

Шарафутдинова Люция Ахтямовна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Казань – 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» Министерства науки и образования Российской Федерации

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Валиуллин Виктор Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»

Гмошинский Иван Всеволодович

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией ультраструктурных исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» - филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Бгатова Наталия Петровна

профессор кафедры "Нанотехнология и биотехнология", ФГБОУ ВО "Нижегородский государственный технический университет имени Р. Е. Алексеева" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Плескова Светлана Николаевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (634050, Сибирский федеральный округ, Томская область, Томск, Московский тракт, д. 2).

Защита диссертации состоится «__» _____ 20 г. в ____ на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://morfolhum.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 20 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор медицинских наук

Л.П. Михайлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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., 2019; Winkler H.C., 2018). Следует подчеркнуть, что несмотря на то, что экологи и токсикологи рассматривают НЧ как новые потенциально опасные для биологических структур материалы (Jovanović B., 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. B. 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 (Хуе 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 (Ху 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 провоспалительных 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 клинико-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 TiO_2 .

5. Оценить морфометрические показатели нейронов зон CA1, CA3, зубчатой извилины гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса головного мозга при интраназальном введении НЧ TiO_2 , охарактеризовать морфологические и ультраструктурные изменения нейронов, реактивные изменения астроцитов на основании иммуногистохимического выявления антител к глиальному кислому 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 TiO_2 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 TiO_2 .

8. Определить эмбриотоксические эффекты НЧ TiO_2 при пероральном введении крысам в течение всего срока беременности путем оценки уровня предимплантационной и постимплантационной смертности.

9. Исследовать отдаленные эффекты антенатального воздействия НЧ TiO_2 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 TiO_2 рутинной модификации.

При пероральном введении НЧ TiO_2 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 TiO_2 вызывала изменения механических свойств поверхности нейтрофилов, что косвенно свидетельствует об уменьшении скорости их миграции, задержке и агрегации в микроциркуляторном русле.

При интраназальном введении НЧ TiO_2 были выявлены дегенеративные изменения нейронов, активация астроцитов и процессов ангиогенеза. Обнаружены

существенные изменения биоэлектрической активности нейронов префронтальной области коры головного мозга крыс, а также повышение тревожности и уровня ориентировочно-исследовательской активности животных.

На фоне перорального введения НЧ TiO_2 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 TiO_2 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 TiO_2 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-kit⁺ стволовых клеток и снижением их пролиферативной активности.

5. Эндогенное поступление НЧ TiO₂ 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 зарубежных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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. 1). 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 TiO₂ рутильной модификации производства ЗАО «Промхимпермь», г. Пермь (рутильная форма, массовая доля TiO₂ не менее 99,9%). Суспензию TiO₂ получали разведением нанопорошка TiO₂ в дистиллированной воде. Агрегацию НЧ предотвращали обработкой суспензии НЧ TiO₂ в ультразвуковой ванне. Распределение НЧ TiO₂ 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 TiO₂ составил 40-60 нм.

Поскольку изучение эффектов воздействия НЧ на различных моделях имеет достаточно долгую историю, то мы сочли возможным использовать разработанную другими исследователями и часто используемую (Гмошинский И. В. и др., 2019; Bettini S. et al., 2017) схему введения НЧ (доза, сроки) для критической оценки

полученных результатов при сравнении с данными современной литературы (табл. 1). 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 1

**Способы, сроки, дозы введения НЧ TiO_2 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 <i>in vitro</i> с помощью атомно-силовой микроскопии	<i>in vitro</i> , 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). Морфометрические исследования органов осуществляли на светоптическом уровне. В ткани тимуса определяли относительную площадь (%), занимаемую корковым и мозговым веществом, абсолютное число клеток на площади 100 мкм². В белой пульпе селезенки определяли долю первичных и вторичных лимфоидных узелков, абсолютное число клеток на единицу площади (100 мкм²), относительную площадь отдельных структурно-функциональных зон. В поверхностных шейных лимфатических узлах определяли долю первичных и вторичных лимфоидных узелков, их площади, абсолютное число клеток на 100 мкм². В семенниках оценивали толщину сперматогенного эпителия (мкм), диаметр поперечного

сечения извитых семенных канальцев (мкм) и площадь ядер клеток Лейдига (мкм²). В гиппокампе и центральном ядре МК подсчитывали плотность на 0,001мм³ вещества мозговой ткани, средние площади (мкм²) ядра и перикариона нейронов (по: Автандилов Г. Г., 1990; Боголепова И.Н., 1977).

Электронная микроскопия. Кусочки тканей выделяли под контролем микроскопа МБС-10 (ЛОМО, СПб., Россия), фиксировали в растворе 2,5%-ного глютарового альдегида на фосфатном буфере Миллоница (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. 2). 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 2

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 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,

$\rho=1,117 \text{ г/см}^3$). 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 TiO_2 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 TiO_2 (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 $10 \div 12$ клеток каждого образца крови проводили в полуконтактном режиме на воздухе, используя кремниевые зонды PPP-CONTPt (Nanosensors) с жесткостью 43 Н/м и резонансной частотой 185 кГц. Для визуализации сканируемых объектов использовали программу PicoView 1.20. Из полученных топографий поверхности нейтрофилов были сформированы их трехмерные изображения, на которых четко выявляются контуры ядра и цитоплазмы. 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.

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-CONTPt (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 TiO_2 .

Исследование биоэлектрической активности мозга (ЭЭГ). Регистрация ЭЭГ животных осуществлялась с использованием 8-канального электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-1В» для ветеринарии («Нейрософт», Иваново). Частота дискретизации составила 250 Гц. ЭЭГ регистрировали с помощью подкожных игольчатых электродов 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, на основе которого 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). Для изучения эмоциональной реактивности животного (склонности к тревоге, страху, депрессии) использовали тест «черно-белая камера» (НПК «Open Science», Россия).

Исследование эмбриотоксического и тератогенного действия НЧ TiO_2 проведено в соответствии с МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». В первой серии опытов изучена эмбриональная токсичность НЧ TiO_2 , регистрируемая в антенатальном периоде развития. Крысам опытной группы в течение всего срока беременности ежедневно перорально вводили НЧ TiO_2 , самкам контрольной группы – дистиллированную воду (1,5 мл). Животных выводили из эксперимента на 20-й день беременности. Критериями оценки эмбриотоксического и тератогенного действия НЧ TiO_2 служили такие показатели, как пред-, постимплантационная и общая эмбриональная смертность эмбрионов. 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. У эмбрионов, извлеченных из матки беременных крыс, определяли вес (г) и кранио-каудальный размер (см). Во второй серии опытов изучали отдаленные эффекты перорального введения НЧ TiO_2 в аналогичной дозе беременным самкам контрольной и опытной групп на развитие потомства ($n=171$) 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, количество живых и мертворожденных, дни отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова,

прорезывания резцов, открытия глаз, масса тела крысят (г) на 4-й, 7-й, 14-й и 21-й дни, гибель самок в период вскармливания.

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. 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лимфоидные органы крысы в условиях перорального введения наночастиц диоксида титана

Морфологическая характеристика тимуса. При морфологическом исследовании в тимусе крыс контрольной группы соотношение коркового и мозгового вещества составляло 1:1. Корковое вещество было представлено плотно расположенными лимфоцитами и эпителиальными клетками. Границы между корковым и мозговым веществом были четкими. Субкапсулярная зона тимуса представлена 4-8 рядами лимфобластов. Среди лимфобластов субкапсулярной зоны 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. В мозговом веществе тимуса преобладали эпителиальные клетки, выявлялись многочисленные тимические тельца из 3-7 и более эпителиальных клеток.

Морфометрический анализ тимуса опытной группы выявил уменьшение площади коркового вещества, при этом в этой зоне тимуса отмечалось значительное уменьшение абсолютного числа лимфоцитов на единицу площади (рис. 3). Указанные изменения обусловлены снижением их пролиферативного потенциала, что подтверждено результатами иммуногистохимического исследования, которое показало уменьшение количества Ki-67⁺ клеток в корковом веществе долек тимуса. Одновременно с этим в этой зоне у животных опытной группы значительно увеличивалось количество клеток, экспрессирующих маркер апоптоза — p53, тогда как в мозговом веществе уровень экспрессии белка p53 не изменялся. В тимусе животных опытной группы при иммуногистохимическом окрашивании макрофагов определялось увеличение среднего числа CD68⁺ клеток в корковом веществе в 2,6 раза (рис. 1, д, е), а в мозговом – в 1,4 раза, что, возможно, связано с увеличением количества мигрирующих моноцитов в тимус.

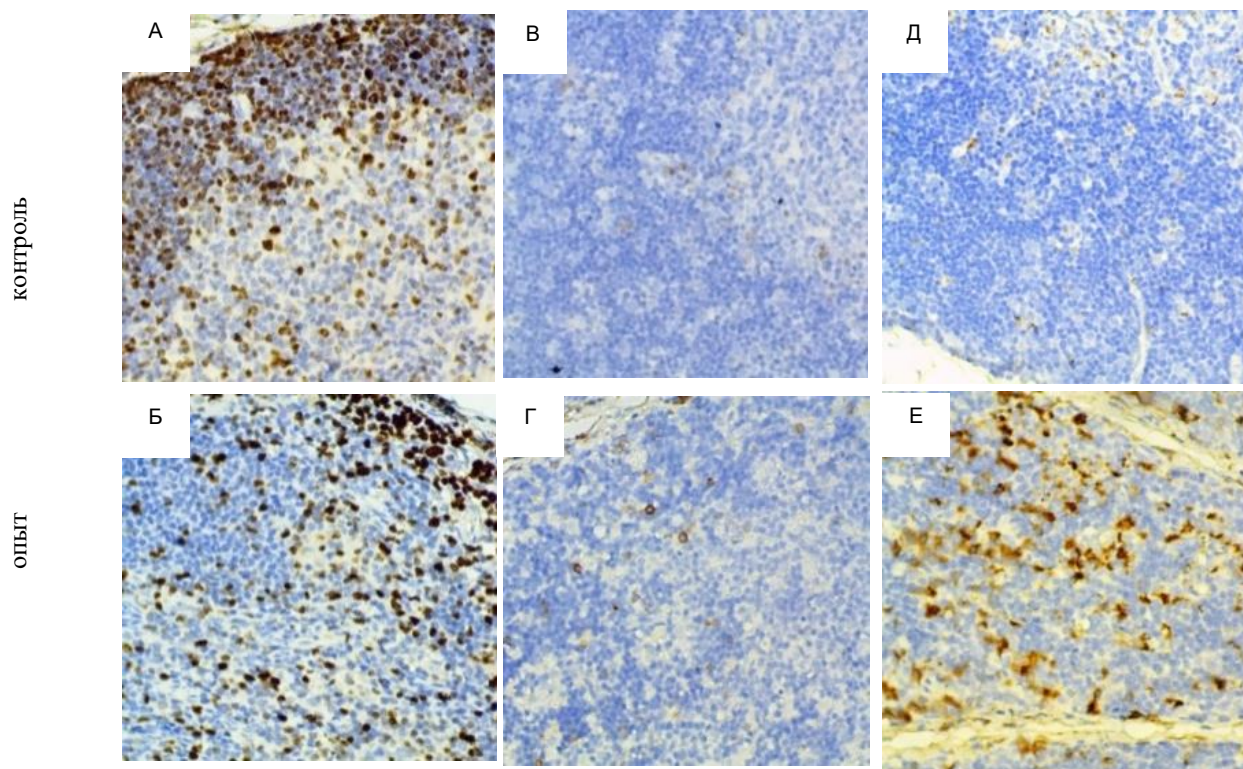


Рис. 1. Тимус крысы контрольной и опытной групп животных. а, б — иммуногистохимическое окрашивание антителами к Ki-67; в, г — к p53; д, е — к CD68. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.х400

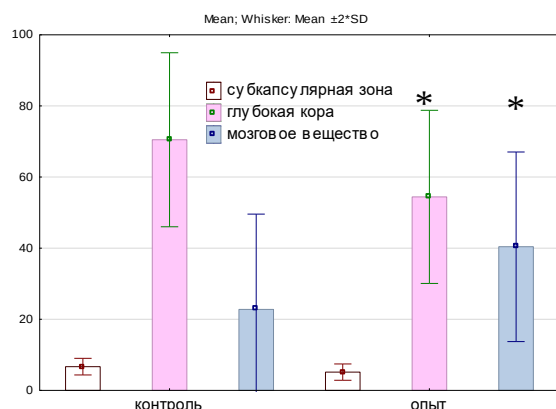


Рис. 2. Относительная площадь морфофункциональных зон тимуса животных контрольной и опытной групп

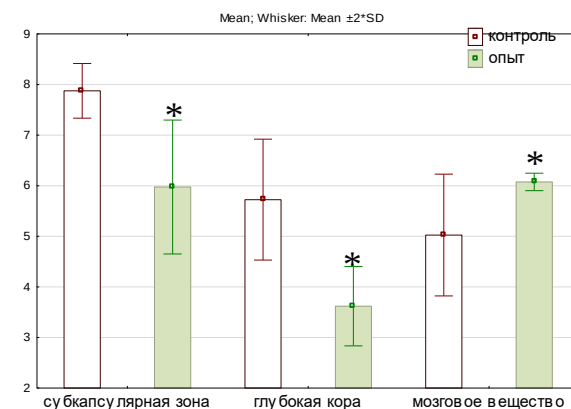


Рис. 3. Абсолютное число клеток (на 100 мкм²) в морфофункциональных зонах тимуса животных контрольной и опытной групп

Примечание: * - здесь и далее на рисунках статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таким образом, при пероральном введении 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. 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 , результаты которого описаны ниже. 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).

Морфологическая характеристика селезенки. При морфологическом анализе селезенка крыс контрольной группы имела нормальное строение. Белая пульпа представлена В- и Т-зависимыми компартментами и включала слабовыраженную ПАЛМ-зону и лимфоидные узелки с узкими герминативными центрами. 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 функциональных зон селезенки крыс опытной группы показал увеличение относительной площади белой пульпы, общего количества лимфоидных узелков с возрастанием доли первичных по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы животных (рис. 4). Вторичные лимфоидные узелки характеризовались опустошением герминативных центров и увеличением их относительной площади. Площадь ПАЛМ в селезенке опытной группы животных по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе увеличивалась на 16,44%, однако в них уменьшилась плотность расположения клеток на единицу площади (рис. 5), 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.

Проведенное нами иммуногистохимическое исследование активности пролиферативных процессов (рис. 6, а - г) показало снижение как Ki-67, так и PCNA⁺ клеток во всех структурно-функциональных зонах белой пульпы селезенки после воздействия НЧ TiO_2 с одновременным увеличением содержания клеток, в которых выявлялся маркер апоптоза p53. При иммуногистохимическом определении CD68⁺ макрофагов было обнаружено увеличение их числа в красной пульпе селезенки крыс опытной группы (рис. 7, б).

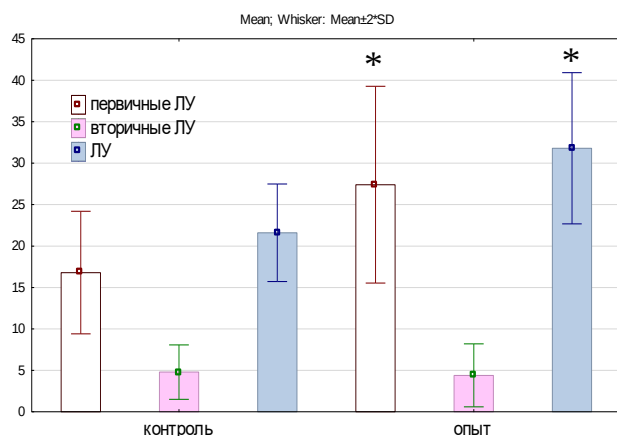


Рис. 4. Среднее число первичных и вторичных лимфоидных узелков белой пульпы селезенки и их общее число (ЛУ) у животных контрольной и опытной групп

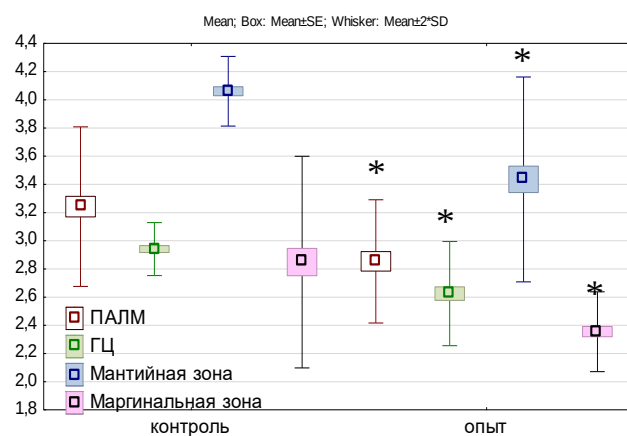


Рис. 5. Абсолютное число клеток на единицу площади в зонах белой пульпы селезенки крыс контрольной и опытной групп

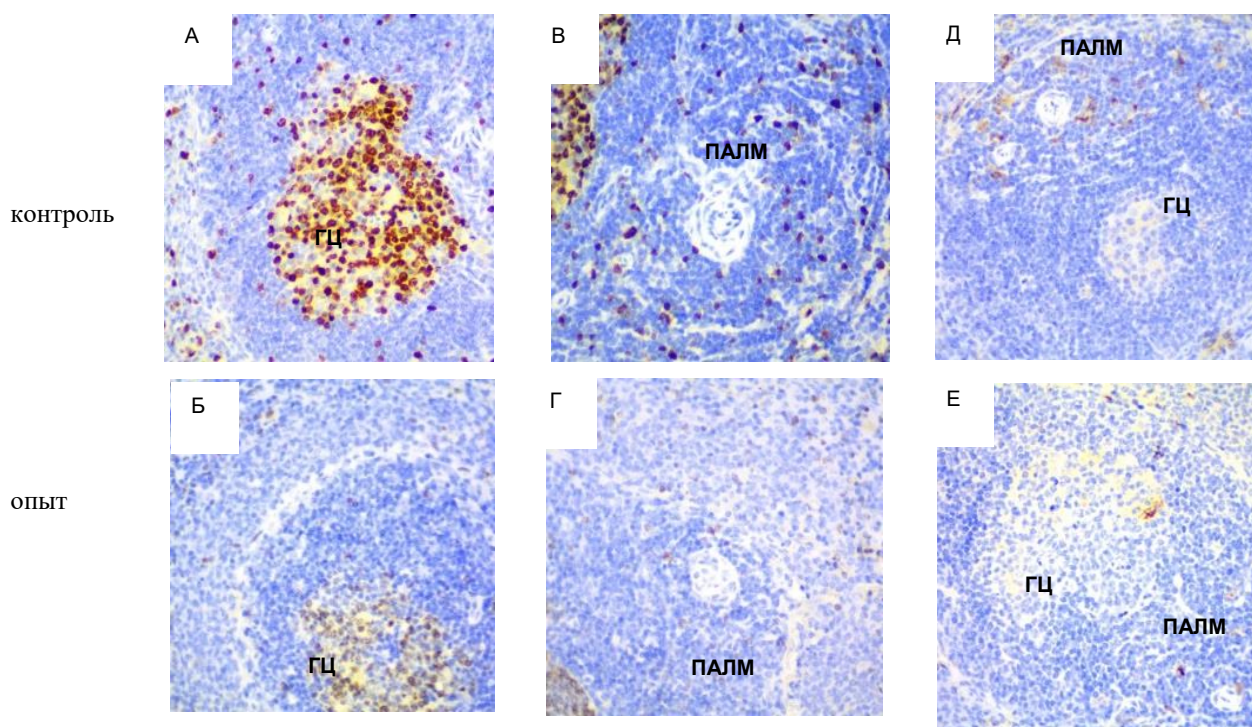


Рис. 6. Селезенка крысы контрольной и опытной группы животных. а-г — иммуногистохимическое окрашивание антителами к Ki-67; д, е — к маркеру макрофагов CD68. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.х400. ГЦ — герминативный центр лимфоидного узелка, ПАЛМ — периартериальная лимфоидная муфта

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.

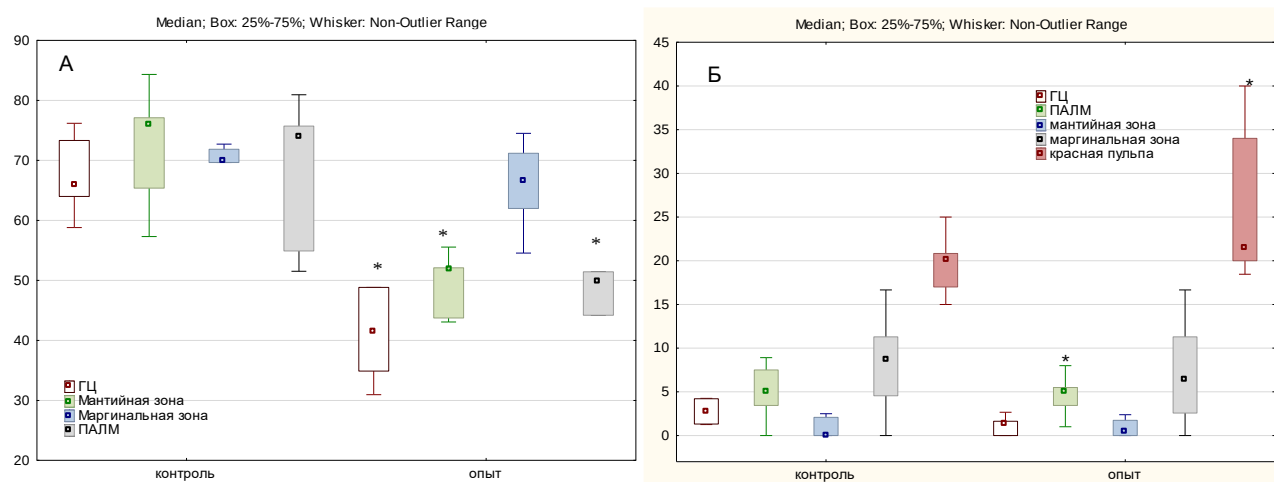


Рис. 7. Доля Ki-67 – (а) и CD68 – (б) иммунопозитивных клеток на единицу площади в селезенке животных контрольной и опытной групп

Морфологическая характеристика поверхностных шейных лимфатических узлов. У животных контрольной группы строение поверхностных лимфатических узлов шеи соответствовало нормальному, какие-либо реактивные изменения отсутствовали. Кортикальное 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. По данным морфометрического исследования, число вторичных лимфоидных узелков возросло на 35,38%, при этом площадь их герминативных центров увеличилась на 28,08%. В герминативных центрах лимфоидных узелков и в паракортикальной области повысилось абсолютное количество клеток, приходящихся на единицу площади (рис. 8). 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. 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 (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).

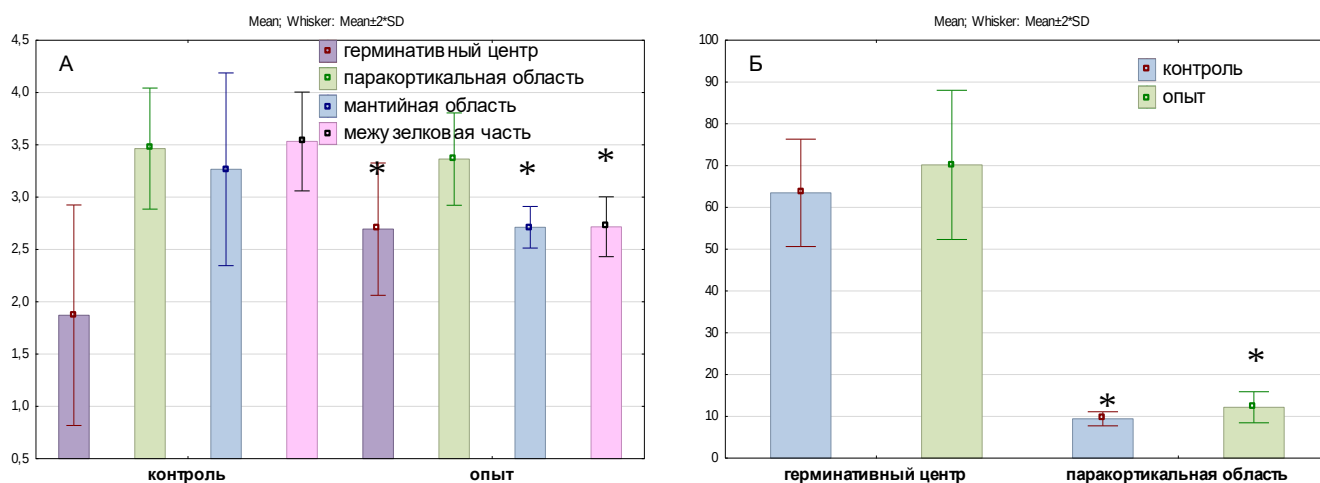


Рис. 8. Абсолютное число клеток на единицу площади в структурно-функциональных зонах лимфатического узла (а); доля $Ki-67^+$ клеток в герминативных центрах и паракортикальной области лимфоидных узлов лимфатического узла крыс контрольной и опытной групп (б)

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.

Показатели крови человека и крысы в условиях воздействия наночастиц диоксида титана

Нейтрофилы крови человека после воздействия наночастиц диоксида титана в условиях in vitro, по данным атомно-силовой микроскопии. Нейтрофильные сегментоядерные лейкоциты, представляющие основной пул белых клеток крови, обеспечивают реализацию врожденных защитных реакций. Участие нейтрофилов в обеспечении врожденного иммунитета складывается из экстренной реакции клеток, мобилизуемых из кровотока в очаг инфекции и повреждения, а также высокой фагоцитирующей способности. Наряду с моноцитами/макрофагами нейтрофилы рассматривают как основные фагоцитирующие клетки (Ярилин А.А.,

2010). Наличие сегментированного ядра у зрелых форм позволяет нейтрофилам проникать через мелкие поры диаметром 3-5 мкм, купировать инфекционный процесс в месте инвазии патогенов, препятствуя их распространению (Беляева А.С. и др., 2016). Таким образом, нейтрофилы являются оптимально приспособленными для осуществления ранних этапов иммунной защиты в рамках острой воспалительной реакции. На модели *in vitro* нами были исследованы результаты контакта нейтрофилов с НЧ TiO_2 с помощью высокоразрешающей атомно-силовой микроскопии (АСМ), ибо сведений о том, какие эффекты вызывают эти НЧ практически нет. Для решения этой проблемы были проанализированы ключевые морфологические параметры нейтрофилов крови человека на фоне воздействия НЧ TiO_2 – диаметр, высота клетки, шероховатость, жесткость.

Результаты АСМ-сканирования нейтрофилов крови показали, что в контрольных образцах присутствуют нейтрофилы округлой формы, с ровными краями, преимущественно имеющие сегментированное ядро, расположенное асимметрично (рис. 9, а). Поверхность нейтрофилов характеризуется незначительными инвагинациями. Нейтрофилы, подвергнутые воздействию НЧ, имели неровные контуры, просматривались выраженные псевдоподии (рис. 9, б).

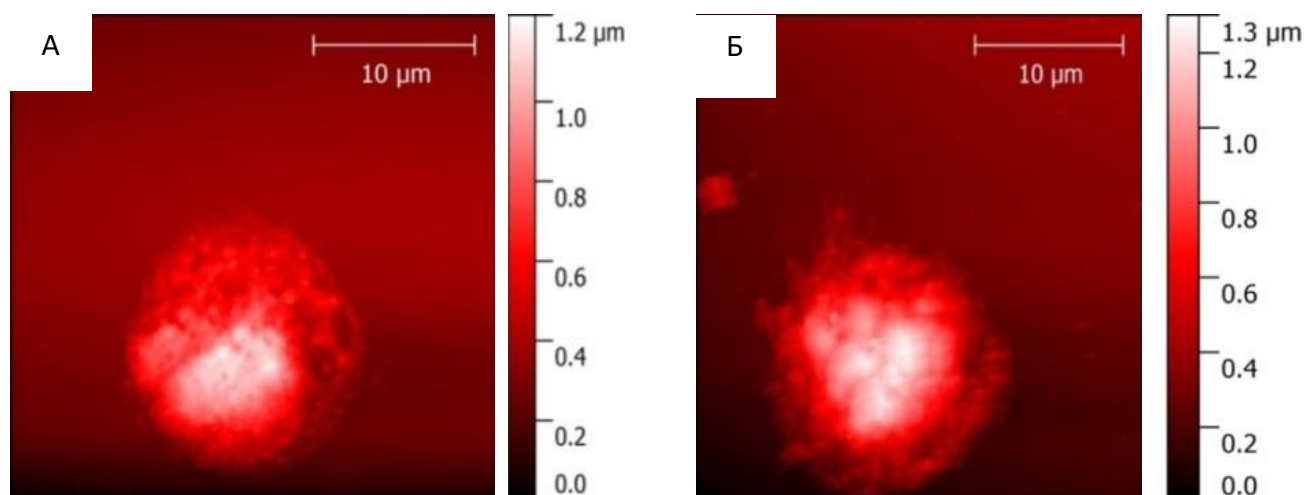


Рис. 9. Топография нейтрофилов контрольной (а) и опытной (б) групп, полученная с помощью АСМ

Результаты оценки цитометрических параметров (табл. 3) показали, что на фоне прямого воздействия НЧ TiO_2 средний диаметр нейтрофилов не изменяется ($p > 0,05$), тогда как средняя высота клеток увеличивается. Наряду с изменением цитометрических 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, что было подтверждено результатами измерения максимальной, минимальной высоты клетки и максимального их перепада. Указанные показатели значительно выше у клеток опытной группы, что позволяет сделать вывод о большей шероховатости их поверхности по сравнению с интактными нейтрофилами. 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 B. 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 3

**Морфометрические параметры, модуль Юнга
нейтрофилов крови на фоне воздействия НЧ TiO₂ (M±Sd)**

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

Примечание: * – здесь и далее в таблицах статистически значимые различия (p<0, 05)

Проведенное нами изучение биомеханических свойств поверхности нейтрофилов позволило выявить, что присутствие НЧ TiO₂ ведет к увеличению модуля Юнга поверхности нейтрофилов на 121% по сравнению с контролем, что свидетельствует о повышении ригидности клеток. Возможной причиной увеличения жесткости поверхности нейтрофилов является повышенная генерация АФК 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, и, в частности, может привести 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 структурно-биомеханических свойств нейтрофилов в результате взаимодействия с НЧ TiO₂ свидетельствуют об их негативном влиянии и могут служить одним из самых ранних маркеров их повреждающего действия.

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 иммуннокомпетентных клеток, то логично предположить, что такие сдвиги в их содержании не могут не затронуть систему крови. Анализ гематологических показателей животных на фоне введения НЧ TiO₂ свидетельствует об отсутствии

выраженных изменений со стороны красной крови. В течение всего периода наблюдения содержание гемоглобина и число эритроцитов колебались в пределах нормы и не отличались от контрольных значений. Изучение количественных показателей лейкоцитов крови животных на фоне перорального введения исследуемых НЧ выявило, что к 14-му дню наблюдений резко повышается содержание лейкоцитов, достигая максимальных значений к 30-му дню эксперимента. Анализ лейкоцитарной формулы показал, что лейкоцитоз формируется за счет гранулоцитов, абсолютное число которых к концу срока наблюдений возрастает на 43% (табл. 4). 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).

Т а б л и ц а 4

Лейкоцитарный профиль крови животных контрольной и опытных групп ($M \pm Sd$)

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

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., Quirie A., 2018).

Морфологические изменения и активность индикаторных ферментов печени на фоне перорального введения наночастиц диоксида титана

Одним из естественных защитных барьеров организма от вредных веществ является печень, обладающая эффективными детоксикационными возможностями. Более того, при любых токсических поражениях этот орган способен регулировать функциональные возможности системы крови за счет синтеза большей части белков ее плазмы. При морфологическом исследовании печени животных контрольной группы грубых нарушений в структурной организации органа не было выявлено, балочное и дольковое строение сохранено. При исследовании гистологической картины печени крыс опытной группы через 30 дней после перорального введения НЧ TiO_2 были обнаружены выраженные дистрофические изменения гепатоцитов на фоне увеличения уровня активности ферментов печени – АЛАТ и АсАТ в сыворотке крови (рис. 10).

Анализ ультраструктурных особенностей печени животных на фоне воздействия НЧ TiO_2 позволил обнаружить дистрофически измененные гепатоциты полигональной формы. Ядро неправильной формы характеризовалось выраженными инвагинациями кариолеммы. В кариоплазме наблюдалась избыточная конденсация хроматина, его маргинация, что возможно, отражает нарушение процессов транскрипции и рассматривается как признак первой стадии апоптоза (Лушников Е.Ф., Абросимова А.Ю., 2001). Ядрышко было представлено пористыми мелкозернистыми структурами с очагами просветления в центре. Подобное разрыхление ядрышек, отражающее их гипогрануляцию, может быть следствием нарушения образования р-РНК. В печени опытной группы животных чаще выявлялись двуядерные клетки. В гепатоцитах обнаруживались как набухшие с просветленным матриксом митохондрии с фрагментированными кристами, так и многочисленные органеллы с гомогенизированным матриксом, в котором часто определялись электронно-плотные частицы. Как правило, подобные митохондриальные осмиофильные гранулы служат местом аккумуляции двухвалентных ионов кальция и отражают неспецифическую реакцию митохондрий на повреждение клетки (Плотников Е.Ю. и др., 2015). В результате деструкции гладкой ЭПС в виде распада ее структурных элементов (очаговый цитоллиз) цитоплазма отдельных гепатоцитов была просветлена и электронно-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 КГ,

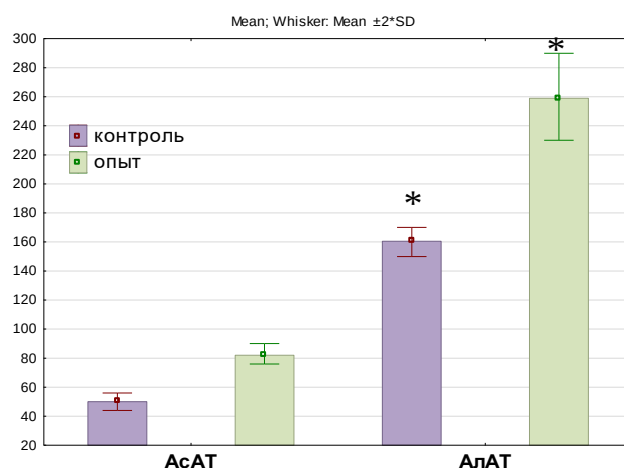


Рис. 10. Содержание в плазме крови животных контрольной и опытной групп АЛАТ и АсАТ (Ед./л.).

потерей их параллельной ориентации. Микроворсинки васкулярной поверхности гепатоцитов в пространстве Диссе гипертрофированы и деформированы, 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 макрофагов печени, выражающейся в их гипертрофии и увеличении в цитоплазме клеток числа первичных и вторичных лизосом.

Проведенные нами *иммуногистохимические исследования* показали, что к 14-му дню наблюдений количество CD68-иммунопозитивных клеток увеличилось примерно в два раза, а к 30-му дню – в три раза по сравнению с аналогичным показателем интактной группы животных. 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.

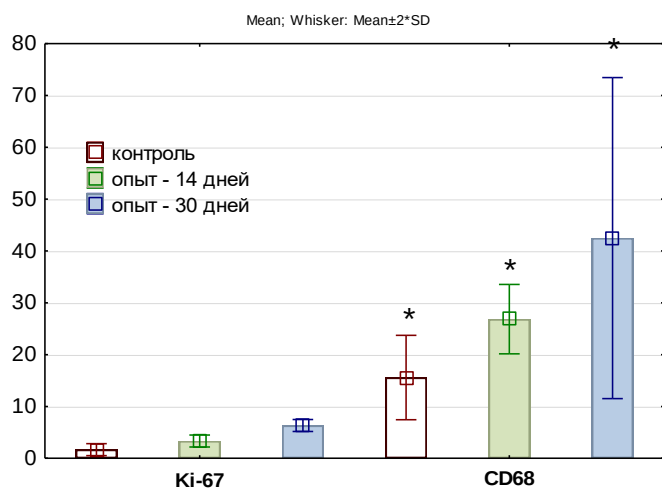


Рис. 11. Среднее число Ki-67- и CD68-иммунопозитивных клеток на единицу площади в печени животных контрольной и опытных групп

Полученные нами результаты негативного влияния перорального введения НЧ TiO₂ на печень, верифицированные результатами морфологического, иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследований, согласуются с данными других авторов, в которых показано, что подобные структурно-функциональные изменения органа обусловлены продолжительным воздействием НЧ TiO₂, сложностью процессов их детоксикации, накоплением их в гепатоцитах и цитотоксическим действием (El-Daly A. A., 2017).

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 (Teubl B.J., 2015). В конечном счете в клетках печени НЧ TiO₂ взаимодействуют с белками и ферментами, препятствуя механизмам антиоксидантной защиты и приводя к генерации АФК (Natarajan V. et.al, 2015; Jafar A. et al., 2018). Развитие ОС увеличивает ПОЛ в мембране митохондрий и проницаемость ЭПС, что

приводит к нарушению энергетического метаболизма и может стать основной причиной обнаруженных нами ультраструктурных изменений гепатоцитов. В исследованиях Long T.C. (2006) показано, что НЧ TiO_2 по своему действию похожи на вирус гепатита, который, проникая в ядро гепатоцита, связывается с ДНК (Meena R. Paulraj R., 2012; Azim S.A. et al., 2015; Khaled M.A., 2017), приводит к изменению уровней 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; El-Daly A. A., 2017; Hassanein K.M.A., El-Amir Y.O., 2018). Выявленные нарушения могут являться результатом как прямого действия наночастиц на клетки, так и быть опосредованными, например, следствием нарушения функциональных свойств микроциркуляторного русла.

Таким образом, обнаруженные нами морфофункциональные изменения печени животных при пероральном введении НЧ TiO_2 демонстрируют их возможное неблагоприятное воздействие, что хорошо согласуется с имеющимися сведениями о высокой чувствительности органа к действию различных дестабилизирующих и токсичных факторов, в том числе и наноматериалов.

Морфофункциональные изменения ЦНС при интраназальном введении наночастиц диоксида титана

Морфологическая характеристика гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса головного мозга. Известно, 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) проникают в головной мозг через обонятельный тракт и аккумулируются 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 наночастиц рассматривается их эндоцитоз чувствительными нервными окончаниями эпителия воздухоносных путей, в частности, через обонятельный и тройничный нерв. По мнению многих исследователей (Kao Y.Y. et al., 2012; Song B. et al., 2015; Fatouh A.M. et al., 2017), обонятельный тракт может быть критическим путем попадания НЧ в ЦНС человека, особенно при их высоких концентрациях в воздухе, например, в рабочей зоне при длительном их воздействии, связанном с профессиональной деятельностью. Согласно данным ряда исследований (Sheng L. et al., 2015; Dan M. et al., 2018), нейроны гиппокампа в большей степени по сравнению с клетками других отделов головного мозга чувствительны к действию различных неблагоприятных факторов, в том числе и НЧ. Однако причины такой уязвимости и морфофункциональные изменения гиппокампа головного мозга и тесно с связанного с ним миндалевидного комплекса (МК) к воздействию НЧ TiO_2 до сих пор не исследованы в полной мере.

Результаты проведенных нами исследований показали, что при интраназальном введении НЧ TiO_2 в полях СА1, СА3, в зубчатой извилине гиппокампа мозга наблюдается 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 (рис. 12). Нейроны пирамидного слоя указанных зон гиппокампа располагаются неравномерно, компактность их размещения отсутствует, вокруг нейронов выявляются очаги глиоза. Морфометрический анализ выявил уменьшение плотности расположения нейронов пирамидного слоя в поле СА1 гиппокампа на 47,45%, в поле СА3 — на 34,88%, а также уменьшение средней площади их ядра и перикариона (рис. 13).

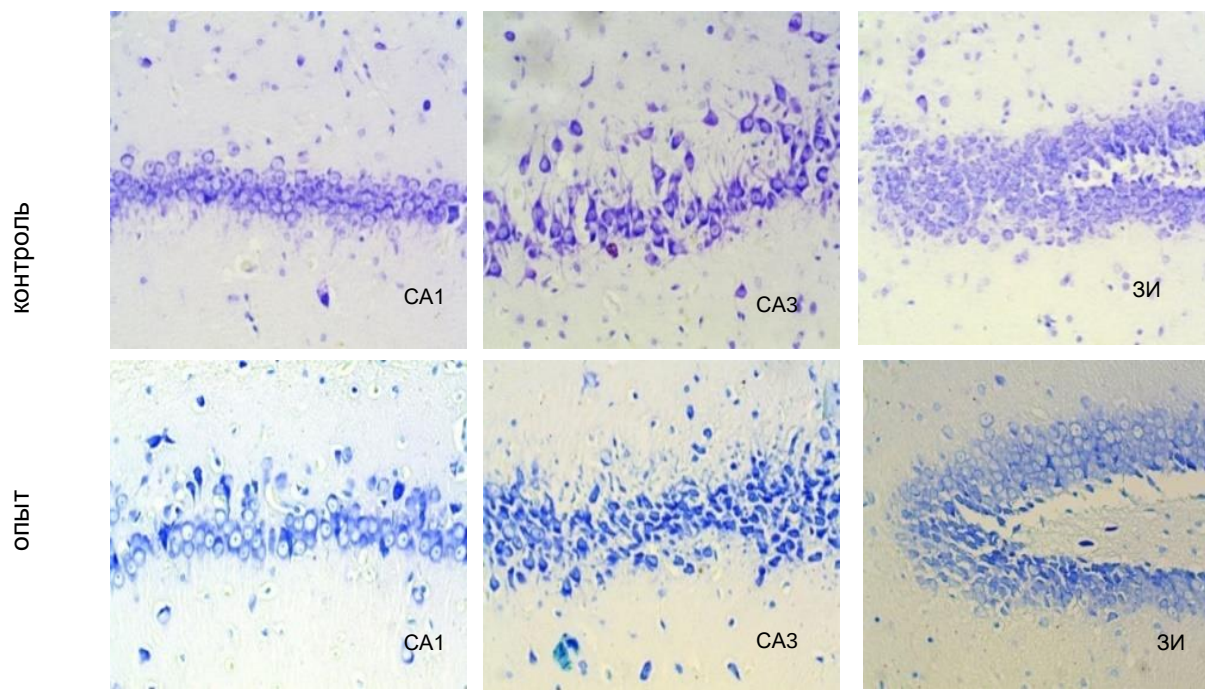


Рис. 12. Структурная организация гиппокампа крысы контрольной и опытной групп животных. Окраска крезилевым фиолетовым по Нисслю. Ув.х100

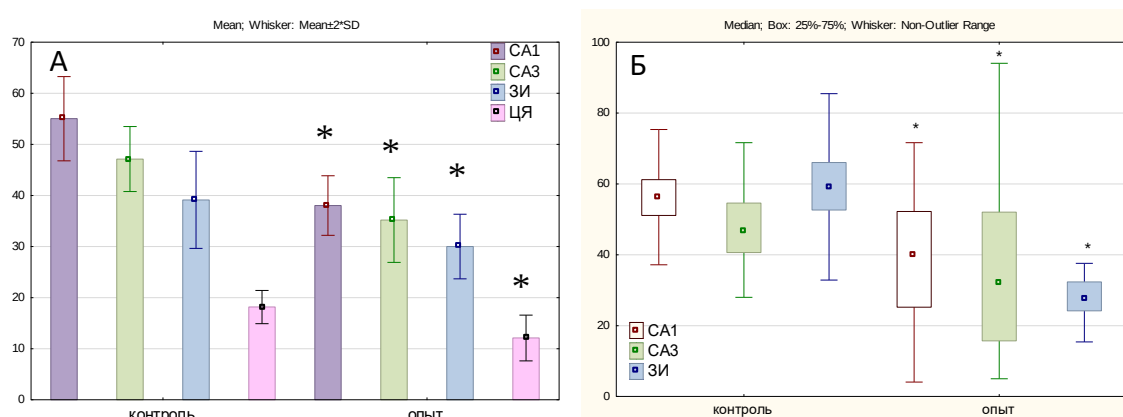


Рис. 13. Плотность нейронов на $0,001\text{мм}^3$ (а) и средняя площадь ядра ($\mu\text{м}^2$) нейронов (б) изученных зон мозга контрольной и опытной групп

В центральном ядре (ЦЯ) миндалевидного комплекса мозга отмечалось значительное увеличение числа нейронов с признаками дегенерации, большинство из которых содержало темное пикнотическое ядро с отсутствием ядрышка. Выявлены нарушения citoархитектоники описываемой области мозга, заключающиеся в снижении удельной плотности расположения клеток по

сравнению с интактными животными на 29,35%, снижение площади ядра и перикариона нейронов на 29,47% и 33,76% соответственно.

Исследование ультраструктурных особенностей гиппокампа и МК мозга крыс опытной группы подтвердило наличие тех негативных изменений, которые были обнаружены нами на светооптическом уровне. В изученных областях мозга животных опытной группы среди нейронов с неизменной структурой встречаются и отдельные клетки с признаками дегенерации. В перикарионе таких нейронов отмечается просветление матрикса цитоплазмы, значительное уменьшение числа свободных рибосом и полисом, расширение цистерн ЭПС. Обращает внимание даже визуально определяемое уменьшение объема клеток. Профиль ядра становится вытянутым в медио-латеральном направлении, а его контуры имеют сложный рельеф поверхности за счет многочисленных инвагинаций. Гетерохроматин гранулирован, состоит из скоплений гранул разных по величине и плотности расположения. Комплекс Гольджи нейронов изученных структур головного мозга животных опытной группы визуализируется редко или представляет собой расширенные цистерны без признаков синтетической деятельности. Митохондрии в перикарионах нейронов набухшие, распределены по цитоплазме неравномерно, целостность их крист, внешней и внутренней мембраны часто нарушена. В нейронах определяется появление вакуолей и значительного числа липофусциновых гранул. Таким образом, проведенные нами электронно-микроскопические исследования гиппокампа и МК показали, что интраназальное введение НЧ TiO_2 , возможно, вызывает критические повреждения энергетического и белоксинтетического аппаратов нейронов.

Для нормальной деятельности различных структур ЦНС важным фактором является уровень васкуляризации. Структурно-функциональные характеристики микроциркуляторного русла головного мозга зависят от чувствительности их клеток к гуморальным факторам, обеспечивающим ангиогенез. Одним из таких ключевых факторов является эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) — специфический эндотелиальный митоген, который поддерживает ангиогенез, участвует в кроветворении, васкулогенезе (Shibuya M. et al., 1990; de Vries C. et al., 1992). Известно, что наивысшей константой связывания с VEGF обладает рецептор VEGFR-1/Flt-1, который мы использовали в качестве маркера для иммуногистохимического изучения чувствительности клеток гиппокампа и ЦЯ МК к этому гуморальному фактору в условиях воздействия НЧ TiO_2 . Результаты иммуногистохимического типирования показали, что в изученных областях мозга интактных животных Flt-позитивное окрашивание наблюдалось как в нейронах и глиальных элементах, так и эндотелиальных клетках сосудов (рис. 14, а-г). При сравнительном 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 глии 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.

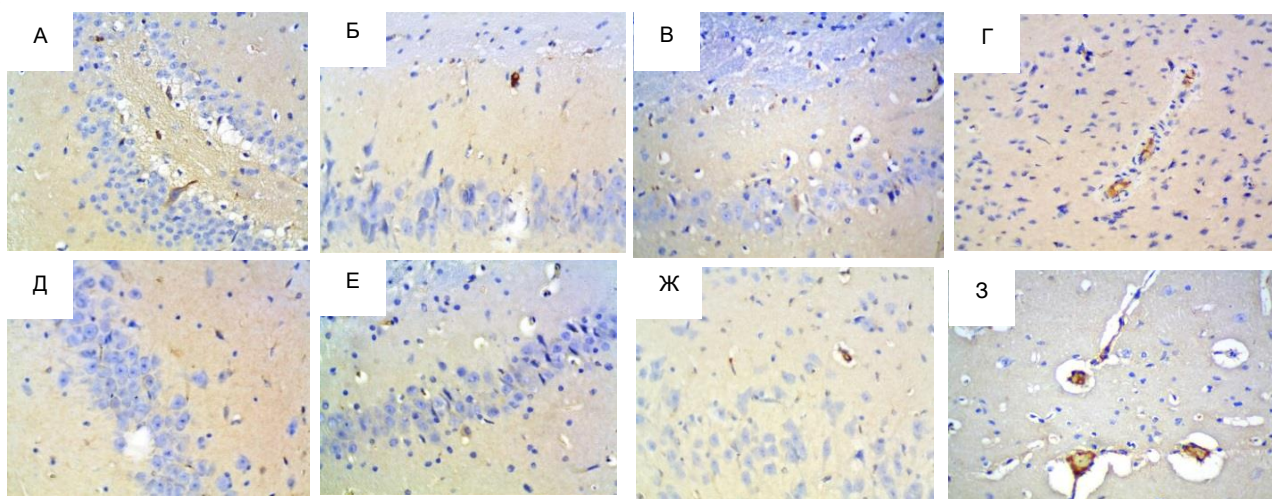


Рис. 14. Экспрессия VEGFR-1 в гиппокампе мозга крыс контрольной (а-г) и опытной (д-з) групп. Непрямой иммунопероксидазный метод с докрасиванием гематоксилином. Ув. х400

По мнению многих исследователей, одним из признаков повреждения головного мозга при действии неблагоприятных факторов является активация астроглии (Tishkina A.O. et al., 2013; Smirnov A.V. et al., 2017). Реактивные изменения астроцитов проявляются в увеличении их линейных размеров, усилении синтеза ряда белков, в том числе и кислого глиального фибриллярного белка (GFAP), маркера промежуточных филаментов астроцитов. С целью выяснения реакции астроцитарной глии на интраназальное введение НЧ TiO_2 мы провели исследование уровня экспрессии GFAP. Нами было выявлено увеличение относительной плотности иммуногистохимического окрашивания антителами к GFAP в различных зонах гиппокампа и ЦЯ МК крыс под влиянием НЧ TiO_2 , что свидетельствует об увеличении числа реактивных астроцитов в указанных областях мозга (рис. 15). Усиление экспрессии GFAP в гиппокампе и ЦЯ МК мозга животных опытной группы, по-видимому, отражает перестройку цитоскелета глиальных клеток, приводящую к нарушению citoархитектоники, что влияет на межклеточную коммуникацию между астроцитами и нейронами. Учитывая, что астроциты, наряду с микроглией, являются резидентными иммунокомпетентными клетками мозга и в условиях патологии участвуют в развитии иммунных реакций, есть основания полагать, что это в значительной степени и определяет их высокую реактивность при любых неблагоприятных воздействиях. Кроме того, в силу непосредственной связи астроцитарных ножек с микрососудами, астроциты являются первыми клетками на пути разнообразных патогенов, проникающих в ЦНС (Коломеец Н.С., Уранова Н.А., 2014).

Таким образом, анализ полученных данных позволяет заключить, что деструктивные изменения различных клеток гиппокампа и ЦЯ МК головного мозга при интраназальном введении НЧ TiO_2 идет за счет индукции ОС, апоптоза и повреждения ряда органоидов клеток (Mushtaq G. et al., 2015; Shah S.N.A. et al., 2017), что находит отражение в обнаруженных нами макро- и микроструктурных изменениях изученных структур ЦНС 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.

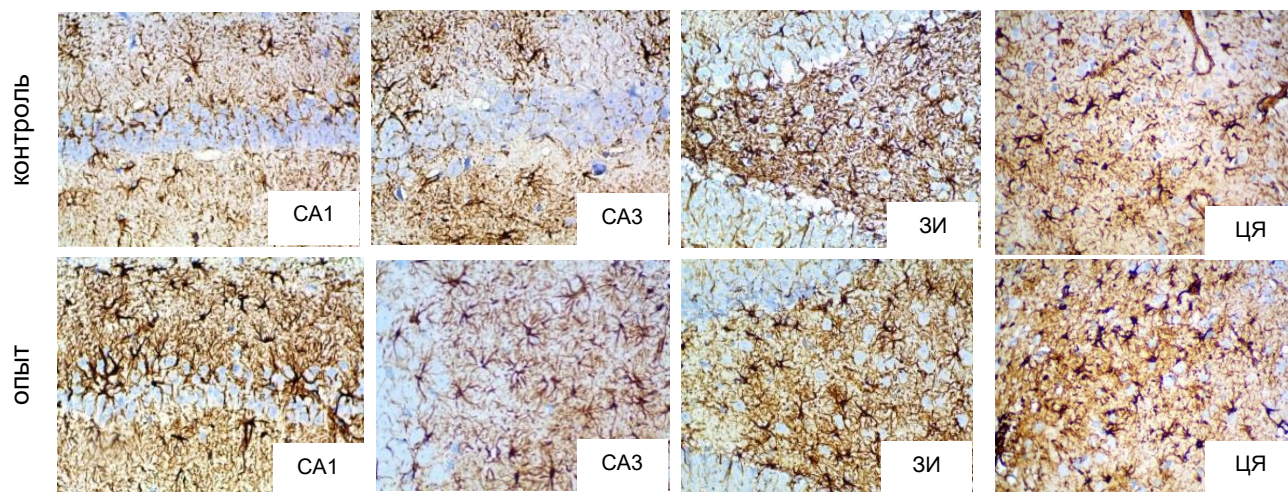


Рис. 15. Гиппокамп (поля CA1, CA3, зубчатая извилина (ЗИ)) и центральное ядро МК (ЦЯ) головного мозга животных контрольной и опытной групп. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к GFAP. Непрямой иммунопероксидазный метод с докрасиванием гематоксилином. Ув. х400

Функциональная характеристика ЦНС. Одним из адекватных инструментов оценки функционального состояния головного мозга и выявления различных психоневрологических расстройств является анализ спектральной мощности электроэнцефалограммы (ЭЭГ). На ЭЭГ префронтальной области коры крыс контрольной группы электрическая активность определялась в частотном диапазоне от 1 до 35 Гц: средняя амплитуда ритмов составила $10,33 \pm 1,22$ мкВ ($M \pm Sd$). Через 30 дней после интраназального введения НЧ TiO₂ этот показатель повысился ($p < 0,05$) и составил $12,00 \pm 1,00$ мкВ. 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. 5). 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 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.

Т а б л и ц а 5

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

Ритмы ЭЭГ	Префронтальная кора			Теменная кора		
	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

Известно, что *поведенческие реакции* напрямую связаны с морфофункциональными характеристиками нейронов как ЦНС, так и периферической нервной системы. При анализе поведения животных исследователи уделяют внимание состоянию их тревожности и признакам депрессивности. Традиционно для моделирования подобных состояний используют поведенческие тесты, которые основаны на анализе спонтанного поведения при помещении животных в незнакомую для них среду. Нами была проведена оценка уровня тревожности крыс на фоне интраназального введения НЧ TiO_2 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», использующийся в качестве скринингового теста во многих нейробиологических исследованиях тревожности. Результаты проведенного исследования показали, что через 30 дней эксперимента крысы значительно больше времени проводили в закрытом рукаве лабиринта (126,66 $\pm$ 26,09 с) по сравнению с интактными животными (71,33 $\pm$ 21,6 с). Этот факт в совокупности с боязнью животных высоты (уменьшение числа свешиваний: 14,5 $\pm$ 1,61 (контроль), 11 $\pm$ 1,71 (опыт), $p < 0,05$) указывает на то, что интраназальное введение НЧ TiO_2 вызывает повышение степени тревожности крыс. Кроме того, в этих условиях у животных повышается уровень исследовательского поведения, на что указывает увеличение числа стоек как в светлом (контроль: 2,48 $\pm$ 0,83; опыт: 4,83 $\pm$ 1,35, $p < 0,05$), так и в темном рукавах лабиринта (контроль: 5,02 $\pm$ 1,6; опыт: 7,66 $\pm$ 1,60, $p < 0,05$). Зарегистрированное нами увеличение количества выглядываний на 14-й (5,33 $\pm$ 0,89) и 30-й дни (5,62 $\pm$ 1,07) эксперимента по сравнению с животными контрольной группы (3,33 $\pm$ 0,84) является признаком возрастания сложности принятия решения. В совокупности эти параметры по сложившемуся на сегодняшний день представлению свидетельствуют об увеличении уровня тревожности животных. Обнаруженные нами поведенческие особенности у этих животных, помимо изменения биоэлектрической активности нейронов головного мозга, можно объяснить также уменьшением содержания

таких нейромедиаторов как норадреналин, дофамин и его метаболитов в условиях воздействия наночастиц (Zhang L. et al., 2012).

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).

Репродуктивная система крыс при пероральном введении наночастиц диоксида титана

Структурно-функциональная характеристика семенников. Как уже отмечалось выше, наноматериалы оказывают влияние не только на соматические клетки, но и на гаметы. Нарушение процессов образования половых клеток неизбежно будет сказываться на качестве потомства. Кроме того, следует учитывать и то обстоятельство, что органы, обеспечивающие гаметогенез являются важнейшим компонентом эндокринной системы, регулирующей практически все процессы в организме. При исследовании семенников крыс, подвергшихся воздействию НЧ TiO_2 , были выявлены выраженные морфологические изменения. Так, к 14-му дню эксперимента в извитых семенных канальцах (ИСК) отмечались дистрофические изменения сперматогенного эпителия (СЭ), появление вакуолей в цитоплазме клеток Сертоли, что может свидетельствовать о нарушении интегративных связей развивающихся гамет и sustentоцитов, причем к 30-му дню эксперимента указанные структурные изменения были более выраженными. Наличие значительного числа вакуолей в клетках Сертоли по мнению многих авторов является ранним морфологическим признаком повреждения семенников и рассматривается как основной ответ этих клеток на многие ксенобиотики, связанное с угнетением их функции (Talebi A.R. et al., 2013). Подтверждением этого тезиса является исследование *in vitro*, в котором показано, что НЧ TiO_2 вызывают повышение генерации АФК в клетках Сертоли, усиление ПОЛ, повреждение ДНК, активацию ряда каспаз и гибель этих клеток (Hong F. et al., 2016). Кроме того, к 30-му дню эксперимента в ИСК отмечается резкое уменьшение числа зрелых сперматид, в результате чего сперматогенный 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 результатах оценки морфометрических параметров семенников (табл. 6). Установлено, что в семенниках животных опытной группы через 30 дней эксперимента на 22,86% снижается толщина СЭ, которая согласно существующим представлениям прямо коррелирует с количеством клеток в его составе. Обнаруженное нами уменьшение этого показателя свидетельствует о негативном воздействии НЧ на структурные характеристики семенников и обусловлено, в том числе и редукцией в нем числа стволовых клеток. Показано, что именно

сперматогенные стволовые клетки наиболее чувствительны к воздействию НЧ TiO_2 (Braydich-Stolle L.K. et al., 2010), что согласуется с результатами проведенных нами иммуногистохимических исследований. Нами выявлено нарушение процессов пролиферации и дифференцировки клеток сперматогенного эпителия, о чем свидетельствует снижение экспрессии рецептора стволовых клеток c-kit – белка, который поддерживает трансформацию недифференцированных сперматогоний типа $A_{\text{темные}}$ в сперматогонии класса $A_{\text{светлые}}$. Параллельно обнаруживалось уменьшение количества клеток, в которых выявлялся маркер пролиферации Ki-67. Этот факт указывает на недостаточную эффективность процессов регенерации СЭ как тканевой системы, и в условиях воздействия НЧ сперматогенез, сопровождающийся высокой пролиферативной активностью вовлеченных в него клеток, оказывается уязвимым. На угнетение сперматогенеза косвенно указывает и уменьшение диаметра ИСК на 8,94% уже к 14-му дню эксперимента. Сравнительный морфометрический анализ показал, что по сравнению с контрольной группой средняя площадь ядра интерстициальных клеток семенников крыс опытной группы уменьшается ($p < 0,05$).

Т а б л и ц а 6

Морфометрические показатели семенников крыс в условиях воздействия НЧ TiO_2 ($M \pm Sd$)

Показатели	Контроль	14 дней	30 дней
Толщина СЭ, $\mu\text{м}$	106,71 $\pm$ 12,24	86,19 $\pm$ 8,78*	82,31 $\pm$ 7,35*
Диаметр ИСК, $\mu\text{м}$	262,5 $\pm$ 17,35	239,04 $\pm$ 18,75*	245,64 $\pm$ 19,35
Площадь ядра клеток Лейдига, $\mu\text{м}^2$	29,94 $\pm$ 2,35	25,14 $\pm$ 2,84*	27,42 $\pm$ 1,12*

Таким образом, нами показано, что при ежедневном пероральном введении крысам НЧ TiO_2 в семенниках крыс наблюдается нарушение процессов сперматогенеза, которое затрагивает такие ключевые для клеток этой структуры характеристики, как пролиферативную активность и способность к дифференцировке. Однако это может быть следствием не только прямого воздействия НЧ TiO_2 на гонады, но и являться следствием их негативного влияния на гуморальную систему организма. Результаты проведенного нами исследования согласуются с имеющимися сведениями о высокой чувствительности органов мужской репродуктивной системы к действию различных дестабилизирующих факторов, в том числе и наноматериалов (Мильто И. В. и др., 2018; Morgan A.M. et al., 2017).

Эффекты антенатального воздействия НЧ TiO_2 на эмбриональное и раннее постнатальное развитие. Наблюдение за течением беременности крыс контрольной и опытной групп не выявило признаков интоксикации, таких как угнетение двигательной активности, гиперемия слизистых оболочек, взъерошенность шерсти, снижение реакции на внешние раздражители и уменьшение массы тела; случаев патологического прерывания беременности. Однако к концу срока беременности самки крыс опытной группы имели меньший вес, чем крысы контрольной группы ($p < 0,05$). Обнаружено, что в результате введения НЧ TiO_2 в антенатальный период развития на 76,34% повышается предимплантационная гибель зигот (табл. 7), 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.

Хорошо известно, что введение ксенобиотиков во время беременности может вызывать не только гибель и уродства эмбрионов, но и разнообразные отклонения развития в постнатальный период (Вокон Д.А. et al., 2015). В связи с этим нами изучены отдаленные эффекты воздействия НЧ TiO_2 в антенатальный период на раннее постнатальное развитие потомства.

Т а б л и ц а 7

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

Исследуемые показатели	Контроль	Опыт
Количество желтых тел на 1 крысу, шт	$10,5 \pm 1,38$	$11,2 \pm 1,51$
Количество мест имплантации на 1 крысу, шт	$9,40 \pm 1,25$	$9,13 \pm 1,18$
Количество плодов на 1 крысу, шт	$8,5 \pm 1,24$	$8,02 \pm 1,05$
Предимплантационная смертность, %	10,48	18,48*
Постимплантационная смертность, %	9,57	12,16*
Общая эмбриональная смертность, %	19,05	28,39*
Кранио-каудальный размер плода, см	$2,8 \pm 0,05$	$2,97 \pm 0,04$
Масса плода, г	$1,95 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,01$
Среднее число крысят на самку при рождении	$8,8 \pm 1,5$	$8,3 \pm 1,8$
Гибель крысят в период вскармливания, %	6,81%	13,97%*
Соотношение полов (самки/самцы)	1,29	1,33
День отлипания ушной раковины	$4,09 \pm 0,5$	$4,68 \pm 0,5^*$
День появления первичного волосяного покрова	$5,71 \pm 0,23$	$5,48 \pm 0,15^*$
День прорезывания резцов	$10,75 \pm 1,71$	$11,5 \pm 1,8^*$
День открытия глаз	$15,87 \pm 1,04$	$16,9 \pm 2,4^*$
Масса тела крысят (г) на 4-й день	$8,07 \pm 0,3$	$7,45 \pm 0,2^*$
Масса тела крысят (г) на 7-й день	$14,03 \pm 0,2$	$13,15 \pm 0,3^*$
Масса тела крысят (г) на 14-й день	$18,06 \pm 1,7$	$16,60 \pm 1,04^*$
Масса тела крысят (г) на 21-й день	$27,51 \pm 2,3$	$25,5 \pm 1,5^*$
Гибель самок в период вскармливания	0	0

Установлено, что пероральное введение НЧ TiO_2 не влияет на продолжительность вынашивания беременности, которая составила в среднем 22-23 дня. Однако наблюдение за 88 крысятами контрольной группы и 83 крысятами опытной группы показало, что их развитие протекает с некоторыми отличиями, которые затрагивали такие важные показатели онтогенеза, как постнатальная смертность и прирост массы тела (табл. 7). Гибель крысят опытной группы в период вскармливания была выше, а масса тела на 4-й, 7-й, 14-й, 21-й дни ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Обнаружено, что основные морфологические

признаки созревания крысят опытной группы – отлипание ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открывание глаз – проявлялись позже, чем у крыс контрольной группы ($p < 0,05$). Таким образом, антенатальное воздействие НЧ TiO_2 приводит к повышению смертности крысят в период их вскармливания, отставанию в наборе веса и задержке морфофункционального созревания. Полученные нами данные о негативном влиянии перорального введения НЧ TiO_2 во время беременности на пренатальное и постнатальное развитие потомства крыс хорошо согласуются с результатами исследований других авторов, где показано, что подкожное введение беременным самкам мышей НЧ TiO_2 провоцирует осложнения беременности (Engler-Chiurazzi E.B. et al., 2016), приводит к определенным повреждениям органов репродуктивной системы, негативно сказывается на развитии ЦНС потомства (Mohammadipour A. et al., 2014), а сами наночастицы обнаруживаются в плаценте, печени и головном мозге плодов (Engler-Chiurazzi E.B. et al., 2016; Tochilkina L.P., 2014).

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 подвергнувшегося антенатальному воздействию потомства.

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 средней амплитуды ритмов ЭЭГ, преобладание медленноволновой активности 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 TiO_2 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 сустентоцитов; 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. Центральное ядро миндалевидного комплекса мозга: цитоархитектоника, нейронная организация и гистофизиология / Шарипова Л.А., Калимуллина Л.Б., Минибаева З.Р. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90. – № 2. – С. 137-145.

2. Центральное ядро миндалевидного тела мозга: цитоархитектоника, нейронная организация, связи / Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б., Шарипова Л.А. // Морфология. – 2003. – Т. 123. – № 5. – С. 515-523.

3. Структурная организация центрального ядра миндалевидного комплекса мозга / Шарипова Л.А., Калимуллина Л.Б. // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123. – № 5. – С. 515-523.

4. Rostro-caudal gradient in structural-functional organization of the amygdaloid complex / Kalimullina L.B., Akhmadeev A.V., Minibaeva Z.R., Gurkova Y.O., Sharipova L.A. // Морфология. – 2004. – Т. 125. – № 1. – С. 7-11.

5. Исследование эмбриотоксического действия наночастиц диоксида титана на крыс / Шарафутдинова Л.А., Хисматуллина З.Р., Даминов М.Р., Валиуллин В.В. // Морфологические ведомости. – 2017. – Т. 25. – № 3. – С. 37-42.

6. Нейротоксические эффекты наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Федорова А.М., Башкатов С.А., Синельников К.Н., Валиуллин В.В. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т. 15. – № 1. – С. 87-95.

7. Морфологические характеристики гиппокампа крыс на фоне воздействия наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Валиуллин В.В. // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13. – № 3-4. – С. 104-107.

8. Структурно-функциональная характеристика сперматогенного эпителия крыс в условиях воздействия наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Федорова А.М., Башкатов С.А., Синельников К.Н., Валиуллин В.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166. – № 8. – С. 241-245.

9. Структурные и биомеханические характеристики нейтрофилов крови на фоне воздействия наночастиц диоксида титана (исследование с помощью атомно-силовой микроскопии) / **Шарафутдинова Л.А.**, Замула Ю.С., Хисматуллина З.Р., Даминов М.Р., Валиуллин В.В. // Морфология. – 2018. – Т. – 154. – № 4. – С. 40-45.

10. Влияние наночастиц диоксида титана на структурные особенности гиппокампа крыс / **Шарафутдинова Л.А.**, Валиуллин В.В. // Морфологические ведомости. – 2018. – Т. 26. – № 2. – С. 32-37.

11. Токсическое влияние наночастиц диоксида титана на морфологические характеристики тимуса / **Шарафутдинова Л.А.**, Синельников К.Н., Валиуллин В.В. // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99. – №6. – С. 947-953.

12. Морфофункциональная характеристика семенников крыс на фоне воздействия наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Синельников К.Н., Валиуллин В.В. // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – №6. – С. 293-298.

13. Структурные особенности и чувствительность клеток гиппокампа к эндотелиальному сосудистому фактору роста на фоне интраназального введения наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Валиуллин В.В. // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2018. – Т. 7. – № 4. – С. 94-101.

14. Морфологическая характеристика селезёнки крыс при воздействии на организм наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Валиуллин В.В. // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т.15. – № 6. – С. 830-839.

Другие публикации

15. Медиальное субъядро центрального ядра миндалевидного комплекса мозга: структурно-функциональные параллели / Калимуллина Л.Б., Минибаева З.Р., **Шарипова Л.А.** // Организация и пластичность коры больших полушарий головного мозга: сб. мат. конф. РАМН. М., 2001. — С. 201.

16. Центральное ядро миндалевидного комплекса мозга: цитоархитектоника, нейронная организация и гистофизиология / **Шарипова Л.А.**, Минибаева З.Р. // Базальные ганглии и поведение в норме и при патологии: сб. мат. VIII межд. симп. – СПб., 2002. – С.43.

17. К вопросу о росто-каудальном градиенте в структурно-функциональной организации миндалевидного тела мозга / Калимуллина Л.Б., Ахмадеев А.В., Минибаева З.Р., **Шарипова Л.А.** // Колосовские чтения - 2002: мат-лы IV межд. конф. по функциональной нейроморфологии. – (СПб., 29- 31 мая 2002 г.). – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П.Павлова РАН, 2002. – С.123.

18. Промежуточное субъядро центрального ядра миндалевидного комплекса: особенности структурно-функциональной организации / **Шарипова Л.А.**, Минибаева З.Р., Калимуллина Л.Б. // Пластичность и структурно-функциональная взаимосвязь коры и подкорковых образований мозга: мат-лы Всеросс. конф. – М.: НИИ мозга РАМН, 2003. – С.107.

19. Латеральное субъядро центрального ядра миндалевидного комплекса мозга: особенности структурно-функциональной организации / **Шарипова Л.А.**, Минибаева З.Р., Калимуллина Л.Б. // Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей: мат-лы межд. конф. – СПб.: ВМА, 2004. – С.68-69.

20. Ультрамикроскопические особенности нейронов центрального ядра миндалевидного комплекса мозга / **Шарипова Л.А.**, Минибаева З.Р., Калимуллина Л.Б. // Морфологические ведомости (Москва – Берлин). – 2004. – № 1-2. – С. 46.

21. Ультрамикроскопические особенности глии, сосудов и синапсов центрального ядра миндалевидного тела мозга / **Шарафутдинова Л.А.**, Калимуллина Л.Б., Хисматуллина З.Р. // Мат-лы докл. VIII конгр. междунар. ассоциации морфологов (Орел, 15 сентября 2006). – Морфология. – 2006. – Т.129. – №4. – С. 139.

22. Светлые нейроны центрального ядра миндалевидного тела мозга: ультрамикроскопические особенности / **Шарафутдинова Л.А.**, Минибаева З.Р., Калимуллина Л.Б. // Колосовские чтения – 2006: мат-лы V межд. конф. по функциональной нейроморфологии. – Морфология. – 2006. – Т.129. – №2 – С. 102-103.

23. Особенности гистофизиологии латерального субъядра центрального ядра амигдалы/ **Шарафутдинова Л.А.**, Калимуллина Л.Б., Хисматуллина З.Р. // Мат-лы XX съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – М., 2007. – С.481.

24. Evaluation of morphometric parameters of human neutrophils after exposure to nanodisperse titanium dioxide using AFM / **Sharafutdinova L.A.**, Kamaltdinov I.M., Mavletov M.V., Khismatullina Z.R., Bashkatov S.A. // The Summer Workshop «Dynamics of dispersed systems” in experimental and numerical research on nano-, micro-, meso- and macroscales». – Ufa, 2014. – P. 41.

25. Влияние наночастиц диоксида титана на уровни тревожности и депрессивности крыс / **Шарафутдинова Л.А.**, Юсупов А. Федорова А.М. // Современная нейробиология: достижения, закономерности, проблемы, инновации, технологии: мат-лы Всеросс. конф. – Уфа, 2015. – С. 125.

26. Влияние наночастиц диоксида титана на биохимические показатели крови крыс / Ахматгараева Л. З., Акберова, Багаутдинова А. У., **Шарафутдинова Л. А.** // Тезисы XVIII Междунар. медико-биологической конф. молодых исследователей, посвященной 20-летию медицинского факультета СПбГУ. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2015. — С. 46. [Фундам. наука клин. мед. — 2015. — Т. 18. — С. 46].

27. Ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональный статус животных после внутрижелудочного введения нанодисперсного диоксида титана /**Шарафутдинова Л.А.** // Современная нейробиология: достижения, закономерности, проблемы, инновации, технологии: мат-лы Всеросс. конф. – Уфа, 2015. – С.131.

28. Особенности морфологических изменений печени крыс после внутрижелудочного введения ультрадисперсного диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Мусина Л.А., Хисматуллина З.Р., Башкатов С.А. // Актуальные вопросы экологии человека: сб. науч. ст. Всеросс. науч.-практ. конф. с межд. участием: в 3-х томах. – Уфа, 2015. – С. 246-248.

29. Атомно-силовая микроскопия для оценки функционального состояния нейтрофилов после воздействия наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Гайнитдинова В.В., Камалтдинов И.М. // Modern problem in systemic regulashion physiological functions: 4-th International Interdisciplinary Conference. – М., 2015. – P. 696-698.

30. Атомно-силовая микроскопия в оценке морфологических параметров нейтрофилов после воздействия наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Башкатов С.А., Камалтдинов И.М., Федорова А.М. // Морфология. – 2016. – Т. 149. – № 3. – С. 235-235а.

31. Влияние наночастиц диоксида титана на морфологические характеристики печени крыс / **Шарафутдинова Л.А.**, Хисматуллина З.Р., Башкатов С.А. // Морфология. – 2016. – Т. 149. – № 3. – С. 235-236.

32. Резистентность мембран эритроцитов крыс в условиях длительного воздействия наночастиц диоксида титана / Зайнетдинова А.Т., Шамратова В.Г., **Шарафутдинова Л.А.** // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 12-4 (66). – С. 18-20.

33. Морфофункциональная характеристика семенников крыс в условиях перорального введения нанодисперсного диоксида титана / Валиуллин В.В., **Шарафутдинова Л.А.** // Клеточные технологии –практическому здравоохранению, 2017: сб. науч. работ / под общей редакцией проф. Леонтьева С.Л. – Екатеринбург: Изд-во Вестник Уральской медицинской академической науки, 2017. – С. 124-125.

34. Нейротоксические эффекты наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Федорова А.М., Башкатов С.А., Синельников К.Н., Валиуллин В.В. // Клеточные технологии – практическому здравоохранению, 2017: сб. науч. работ / под общей редакцией проф. Леонтьева С.Л. – Екатеринбург: Изд-во Вестник Уральской медицинской академической науки, 2017. – С. 126.

35. Структурные особенности гиппокампа крыс при воздействии наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.**, Алпарова Э.Ф., Никитин Д.С., Валиуллин В.В. // Нейронаука для медицины и психологии: XIV Межд. Междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия; 30 мая – 10 июня 2018 г.: труды конгресса / под ред. Е.В. Лосевой, А.В. Крючковой, Н.А. Логиновой. – М.: МАКС Пресс, 2018. – С. 529-530.

36. Ультрамикроскопические особенности нейронов головного мозга в условиях воздействия наночастиц диоксида титана / **Шарафутдинова Л.А.** // Морфология. – 2018. – Т.153. – №3. С. 315-315а.

37. Влияние наночастиц диоксида титана на экспрессию кислого глиального фибриллярного белка в головном мозге крыс / **Шарафутдинова Л.А.**, Федорова А.М., Романова А.Р., Валиуллин В.В. // Морфология. – 2018. – Т.153. – №3. – С. 315.

38. Морфофункциональные особенности сперматогенного эпителия семенников крыс в условиях воздействия наночастиц диоксида титана/ Федорова А.М., **Шарафутдинова Л.А.**, Романова А.Р., Валиуллин В.В. // Морфология. – 2018 – Т.153. – №3. – С. 285.

39. **Шарафутдинова Л.А.** Особенности экспрессии GFAP в центральном ядре миндалевидного комплекса мозга на фоне интраназального введения наночастиц диоксида титана// Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: Мат-лы VII межд. науч.-практ. конф. / под ред. Д.З. Шибковой, П.А. Байгужина. – Челябинск, 2018. – С. 83-84.

40. Валиуллин В.В., **Шарафутдинова Л.А.** Морфологические аспекты воздействия наночастиц диоксида титана на репродуктивную систему крыс// Тези науковопрактичної конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи сучасної гістології» до 150річчя кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 45 жовтня 2018, р.Київ, Україна с. Н 57.

Список сокращений

АлАТ – аланинаминотрансфераза
АСМ – атомно-силовая микроскопия
АсАТ – аспартатаминотрансфераза
АФК – активные формы кислорода
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ИСК – извитые семенные канальца
КГ – комплекс Гольджи
МК – миндалевидный комплекс
НЧ – наночастицы
ОС – окислительный стресс
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СЭ – сперматогенный эпителий
ЦЯ – центральное ядро

ЭПС – эндоплазматическая сеть
ЭЭГ – электроэнцефалограмма
CD 68 – маркер макрофагов
c-kit – маркер стволовых клеток
GFAP – маркер астроцитов
Ki-67 – маркер пролиферирующих клеток
p53 – ядерный маркер апоптоза
Р
TiO₂ – диоксид титана
M
A
Ядерный антиген пролиферирующих клеток
F