Marvin, S. Weigel, P.C. Tromp, A.G. Oomen, A.G. Rietveld, H. Bouwmeester // *J Agric Food Chem.* – 2014. – Vol.62, №27. – P. 6285–6293.
395. Petkovic, J. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. / J. B. Petkovic Zegura, M. Stevanovic, N. Drnovsek, D. Uskokovic, S. Novak, M. Filipic // *Nanotoxicology.* – 2011. – Vol.5, №3. – P. 341–353.
396. Pflucker, F. The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide / F. Pflucker, V. Wendel, H. Hohenberg, E. Gartner, T. Will, S. Pfeiffer, R. Wepf, H. Gers–Barlag // *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* – 2001. – Vol.14, №1. – P. 92–97.
397. Piccinno, F. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world/ F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, B. Nowack // *J. Nanopart. Res.* – 2012. – Vol.14, №9. – P. 1109–1120.
398. Pickard, R. Antimicrobial catheters for reduction of symptomatic urinary tract infection in adults requiring short–term catheterisation in hospital: A multicentrerandomised controlled trial/ R. Pickard, T. Lam, G. MacLennan, K. Starr, M. Kilonzo, G. McPherson, K. Gillies, A. McDonald, K. Walton, B. Buckley [et al.] // *Lancet.* – 2012. – Vol.380, №9857. – P. 1927–1935.

399. Plate, K.H. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. // *J Neuropathol Exp Neurol.* –1999. – Vol.58. – P. 654–666.

400. Poland, C.A. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study/ C.A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W.A. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. Macnee, K. Donaldson // *Nat Nanotechnol* – 2008. – Vol. 3, №7. – P. 423–428.

401. Poon, I.K.H. Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential/ I.K.H. Poon, C.D. Lucas, A.G. Rossi, K.S. Ravichandran // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – Vol.14, №3 – P.166–180.

402. Powell, J.J. An endogenous nanomineral chaperones luminal antigen and peptidoglycan to intestinal immune cells/ J.J. Powell, E. Thomas-McKay, V. Thoree, J. Robertson, R.E. Hewitt, J.N. Skepper, A. Brown, J.C. Hernandez-Garrido, P.A. Midgley, I. Gomez-Morilla [et al.] // *Nat Nanotechnol.* – 2015. – Vol.10, №4. – P. 361–369.

403. Powers, K. W. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies/ K. W. Powers, M. Palazuelos, B.M. Moudgil, S.M. Roberts // *Nanotoxicology.* – 2007. – Vol.1, №1. – P. 42–51.

404. Praba, V. L. Bactericidal effect of silver nanoparticles against *Mycobacterium tuberculosis* / V. L. Praba, M. Kathirvel, K. Vallayyachari, K. Surendar, M. Muthuraj, P. J. Jesuraj, S. Govindarajan, K.V. Raman // *J. Bionanosci.* – 2013. – №3. – P.282–287.

405. Privalova, L. Some characteristics of free cell population in the airways of rats after intratracheal instillation of copper –containing nano –scale particles / L. Privalova, B. Katsnelson, N. Loginova // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – № 11. – P. 215.

406. Proescholdt, M. A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain / M. A. Proescholdt, J. D. Heiss, S. Walbridge, J. Muhlhauser, M. C. Capogrossi, E. H. Oldfield, M. J. Merrill // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* –1999. – №58. – P. 613–627.

407. Qiao, H. The transport and deposition of nanoparticles in respiratory system by inhalation / H. Qiao, W. Liu, H. Gu, D. Wang, Y. Wang // *Journal of Nanomaterials.* – 2015. – P. 8.

408. Qiu, Y. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods / Y. Qiu, Y. Liu, L. Wang // *Biomaterials.* – 2010. – №31. – P.13.

409. Rajan, B. Synthesis and dose interval dependent hepatotoxicity evaluation of intravenously administered polyethylene glycol –8000 coated ultra –small superparamagnetic iron oxidenano particle on Wistar rats / B. Rajan, S. Sathish, S. Balakumar and T. Devaki // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2015. – №39. – P. 727.

410. Ramadi, K. B. Acute Systemic Exposure to Silver –based Nanoparticles Induces Hepatotoxicity and NLRP3 –dependent Inflammation / K. B. Ramadi, Y. A. Mohamed, A. Al –Sbiei, S. Almarzooqi, G. Bashir, A. Al Dhanhani, D. Sarawathamma, S. Qadri, J. Yasin, A. Nemmar, M. J. Fernandez –Cabezudo, Y. Haik and B. K. Al –Ramadi // *Nanotoxicology.* – 2016. – №10. – P. 46.

411. Rambanapasi, C. / C. Rambanapasi, J. R. Zeevaart, H. Bunting, C. Bester, D. Kotze, R. Hayeshi and A. Grobler // *Molecules.* – 2016. – № 21. – P. 763.

412. Ransohoff, R. M. VEGF –mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain / R. M. Ransohoff, N. Cai, Q. Zhang, F. J. Martin, T. Wei, L. J. Kasselmann // *Exp Neurol.* – 2004. –№ 187. – P. 388–402.
413. Rattanapinyopituk, K. Demonstration of the clathrin –and caveolin –mediated endocytosis at the maternal–fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles / K. Rattanapinyopituk, A. Shimada, T. Morita, M. Sakurai, A. Asano, T. Hasegawa // *J. Vet.* – 2014. –№ 76. – P. 377–387.
414. Reeves, J.F. Hydroxyl radicals (*OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle–induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells / J.F. Reeves, S.J. Davies, N.J. Dodd, A.N. Jha // *Mutat Res.* – 2008. Apr 2. – Vol. 640, №1–2. – P.113–22.
415. Refuerzo, J. S. Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats/ J. S. Refuerzo, B. Godin, K. Bishop, S. Srinivasan, S. K. Shah, S. Amra // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2011. –№ 204. – P. 546.
416. Ritter, J. Effectiveness of a silver –alloy and hydrogel coated urinary catheter on symptomatic catheter –associated urinary tract infections / J. Ritter, L. Thomas, J. Lederer, W. R. Jarvis // *Am. J. Infect. Control.* – 2013. –№41. – P.143–144.
417. Ritz, C. Germline mutation rates in mice following in utero exposure to diesel exhaust particles by maternal inhalation / C. Ritz, W. Ruminski, K. S. Hougaard, H. Wallin, U. Vogel, C. L. Yauk // *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.* – 2011. –№712. P.55–58.
418. Riu, J. Nanosensors in environmental analysis / J. Riu, A. Maroto, F. X. Rius // *Talanta.* – 2006. –№69 (2). P. 288–301.
419. Robbins, J. R. Pathogens and the placental fortress / J. R. Robbins, A. I. Bakardjiev // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2012. –№15. P. 36–43.
- Roberts, A.C. Forebrain connectivity of the prefrontal cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): an anterograde and retrograde tract-tracing study / A.C.Roberts, D.L.Tomic, C.H.Parkinson, T.A.Roeling, D.J.Cutter, T.W.Robbins, B. J.Everitt // *J. Comp. Neurol.* 2007.– Roberts A.C., Tomic D.L., Parkinson C.H., Roeling T.A., Cutter D.J., Robbins T.W., Everitt B J. Vol. 502, № 1. – P. 86-112.
420. Robertson, T. A. Are commercially available nanoparticles safe when applied to the skin? / T. A. Robertson, W. Y. Sanchez, M. S. Roberts // *J. Biomed Nanotechnol.* – 2010. –№6. – P. 452–468.
421. Roca –Cusachs, P. Rheology of Passive and Adhesion –Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy / P. Roca –Cusachs, I. Almendros, R. Sunyer // *Biophys J.* – 2006. –№ 9. – P. 3508–3518.
422. Rollerova, E. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development / E. Rollerova, J. Tulinska, A. Liskova, M. Kuricova, J. Kovriznych, A. Mlynarcikova, A. Kiss, S. Scsukova // *Endocr. Regul.* – 2015. –49 (2). – P. 97–112.
423. Rompelberg, C. Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population / C. Rompelberg, M. B. Heringa, G. van Donkersgoed, J. Drijvers, A. Roos, S. Westenbrink, R. Peters, G. van Bommel, W. Brand, A. G. Oomen // *Nanotoxicology.* – 2016. –№10 (10). P. 1404–1414.

424. Rothen –Rutishauser, B. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model / B. Rothen –Rutishauser, M. Christian, B. Fabian // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2007. – P. 9.
425. Roy, K. Oral gene delivery with chitosan –DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy / K. Roy, H. Q. Mao, S. K. Huang, K. W. Leong // *Nat. Med.* –1999. –№5. – P. 387–391.
426. Ruge, C.A. Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein / C. A. Ruge, J. Kirch, O. Cañadas, M. Schneider, J. Perez – GIL, U. F. Schaefer, C. Casals, C. M. Lehr // *A. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2011. –№7. – P. 690–693.
427. Ruifrok, A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution / A. Ruifrok, D. Johnston // *Anal. Quant. Cytol. Histol.* - 2001. - Vol. 23. - P. 291-299.
428. Ruth Magaye, J.Z. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt– , nickel– and copper–based nanoparticles / J. Z. Ruth Magaye, B. Linda, D. Min // *Exp. Ther. Med.* – 2012. –№4. – P. 551–561.
429. Ryan, J. J. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response / J. J. Ryan, H. R. Bateman, A. Stover, G. Gomez, S. K. Norton, W. Zhao, L .B. Schwartz, R. Lenk, C. L. Kepley // *J. Immunol.* – 2007. –№179. – P. 665–672.
430. Ryman –Rasmussen, Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma / J. P. Ryman –Rasmussen, E. W. Tewksbury, O. R. Moss, M. F. Cesta, B. A. Wong, J. C. Bonner // *Am. J. Respir Cell Mol Biol.* – 2008. –№40. P. 349 –358.
431. Saber, A. T. Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers / A. T. Saber, K. A. Jensen, N. R. Jacobsen, R. Birkedal, L. Mikkelsen, P. Moller, S. Loft, H. Wallin, U. Vogel // *Nanotoxicology*. – 2012. –№6. – P. 453–471.
432. Sadauskas, E. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism / E. Sadauskas, H. Wallin, M. Stoltenberg, U. Vogel, P. Doering, A. Larsen // *Part. Fibre Toxicol.* – 2007. –№4. – P. 10.
433. Sadrieh, N. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano – and submicron –size TiO₂ particles / N. Sadrieh, A. M. Wokovich, N. V. Gopee, J. Zheng, D. Haines, D. Parmiter, P. H. Siitonen, C. R. Cozart, A. K. Patri, S. E. McNeil // *Toxicol Sci.* – 2010. –№115. – P. 156–166.
434. Sagawa, Y. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically –induced skin carcinogenesis in rats and mice / Y. Sagawa, M. Futakuchi, J. Xu, K. Fukamachi, Y. Sakai, Y. Ikarashi, T. Nishimura, M. Suzui, H. Tsuda., A. Morita // *J. Toxicol Sci.* – 2012. –№37. – P. 317–327.
435. Sager, T. M. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area / T. M. Sager, C. Kommineni, V. Castranova // *Part Fibre Toxicol.* – 2008. – №5. – P. 17.
436. Sakai, T. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with poly(lactic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate / T. Sakai, H. Kohno, T. Ishihara, M. Higaki, S. Saito, M. Matsushima, Y. Mizushima, K. Kitahara // *Exp. Eye Res.* – 2006. –№82. – P. 657–663.

437. Sang, X. Z. Immunomodulatory effects in the spleen –injured mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles / X. Z. Sang, M Fei, L. Sheng, X. Y. Zhao, X. H. Yu, J. Hong, Y. G. Ze, S. X. Gui, Q. Q. Sun, X. Ze, L. Wang, F. Hong // *J. Biomed. Mater. Res., Part A.* – 2014. –№102A. – P. 3562–3572.

438. Sang, X. Z. The chronic spleen injury of mice following long –term exposure to titanium dioxide nanoparticles / X. Z. Sang, L. Zheng, Q. Sun, N. Li, Y. Cui, R. Hu, G. Gao, Z. Cheng, J. Cheng, S. Gui, H. Liu, Z. Zhang, F. Hong // *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* – 2012. –№100A. – P. 894–902.

439. Sayes, C. M. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles / C. M. Sayes, K. L. Reed, D. B. Warheit // *Toxicol Sci.* – 2007. –№97 (1). – P. 163 –180.

440. Sayes, C. M. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells / C. M. Sayes, R. Wahi, P. A. Kurian, Y. Liu, J. L. West, K. D. Ausman, D. B. Warheit, V. L. Colvin // *Toxicol Sci.* – 2006. –№92. – P. 174 –185.

441. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). Opinion on titanium dioxide (nano form), 22 July 2013, revision of 22 April 2014. 10.2772/70108. 2014.

442. Schanen, B. C. Self WT. Exposure to Titanium Dioxide Nanomaterials Provokes Inflammation of an in Vitro Human Immune Construct / B. C. Schanen, A. S. Karakoti, S. Seal, D. R. Drake III, W. L. Warren // *ACS Nano.* – 2009. –№3. – P. 2523–2532.

443. Schkroeder, H. A. Abnormal trace metals in man: titanium / H. A. Schkroeder, J. J. Balassa, I. H. Tipton // *J. Chronic Dis.* – 1963. – №16. – P. 55–69.

444. Schöll, I. Allergen –loaded biodegradable poly (D, L– lactic–co–glycolic) acid nanoparticles down –regulate an ongoing Th2 response in the BALB/c mouse model / I. Schöll, A. Weissenböck, E. Förster –Waldl, E. Untersmayr, F. Walter, M. Willheim, G. Boltz –Nitulescu, O. Scheiner, F. Gabor, E. Jensen –Jarolim // *Clin. Exp. Allergy.* – 2004. – №34. – P. 315–321.

445. Schulz, J. Distribution of sunscreens on skin / J. Schulz, H. Hohenberg, F. Pflucker, E. Gartner, T. Will, S. Pfeiffer, R. Wepf, V. Wendel, H. Gers –Barlag, K. P. Wittern // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2002. – №54 (Suppl 1). – P. 157 –163.

446. Selemon, L. D. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia / L. D. Selemon, P. S. Goldman –Rakic // *Biol. Psychiatry.* –1999. – №45. – P. 17 –25.

447. Semmler –Behnke, M. Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat / M. Semmler –Behnke, J. Lipka, A. Wenk, S. Hirn, M. Schäffler, F. Tian // *Part. Fibre Toxicol.* – 2014. – №11. – P. 33.

448. Semmler –Behnke, M. Uptake of 1.4 nm versus 18 nm gold nanoparticles in secondary target organs is size dependent in control and pregnant rats after intratracheal or intravenous application / M. Semmler –Behnke, S. Fertsch, G. Schmid, A. Wenk, W. G. Kreyling // *Proc. EuroNanoForum.* – 2007. – P. 19 –21.

449. Sengupta, J. Nanotechnol / J. Sengupta, P. Datta, H. K. Patra, A. K Dasgupta and A. Gomes // *J. Nanosci.* – 2013. – №13. – P. 1660 –1670.

450. Sha, B. Nano –titanium dioxide induced cardiac injury in rat under oxidative stress / B. Sha, W. Gao, S. Wang // *Food Chem. Toxicol.* – 2013. –№58. – P. 280–288.

451. Sha, B. Oxidative stress increased hepatotoxicity induced by nano –titanium dioxide in BRL –3A cells and Sprague –Dawley rats / B. Sha, W. Gao, S. Wang, X. Gou, W. Li, X. Liang, Z. Qu, F. Xu, T. Jian // *J. Appl. Toxicol.* – 2014. – №34 (4). P. 345 –356.
452. Shah, S. N. A. Hazardous Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Ecosystem / S. N. A. Shah, Z. Shah, M. Hussain, M. Khan // *Bioinorganic Chemistry and Applications.* – 2017. – P. 12.
453. Shen, C. C. A single exposure to iron oxide nanoparticles attenuates antigen –specific antibody production and T –cell reactivity in ovalbumin –sensitized BALB/c mice / C. C. Shen, C. C. Wang, M. H. Liao, T. R. Jan // *J. Nanomedicine.* – 2011. – №6. – P. 1229–1235.
454. Shen, C. C. Iron oxide nanoparticles suppressed T helper 1 cell –mediated immunity in a murine model of delayed –type hypersensitivity / C. C. Shen, H. J. Liang, C. C. Wang, M. H. Liao, T. R. Jan // *J. Nanomedicine.* – 2012. – №7. – P. 2729–2737.
455. Shen, Y. Amyloid fibril systems reduce, stabilize and deliver bioavailable nanosized iron / Y Shen, L. Posavec, S. Bolisetty, F. M. Hilty, G. Nystrom, J. Kohlbrecher, M. Hilbe, A. Rossi, J. Baumgartner, M. B. Zimmermann, R. Mezzenga // *Nat. Nanotechnol.* – 2017. – №12. – P. 642–647.
456. Sheng, L. Mechanisms of TiO₂ nanoparticle–induced neuronal apoptosis in rat primary cultured hippocampal neurons/ L. Sheng, Y. Ze, L. Wang, X. Yu, J. Hong, X. Zhao, X. Ze, D. Liu, B. Xu, Y. Zhu, Y. Long, A. Lin, C. Zhang, Y. Zhao, F. Hong // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2015 Mar. – Vol. 103, № 3.– P.1141–1149.
457. Sheng, L. Nano –sized titanium dioxide –induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology / L. Sheng, L. Wang, X. Sang, X. Zhao, J. Hong, S. Cheng // *J. Hazard Mater.* – 2014. – №278. – P. 180 –188.
458. Shi, H. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data / H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, J. Zhao // *Part. Fibre Toxicol.* – 2013. – №10. – P. 15.
459. Shibuya, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor –type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family // *Oncogene.* – 1990. – №5. – P. 519 –524.
460. Shimizu, M. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse / M. Shimizu, H. Tainaka, T. Oba, K. Mizuo, M. Umezawa, K. Takeda // *Part Fibre Toxicol.* – 2009. – №6. – P. 20.
461. Shrivastava, R. Effects of sub –acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological. changes in mouse liver and brain / R. Shrivastava, S. Raza, A. Yadav, P. Kushwaha, S. J. S. Flora // *Drug Chem. Toxicol.* – 2014. – №37. – P. 336–347.
462. Shukla, R. K. ROS –mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells / R. K. Shukla, V. Sharma, A. K. Pandey, S. Singh, S. Sultana, A. Dhawan // *Toxicol. In Vitro.* – 2011. – №25. – P. 231–241.
463. Shukla, R. K. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells / R. K. Shukla, A. Kumar, D. Gurbani, A. K. Pandey, S. Singh, A. Dhawan // *Nanotoxicology.* – 2013. – №7. – P. 48 –60.

464. Siddiqui, M. A. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells / M. A. Siddiqui, H. A. Alhadlaq, J. Ahmad, A. A. Al-Khedhairi, J. Musarrat, M. Ahamed // *PLoS One*. – 2013. – №8 (8). – e69534
465. Simko, M. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review / M. Simko, M. O. Mattsson // *Part Fibre Toxicol.* – 2010. – №7. – P. 42.
466. Šimundić, M. Effect of engineered TiO₂ and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles / M. Šimundić, B. Drašler, V. Šuštar // *BMC Veterinary Research*. – 2013. – №9. – P.7.
467. Singh, D. Ceramic nanocarriers: versatile nanosystem for protein and peptide delivery / D. Singh, P. Dubey, M. Pradhan, M. R. Singh // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2013. – Vol. 10, № 2. – P. 241–259.
468. Singh, D. Ceramic nanoparticles: recompense, cellular uptake and toxicity concerns / D. Singh, S. Singh, J. Sahu, S. Srivastava, M. R. Singh // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 44. – № 1. – P. 401–409.
469. Singh, M. Nanoparticles: A new technology with wide applications / M. Singh, S. Manikandan, A. K. Kumaraguru // *Res. J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2011. – №1.P.1–11.
470. Smirnov, A.V. Peculiarities of structural changes in the hippocampal pyramidal layer of rats during gravitational action in the caudo-cranial vector, taking into account the expression of GFAP / A. V. Smirnov, M. V. SHmidt, D. S. Menikov, M. R. Ekhova, I. N. Tyurenkov, D. V. Kurkin, E. V. Volotova // *J. anatomy and gistopatology*. – 2017. – №6 (2). – P. 75 –82.
471. Smith, M.A. Anatase titanium dioxide nanoparticles in mice: evidence for induced structural and functional sperm defects after short-, but not long-, term exposure/ M.A. Smith, R. Michael, R.G. Aravindan, et al. // *Asian J. Androl.* – 2014. – Vol. 17, № 2. – P. 261–268.
472. Snyder, R. W. Distribution and biomarker of carbon-14 labeled fullerene C₆₀ ([¹⁴C (U)] C₆₀) in pregnant and lactating rats and their offspring after maternal intravenous exposure / R. W. Snyder, T. R. Fennell, C. J. Wingard, N. P. Mortensen, N. A. Holland, J. H. Shannahan // *J. Appl. Toxicol.* – 2015. – №35. – P. 1438–1451.
473. Song, B. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles / B. Song, J. Liu, X. Feng, L. Wei, L. Shao // *Nanoscale Research Letters*. – 2015. – №10. – P. 342.
474. Song, B. Is Neurotoxicity of Metallic Nanoparticles the Cascades of Oxidative Stress? / B. Song, Y. Zhang, J. Liu, X. Feng, T. Zhou, L. Shao // *Nanoscale Res. Lett.* – 2016. – Vol. 11, № 1. – P. 291.
475. Song, B. Unraveling the neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: focusing on molecular mechanisms / B. Song, Y. Zhang, J. Liu, X. Feng, T. Zhou, L. Shao // *Beilstein J Nanotechnol.* – 2016. – №7. – P.645 –654.
476. Song, Y. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma / Y. Song, X. Li, X. Du // *J. Eur. Respir.* – 2009. – №34. – P. 559–567.

477. Spaggiari, D. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: an overview of current methodologies / D. Spaggiari, L. Geiser, Y. Daali, S. Rudaz // *J. Pharm Biomed Anal.* – 2014. – №101. – P. 221–237.

478. Sprong, C. Exposure assessment of the food additive titanium dioxide (E 171) based on use levels provided by the industry / C. Sprong, M. Bakker, M. Niekerk, M. Vennemann // *Bilthoven: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM).* – 2016. – P. 41–42.

479. Stinchcombe, T. E. Phase I and pharmacokinetic trial of carboplatin and albumin-bound paclitaxel, ABI-007 (Abraxane) on three treatment schedules in patients with solid tumors / T. E. Stinchcombe, M. A. Socinski, C. M. Walko, B. H. O'Neil, F. A. Collichio, A. Ivanova, H. Mu, M. J. Hawkins, R. M. Goldberg, C. Lindley, E. Claire Dees // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2007. – №60. – P. 759–766.

480. Su M., Sheng L., Zhao X., Wang L., Yu X., Hong J., Xu B., Liu D., Jiang H., Ze X // *Toxicol Res (Cambridge, U K).* – 2015. – №4. – P. 344–350.

481. Suker, D.K. Liver histopathological alteration after repeated intra-tracheal instillation of titanium dioxide in male rats / D. K. Suker, F. A. Jasim // *Gastroenterology and hepatology from bed to bench.* – 2018. – Vol. 11, № 2. – P. 159–168.

482. Sul, Y.T. Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced in vivo bone response of TiO₂ nanotubes on microstructured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants / Y.T. Sul // *Int J Nanomedicine.* – 2010. – №5. – P.87–100.

483. Sumner, S.C. Distribution of carbon-14 labeled C60 ([¹⁴C] C60) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C60 exposure on the biochemical profile of urine / S.C. Sumner, T.R. Fennell, R.W. Snyder, G.F. Taylor, A.H. Lewin // *J. Appl. Toxicol.* – 2010. – №30. – P. 354–360.

484. Sun, J. Recent Progress in Metal-Based Nanoparticles Mediated Photodynamic Therapy / J. Sun, S. Kormakov, Y. Liu, Y. Huang, D. Wu, Z. Yang // *Molecules.* – 2018. – Vol.23, №7. – P.1704.

485. Susan, A.E. Enhanced Histopathology of the Immune System: A Review and Update / A.E. Susan // *Toxicol Pathol.* – 2012. – Vol.40, №2. – P.148–156.

486. Syed, N.S. Hazardous Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Ecosystem / N.S. Syed, S. Zahir, H. Muzammal, K. Muzaffar // *Bioinorganic Chemistry and Applications.* – 2017. – 12 p.

487. Szacilowski, K. Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms / K. Szacilowski, W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell, G. Stochel // *Chem Rev.* – 2005. – №105. – P. 2647–2694.

488. Takahashi, Y. Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice / Y. Takahashi, K. Mizuo, Y. Shinkai, S. Oshio, K. Takeda // *J. Toxicol. Sci.* – 2010. – №35. – P.749–756.

489. Takeda, K. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems / K. Takeda, K.I. Suzuki, A. Ishihara, M. Kubo-Irie, R. Fujimoto, M. Tabata et al. // *J. Health Sci.* – 2009. – №55. – P.95–102.

490. Takenaka, S. Efficient internalization and intracellular translocation of inhaled gold nanoparticles in rat alveolar macrophages / S. Takenaka, W. Moller, M. Semmler-

- Behnke, E. Karg, A. Wenk, O. Schmid, T. Stoeger, L. Jennen, M. Aichler, A. Walch, S. Pokhrel, L. Madler, O. Eickelberg, W.G. Kreyling // *Nanomedicine (Lond)*. – 2012.
491. Talebi, A.R. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis / A.R. Talebi, L. Khorsandi, M. Moridian // *J Assist Reprod Genet*. – 2013. – Vol. 30, №9. – P.1203–1209.
492. Tan, M.H. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens / M.H. Tan, C.A. Commens, L. Burnett, P.J. Snitch // *Australas J Dermatol*. – 1996. – №37. – P.185–187.
493. Tang, J.L. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats / J.L. Tang, L. Xiong, S. Wang et al. // *J Nanosci Nanotechnol*. – 2009. – Vol. 8, № 8. – P. 4924–4932.
494. Tassinari, R. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague–Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen / R. Tassinari, F. Cubadda, G. Moracci, F. Aureli, M. D'Amato, M. Valeri, B. De Berardis, A. Raggi, A. Mantovani, D. Passeri et al. // *Nanotoxicology*. – 2014. – №8. – P.654–662.
495. Tedja, R. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines/ R. Tedja, M. Lim, R. Amal, C. Marquis // *ACS Nano*. – 2012. – №6. – P.4083–4093.
496. Teubl, B.J. The buccal mucosa as a route for TiO₂ nanoparticle uptake / B.J. Teubl, G. Leitinger, M. Schneider, C.M. Lehr, E. Fröhlich, A. Zimmer, E. Roblegg // *Nanotoxicology*. – 2015. – Vol. 9, №2. – P.253–261.
497. Thiesen, B. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia / B. Thiesen, A. Jordan // *Int. J. Hyperther*. – 2008. – №24. – P.467–474.
498. Tishkina, A.O. Change in the expression of astroglia and microglia markers in the rat hippocampus when adapting to chronic stress / A.O. Tishkina, M.R. Novikova, M.Yu. Stepanichev, I.P. Levshina, N.V. Pasikova, N.A. Lazareva, A.G. Mojseenok, N.V. Gulyaeva // *Effects of panthenol.Nejrohimiya*. – 2013. – Vol. 30, №2. – P.158–167.
499. Tobe, E.H. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and major depressive disorder / E.H. Tobe // *Neuropsychiatr Dis Treat*. – 2013. – №9. – P.567–573.
500. Tochilkina, L.P. Eksperimentalnoe issledovanie embriotoksichnosti nanochastic dioksida titana / L.P. Tochilkina, L.Yu. Bocharova, M.S. Sroslov, B.N. Filatov, N.V. Hodikina // *Medicina ekstremalnih situacii*. – 2014. – Vol. 4, №50. – P.48–58.
501. Tong, V.T. Trends in smoking before, during, and after pregnancy / V.T. Tong, P.M. Dietz, B. Morrow, D.V. D'Angelo, S.L. Farr, K.M. Rockhill et al. // *Pregnancy Risk Assessment Monitoring System, United States, 40 sites, 2000– 2010. MMWR Surveill. Summ*. – 2013ю – Vol. 62. – P. 1–19.
- Tranel, D. Does gender play a role in functional asymmetry of ventromedial prefrontal cortex? / D.Tranel [et al.] // *Brain*. – 2005. – V. 128, Pt. 12. – P. 2872–2881
502. Trouiller, B. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice / B. Trouiller, R. Reliene, A. Westbrook, P. Solaimani, R.H. Schiestl // *Cancer Res*. – 2009. – №69. – P.8784–8789.
503. Tsai, C.Y. Size-Dependent Attenuation of TLR9 Signaling by Gold Nanoparticles in Macrophages / C.Y. Tsai, S.L. Lu, C.W. Hu, C.S. Yeh, G.B. Lee, H.Y. Lei // *The Journal of Immunology*. – 2012. – №188. – P.68–76.

504. Tsai, M.C. Polyhydroxylated C60, fullerenol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro / M.C. Tsai, Y.H. Chen, L.Y. Chiang // *J Pharm Pharmacol.* –1997. – Vol.49, №4. – P.438–445.
505. Tsuchiya, T. Novel harmful effects of [60] fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo / T. Tsuchiya, I. Oguri, Y.N. Yamakoshi, N. Miyata // *FEBS Lett.* –1996. – №393. – P.139–145.
506. Tsukue, N. Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young / N. Tsukue, H. Tsubone, A. K. Suzuki // *Inhal. Toxicol.* – 2002. – №14. – P.635–651.
507. Uhlhaas, P. J. The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia / P. J. Uhlhaas, C. Haenschel, D. Nikolić, W. Singer // *Schizophrenia Bulletin.* – 2008. —Vol. 34, № 5. – P. 927–943.
508. Vaillant, A.J., Qurie, A. Immunodeficiency. Creighton University School ofmedicine. – 2018.
509. Van Loveren, H. Testing immunotoxicity of chemicals as a guide for testing approaches for pharmaceuticals / H. van Loveren, J.G. Vos, E.J. De Waal // *Drug Info J.* – 1996. – №30. – P.275–279.
510. Vance, M.E. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory / M.E. Vance, T. Kuiken, E.P. Vejerano, S.P. McGinnis, M.F. Hochella, Rejeski D. // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2015. – Vol.6. – P.1769–1780.
511. Vardharajula, S. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications / S. Vardharajula, S.Z. Ali, P.M. Tiwari et al. // *International Journal of Nanomedicine.* – 2012. – №7. – P.5361–5374.
512. Vasili, A. The effect of aerobic exercise on hepatotoxicity induced by intratracheal instillation of iron oxide nanoparticles in Wistar rats / A. Vasili, G. Sharifi, M. Faramarzi, A. Noori, S. Yazdanshenas // *New York Science Journal.* – 2015. – №8. – P.98.
513. Vivero-Escoto, J. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery / J. Vivero-Escoto, I. Slowing, B. Trewyn, V. Lin // *Small.* – 2010. – Vol.6, №18. – P.1952–1967.
514. Von Bohlen und Halbach, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus / O. von Bohlen und Halbach // *Cell Tissue Res.* – 2007. – Vol.329, №3. – P.409–420.
515. Von Moos, L.M. Iron phosphate nanoparticles for food fortification: biological effects in rats and human cell lines / L.M. von Moos, M. Schneider, F.M. Hilty, M. Hilbe, M. Arnold, N. Ziegler, D.S. Mato, H. Winkler, M. Tarik, C. Ludwig et al. // *Nanotoxicology.* – 2017. – №11. – P.496–506.
516. Wang, C. Interaction and nanotoxic effect of TiO(2) nanoparticle on fibrinogen by multi-spectroscopic method / C. Wang, Y. Li // *Sci Total Environ.* – 2012. – №429. – P.156–160.
517. Wang, J. Biological effect of intranasally instilled titanium dioxide nanoparticles on female mice / J. Wang, Y. Li, W. Li, C. Chen, B. Li, Y. Zhao // *Nano.* – 2008. – Vol.3, №4. – P.279–285.

518. Wang, J. P38–Nrf–2 signaling pathway of oxidative stress in mice caused by nanoparticulate TiO₂ / J. Wang, N. Li, L. Zheng, S.S. Wang, Y. Wang, X.Y. Zhao, Y.M. Duan, Y.L. Cui, M. Zhou, J.W. Cai, S. J. Gong, H. Wang, F.S. Hong // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2011. – Vol.140, №2. – P.186–197.
519. Wang, J. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases / J. Wang, C. Chen, Y. Liu, F. Jia, W. Li, F. Lao, Y. Lia, B. Lia, C. Ge, G. Zhou // *Toxicol Lett.* – 2008. – №183. – P.72–80.
520. Wang, J. Time–dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles / J. Wang, Y. Liu, F. Jiao, F. Lao, W. Li, Y. Gu, Y. Li, C. Ge, G. Zhou, B. Li // *Toxicology.* – 2008. – № 254. – P.82–90.
521. Wang, J. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO₂ nanoparticles / J. Wang, X. Zhu, X. Zhang, Z. Zhao, H. Liu, R. George et al. // *Chemosphere.* – 2011. – № 83. – P.461–467.
522. Wang, J.J. Cyto– and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells / J.J. Wang, B.J. Sanderson, H. Wang // *Mutat Res.* – 2007. – № 628. – P.99–106.
523. Wang, J.X. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration / J.X. Wang, G.Q. Zhou, C.Y. Chen et al // *Toxicol Lett.* – 2007. – Vol.168, №2. – P.176–185.
524. Wang, W.Y. Vascular endothelial growth factor and its receptor Flk–1 are expressed in the hippocampus following entorhinal deafferentation / W.Y. Wang, J.H. Dong, X. Liu, Y. Wang, G.X. Ying, Z.M. Ni, C.F. Zhou // *Neuroscience.* – 2005. – Vol.134, №4. – P.1167–1178.
525. Wang, X. Immunotoxicological impact of engineered nanomaterial exposure: mechanisms of immune cell modulation / X. Wang, S.P. Reece, J.M. Brown // *Toxicology mechanisms and methods.* – 2013. – Vol. 23, №3. – P.168–177.
526. Wang, Y. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications / Y. Wang, Q. Zhao, N. Han et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* – 2015. – Vol.11, №2. – P.313–327.
527. Wang, Y. Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles / Y. Wang, Z. Chen, T. Ba, J. Pu, T. Chen, Y. Song, Y. Gu, Q. Qian, Y. Xu, K. Xiang et al. // *Small.* – 2013. – №9. – P.1742–1752.
528. Warheit Brohi, R.D. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review / R.D. Brohi, L. Wang, H.S. Talpur et al. // *Frontiers in Pharmacology.* – 2017. – №8. – P.606.
529. Warheit, D.B. Developmental toxicity studies with 6 forms of titanium dioxide test materials (3 pigment–different grade & 3 nanoscale) demonstrate an absence of effects in orally–exposed rats / D.B. Warheit, R. Boatman, S.C. Brown // *Regul Toxicol Pharmacol.* – 2015. – №73. – P.887–896.
530. Warheit, D.B. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine–TiO₂ particles: differential responses related to surface properties / D.B. Warheit, T.R. Webb, K.L. Reed, S. Frerichs, C.M. Sayes // *Toxicology.* – 2007. – №230. – P.90–104.

531. Watanabe, N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses / N. Watanabe // *Toxicol. Lett.* – 2005. – №155. – P.51–58.
532. Wegmann, K.W. Synthetic peptide dendrimers block the development and expression of experimental allergic encephalomyelitis / K.W. Wegmann, C.R. Wagner, R.H. Whitham, D.J. Hinrichs // *J Immunol.* – 2008. – №181. – P.3301–3309.
533. Weir, A. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products / A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, N. von Goetz // *Environ Sci Technol.* – 2012. – №46. – P.2242–2250.
534. Whidbey, C.A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allows bacterial penetration of human placenta / C. Whidbey, M. I. Harrell, K. Burnside, L. Ngo, A. K. Becraft, L.M. Iyer et al. // *J. Exp. Med.* – 2013. – №210. – P.1265–1281.
535. Wick, P. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials / P. Wick, A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder–Althaus, L. Diener et al. // *Environ. Health Perspect.* – 2010. – №118. – P.432–436.
536. Wiedmeier, S.E. Effect of ionizing radiation on thymic epithelial cell function. I. Radiation–spared thymic epithelial grafts expedite the recovery of T–cell function in lethally irradiated and fetal liver reconstituted mice / S.E. Wiedmeier, W.E. Samlowski, C.J. Rasmussen, K. Huang, R.A. Daynes // *J Immunol.* – 1988. – №140. – P.21–29.
537. Wiesenthal, A. Nanoparticles: small and mighty / A. Wiesenthal, L. Hunter, S. Wang, J. Wickliffe, M. Wilkerson // *Int. J. Dermatol.* – 2011. – № 50. – P.247–254.
538. Wiley, D.T. Transcytosis and brain uptake of transferrin–containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor / D.T. Wiley, P. Webster, A. Gale, M.E. Davis // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol.110, № 21. – P.8662–8667.
539. Winkler, H.C. Critical review of the safety assessment of titanium dioxide additives in food / H.C. Winkler, T. Notter, U. Meyer, H. Naegeli // *J Nanobiotechnology.* – 2018. – № 16. – P. 51.
540. Win–Shwe, T.T. Nanoparticles and neurotoxicity / T.T. Win–Shwe, H. Fujimaki // *Int J Mol Sci.* – 2011. – Vol.12, №9. – P.6267–6280.
541. Winter, M. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells / M. Winter, H.D. Beer, V. Hornung, U. Krämer, R.P. Schins, I. Förster // *Nanotoxicology.* – 2011. – №5. – P.326–340.
542. Witzmann, F.A. Multi–walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes / F.A. Witzmann, N.A. Monteiro–Riviere // *Nanomedicine.* – 2006. – №2. – P.158–168.
543. Wiwanitkit, V. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report / V. Wiwanitkit, A. Sereemasun, R. Rojanathanes // *Fertil. Steril.* – 2009. – № 91. – P.7–8.
544. Wolf, R. Sunscreens– the ultimate cosmetic / R. Wolf, H. Matz, E. Orion, J. Lipozencic // *Acta Dermatovenerol Croat.* – 2003. – №11. – P.158–162.
545. Wu, J. Neurotoxic potential of iron oxide nanoparticles in the rat brain striatum and hippocampus / J. Wu, T.T. Ding, J. Sun // *Neurotoxicology.* – 2013. – № 34. – P.243–253.

546. Xie, J. A polyethylenimine–linoleic acid conjugate for antisense oligonucleotide delivery / J. Xie, L. Teng, Z. Yang, C. Zhou, Y. Liu, B.C. Yung, R.J. Lee // *BioMed Res.* – 2013. – Vol. 2013.
547. Xing, Y. Semiconductor quantum dots for biosensing and in vivo imaging / Y. Xing, Z. Xia, J. Rao // *IEEE Transactions on Nanobioscience.* – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 4–12.
548. Xu, Y. Cell–based cytotoxicity assays for engineered nanomaterials safety screening: exposure of adipose derived stromal cells to titanium dioxide nanoparticles/ Y. Xu, M. Hadjiargyrou, M. Rafailovich, T. Mironava // *J. Nanobiotechnology.* – 2017. – Vol. 15, № 1. – P. 50.
549. Xu, C. Nanoceria–triggered synergetic drug release based on CeO₂–capped mesoporous silica host–guest interactions and switchable enzymatic activity and cellular effects of CeO₂ / C. Xu, Y. Lin, J. Wang et al. // *Advanced Healthcare Materials.* – 2013. – Vol.2, №12. – P.1591–1599.
550. Xu, J. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B–initiated skin carcinogenesis in rats / J. Xu, Y. Sagawa, M. Futakuchi, K. Fukamachi, D.B. Alexander, F. Furukawa, Y. Ikarashi, T. Uchino, T. Nishimura, A. Morita // *Food Chem Toxicol.* – 2011. – №49. – P.1298–1302.
551. Xu, Y. Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice / Y. Xu, N. Wang, Y. Yu, Y. Li, Y–B. Li, Y–B. Yu et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 7.
552. Xue, C. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation /C. Xue, J. Wu, F. Lan, W. Liu, X. Yang, F. Zeng, H.Xu // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2010. – №10. –P.8500–8507.
553. Xue, Z. Silica nanoparticle is a possible safe carrier for gene therapy /Z.Xue, D.Liang, Y.Li, Z.Long, Q.Pan, X.Liu et al.// *Chin. Sci. Bull.* – 2005. – № 50. – P. 2323–2327.
554. Yamashita, K. Attenuation of delayed–type hypersensitivity by fullerene treatment /K. Yamashita, M. Sakai, N. Takemoto, M. Tsukimoto, K. Uchida, H.Yajima et al. // *Toxicology.* – 2009. – № 261. – P.19–24.
555. Yamashita, K. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice /K.Yamashita, Y.Yoshioka, K.Higashisaka, K.Mimura, Y.Morishita, M.Nozaki et al. // *Nat. Nanotechnol.* – 2011. – №6. – P.321–328.
556. Yang, F. Pilot study of targeting magnetic carbon nanotubesto lymphnodes / F.Yang, J.Hu, D.Yang, J.Long, G.Luo, C.Jin, X.Yu, J.Xu, C.Wang, Q.Ni, D.Fu // *Nanomed.* – 2009. – № 4. – P. 317–330.
557. Yang, H. Effects of gestational age and surface modification on materno–fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy /H.Yang, C.Sun, Z.Fan, X.Tian, L.Yan, L.Du et al.// *Sci. Rep.* – 2012. – №2. – P. 847.
558. Yang, L. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice / L. Yang, H. Kuang, W. Zhang, Z.P. Aguilar, Y. Xiong, W. Lai et al. // *Nanoscale.* – 2015. – №7. – P. 625–636.

559. Yang, M. Macrophages participate in local and systemic inflammation induced by amorphous silica nanoparticles through intratracheal instillation / M. Yang, L. Jing, J. Wang et al. // *Int J Nanomedicine*. – 2016. – №11. – P. 6217–6228.
560. Yang, S.Z. Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains / S.Z. Yang et al. // *Anat Rec*. – 2003. – №274. – P.851–856.
561. Yang, X. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-induced hepatotoxicity / X. Yang, H. Shao, W. Liu et al. // *Toxicol Lett*. – 2015. – №234(1). – P.40–49.
562. Yang, Y. Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles / Y. Yang, K. Doudrick, X.Y. Bi, K. Hristovski, P. Herckes, P. Westerhoff, R. Kaegi // *Environ Sci Technol*. – 2014. – №48. – P.6391–6400.
563. Yazdi, A.S. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β / A.S. Yazdi, G. Guarda, N. Riteau, S.K. Drexler, A. Tardivel, I. Couillin, J. Tschopp // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – №107. – P.19449–19454.
564. Yeh, T.K. Kinetics and tissue distribution of neutron-activated zinc oxide nanoparticles and zinc nitrate in mice: effects of size and particulate nature / T.K. Yeh, J.K. Chen, C.H. Lin, M.H. Yang, C.S. Yang, F.I. Chou et al. // *Nanotechnology*. – 2012. – Vol.23, №8.
565. Yilma, A.N. Anti-inflammatory effects of silver- Polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis* / A.N. Yilma, S.R. Singh, S. Dixit, V.A. Dennis // *Int. J. Nanomed*. – 2013. – №8. – P.2421–2432.
566. Yin, J., Kang C., Li Y., Li Q., Zhang X., Li W., Yin J., Kang C., Li Y., Li Q., Zhang X., Li W. // *Toxicol Res (Cambridge, UK)*. – 2014. – №3. – P. 367–374.
567. Yoshida, S. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice / S. Yoshida, K. Hiyoshi, T. Ichinose, H. Takano, S. Oshio, I. Sugawara et al. // *Int. J. Androl*. – 2009. – №32. – P.337–342.
568. Younes, N.R. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination / N.R. Younes, S. Amara, I. Mrad, I. Ben-Slama, M. Jeljeli, K. Omri, J. El Ghouli, L. El Mir, K.B. Rhouma, H. Abdelmelek, M. Sakly // *Environ Sci Pollut Res Int*. – 2015. – Vol.22, №11. – P.8728–8737.
569. Yu, K.N. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation / K.N. Yu, T.J. Yoon, A. Minai-Tehrani // *Toxicol. In Vitro*. – 2013. – Vol. 27, №4. – P.1187–1195.
570. Yu, X. Targeted drug delivery in pancreatic cancer / X. Yu, Y. Zhang, C. Chen, Q. Yao, M. Li // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – №1805. – P. 97–104.
571. Yu, Y. Silica nanoparticles induce liver fibrosis via TGF- β 1/Smad3 pathway in ICR mice / Y. Yu, J. Duan, Y. Li et al. // *Int. J. Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – P. 6045–6057.
572. Yuan, Y. TiO₂ nanoparticles co-doped with silver and nitrogen for antibacterial application / Y. Yuan, J. Ding, J. Xu, J. Deng, J. Guo // *J Nanosci Nanotechnol*. – 2010. – №10. – P. 4868–4874.

573. Zain, N.M. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications / N.M. Zain, A.G. Stapley, G. Shama // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – №112. – P.195– 202.

574. Ze, Y./ Ze, Y. Sheng L, Zhao X, Hong J, Ze X, Yu X, Pan X, Lin A, Zhao Y, Zhang C, et al.// *PLoS One.* – 2014.–№9.

575. Zhang, D.D. Time course of quartz and TiO₂ particle-induced pulmonary inflammation and neutrophil apoptotic responses in rats / D.D. Zhang, M.A. Hartsky, D.B. Warheit // *Exp Lung Res.* – 2002. – №28. – P. 641–670.

576. Zhang, L. Gestational exposure to titanium dioxide nanoparticles impairs the placentation through dysregulation of vascularization, proliferation and apoptosis in mice /L. Zhang, X. Xie, Y. Zhou et al. // *International Journal of Nanomedicine.* – 2018. –№13. – P. 777–789.

577. Zhang, L. The dose-dependent toxicological effects and potential perturbation on the neurotransmitter secretion in brain following intranasal instillation of copper nanoparticles / L. Zhang, R. Bai, Y. Liu, L. Meng, B. Li, L. Wang, L. Xu, L. Le Guyader, C. Chen // *Nanotoxicology.* – 2012. – № 6(5). – P. 562–575.

578. Zhang, W. Zinc oxide nanoparticle caused plasma metabolomic perturbations correlate with hepatic steatosis / W. Zhang, Y. Zhao, F. Li et al. // *Front Pharmacol.* – 2018. – №9. – Article 57.

579. Zhang, Z. Identification of a glutathione S-transferase gene of *Physarum polycephalum* as a biomarker for nanosized TiO₂ exposure under dark conditions / Z. Zhang, X. Liang, T. Zhang, Q. Xia, J. Zhang, J. Qu, J. Tang and S. Liu // *Lett Appl Microbiol.* – 2018. – Vol. 67, № 4. – P. 370–376.

580. Zhang, Z.Y. Biodegradable ZnO@polymer core-shell nanocarriers: pH-triggered release of doxorubicin in vitro /Z.Y. Zhang, Y.D. Xu, Y.Y. Ma et al. // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2013. – №52. – P.4127–4131.

581. Zhao, J. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways /J. Zhao, L. Bowman, X. Zhang, V. Vallyathan, Sh. Young, V. Castranova, M. Ding // *J. Toxicol Environ Health A.* – 2009. – №72. – P.1141–1149.

582. Zhao, J. Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine / J. Zhao, V. Castranova // *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* – 2011. – №14. – P.593–632.

583. Zhao, X. Nanosized TiO₂-Induced Reproductive System Dysfunction and Its Mechanism in Female Mice/ X. Zhao, Y. Ze, G. Gao et al.// Forloni G, ed. *PLoS ONE.* – 2013, Vol. 8, № 4. – P. 59378.

584. Zheng, Y. Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia / Y. Zheng, J. Wen, J. Nguyen et al. // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 7613.