

## Структурные особенности и чувствительность клеток гиппокампа к эндотелиальному сосудистому фактору роста на фоне интраназального введения наночастиц диоксида титана

Л. А. Шарафутдинова<sup>1</sup>, В. В. Валиуллин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Казань, Россия

**Цель работы:** изучение структурных характеристик и чувствительности клеток гиппокампа крыс к эндотелиальному фактору роста сосудов на фоне интраназального введения наночастиц (НЧ) TiO<sub>2</sub> (рутильная форма, 40–60 нм, ежедневно, 10 мг/кг массы тела животного, 30 дней).

**Материал и методы.** Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар (n=10). При изучении влияния исследуемых НЧ на морфологические характеристики гиппокампа животным опытной группы ежедневно интраназально вводили суспензию НЧ TiO<sub>2</sub> (1.5 мл), крысам контрольной группы – дистиллированную воду в том же объеме. Животных выводили из эксперимента через 30 дней передозировкой диэтилового эфира и извлекали головной мозг для гистологического и электронно-микроскопического исследований. Использованы классические морфологические подходы, метод электронной микроскопии и иммуногистохимическое окрашивание антителами к маркеру чувствительности клеток – рецептору к эндотелиальному сосудистому фактору роста VEGFR-1/Flt-1.

**Результаты.** Установлено, что на фоне интраназального введения НЧ TiO<sub>2</sub> в пирамидном слое CA<sub>1</sub> и CA<sub>3</sub> полях гиппокампа наблюдается снижение плотности нейронов, уменьшение площади ядра и перикариона клеток по сравнению с контролем. Обнаружены ультраструктурные изменения, свидетельствующие о повреждении структур энергетического и белоксинтетического аппаратов нейронов. Иммуногистохимическое исследование выявило повышение чувствительности эндотелиальных клеток сосудов и макроглии гиппокампа экспериментальной группы животных к эндотелиальному фактору роста сосудов.

**Заключение.** Интраназальное введение НЧ TiO<sub>2</sub> приводит к негативным изменениям структурных характеристик зон CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub> гиппокампа, ультрамикроскопических особенностей, а также к повышению чувствительности ряда клеток к VEGF, что свидетельствует об их (НЧ) возможном нейротоксическом эффекте.

**Ключевые слова:** наночастицы диоксида титана, гиппокамп, ультраструктура, VEGFR-1/Flt-1.

© L. A. Sharafutdinova<sup>1</sup>, V. V. Valiullin<sup>2</sup>, 2018

<sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia

<sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Structure Features and Sensitivity of Hippocampal Cells to the Endothelial Vascular Growth Factor Against the Background of Intranasal Administration of Titanium Dioxide Nanoparticles

**The aim:** to study the structural characteristics and sensitivity of rat hippocampal cells to the endothelial growth factor of vessels against intranasal administration of nanoparticles (NP) TiO<sub>2</sub> (rutile form, 40–60 nm, daily, 10 mg/kg animal body weight, 30 days).

**Material and methods.** When studying the effect of the studied NP on the morphological characteristics of the hippocampus, animals of the experimental group were intranasally injected daily with a suspension of NP TiO<sub>2</sub> (10 mg/kg body weight, 30 days), and the rats of the control group received distilled water in the same volume. Animals were removed from the experiment after 30 days of overdose of diethyl ether and the brain was removed for histological and electron microscopic examination. We used classical morphological approaches, electron microscopy and immunohistochemical staining with antibodies to the cell sensitivity marker, the receptor for endothelial vascular growth factor VEGFR-1 / Flt-1. The classical morphological approaches, the method of electron microscopy and immunohistochemical staining with antibodies to the marker of sensitivity of the receptor cells to the endothelial vascular growth factor VEGFR-1/Flt-1 were used.

**Results.** It has been established that against the background of intranasal administration of NP TiO<sub>2</sub> in the pyramidal layer of CA<sub>1</sub> and CA<sub>3</sub> hippocampal fields, the density of neuronal packing decreases, the area of the nucleus and the pericarion of the cells decrease in comparison with the control. Ultrastructural changes were detected, indicating a damage to the structures of the energy and protein synthesis apparatus of neurons. Immunohistochemical study revealed an increase in the sensitivity of vascular endothelial cells and the hippocampal macroglia of the experimental group of animals to the endothelial factor of vascular growth.

**Conclusions.** Intranasal management of NP TiO<sub>2</sub> leads to negative changes in the structural characteristics of the CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub> hippocampal zones, ultramicroscopic features, and also to an increase in the sensitivity of a number of cells to VEGF, which indicates their possible neurotoxic effect.

**Key words:** titanium dioxide nanoparticles, hippocampus, ultrastructure, VEGFR-1/Flt-1.

## Введение

Среди появившихся в последнее время токсикантов серьезное внимание приковано к новым ультрадисперсным формам веществ, полученным с использованием нанотехнологий, к числу которых относят различные материалы и препараты, содержащие наночастицы. Под наночастицами (НЧ) понимают изолированные твердофазные объекты, имеющие отчетливо выраженную границу с окружающей средой, размеры которых во всех трех измерениях составляют от 1 до 100 нм. Ряд уникальных физико-химических свойств НЧ по сравнению с традиционными микро-структурными материалами обуславливает их широкое использование в различных отраслях промышленности и биомедицине. В настоящее время НЧ находят применение в микроэлектронике, энергетике, химической и пищевой, парфюмерно-косметической промышленности, оптике, строительстве, контроле и охране состояния окружающей среды. Исключительные свойства наноматериалов и их биологическая активность могут быть использованы также в фармакологии для адресной доставки лекарственных препаратов, для лечения кардиологических, онкологических и ряда других заболеваний, в генной и молекулярной инженерии.

Среди большого числа наноматериалов на сегодняшний день в наиболее широких масштабах используются НЧ диоксида титана ( $\text{TiO}_2$ ). Однако существует оправданное опасение, что их высокая каталитическая активность может представлять угрозу для здоровья человека. Полученные в последние годы данные о накоплении НЧ  $\text{TiO}_2$  в различных структурах головного мозга крыс и мышей при разных способах введения являются одним из признаков несостоятельности по отношению к ним гематоэнцефалического барьера, что подтверждается результатами многочисленных экспериментальных исследований [5, 18]. Wu и соавт. [16] показали, что даже накожное нанесение НЧ  $\text{TiO}_2$  в течение 60 дней приводило к накоплению НЧ в мозге мышей. Аналогично, аккумуляция НЧ  $\text{TiO}_2$  в ЦНС наблюдалась и при их внутривенном и внутрижелудочном введении мышам [4, 6], при этом они накапливались в гиппокампе животных, приводя к усилению процессов апоптоза клеток и как следствие этого нарушениям пространственной памяти [7]. Другим путем транслокации НЧ в головной мозг является обонятельный тракт, в качестве возможного механизма которой рассматривается эндоцитоз частиц чувствительными нервными окончаниями эпителия дыхательных путей, и в частности обонятельного и тройничного нервов. По мнению многих исследователей, обонятельный тракт может быть критическим порталом проникновения НЧ в ЦНС человека, особенно при их высоких

концентрациях в окружающей среде и воздухе рабочей зоны при длительном воздействии, связанном с профессиональной деятельностью [3, 17]. В совокупности указанные выше данные свидетельствуют о транслокации наночастиц в организм человека и высокой уязвимости к воздействию НЧ глубоких структур головного мозга, и, в частности, гиппокампа, даже за короткое время экспозиции. Согласно данным ряда исследований, нейроны гиппокампа в большей степени по сравнению с клетками других отделов головного мозга чувствительны к действию различных неблагоприятных факторов [11, 12]. Однако причины такой уязвимости к воздействию НЧ  $\text{TiO}_2$  этой структуры головного мозга и механизмы его повреждения под их влиянием исследованы не в полной мере, что в большей степени касается изменений на ультраструктурном уровне.

Для нормальной деятельности различных структур ЦНС важнейшим фактором является их кровоснабжение. Структурно-функциональные характеристики микроциркуляторного русла головного мозга напрямую зависят от чувствительности ряда клеток к обеспечивающим ангиогенез гуморальным факторам. Одним из таких ключевых факторов является эндотелиальный сосудистый фактор роста (VEGF) – специфический митоген, который индуцирует ангиогенез, участвует в кроветворении, регуляции васкулогенеза [13]. Этот белок является мощным медиатором проницаемости сосудов в норме и при патологии, поскольку является частью системы, отвечающей за восстановление подачи кислорода к тканям в ситуации, когда циркуляция крови недостаточна [2]. Под влиянием VEGF происходит пролиферация и миграция эндотелиоцитов с образованием незрелых кровеносных сосудов, а в дальнейшем этот ростовой фактор способствует выживанию эндотелиальных клеток, ингибируя апоптоз, что, в конечном счете обеспечивает «созревание» капилляров. Значение VEGF для формирования нормальной сосудистой системы в эмбриогенезе столь велико, что повреждение даже одной аллели гена VEGF-A приводит к внутриутробной гибели плода [13]. Помимо участия в регуляции ангиогенеза, во взрослом организме, заметную роль начинают играть и «неэндотелиальные» биологические эффекты VEGF. Исследования последних лет подтверждают его влияние на целый ряд клеток, в том числе и на нейроны. Обнаружено, что VEGF способствует выживанию нейронов при различных патологиях ЦНС, таких как инсульт и нейродегенеративные заболевания, а также после нейротравм [1].

Таким образом, VEGF в настоящее время рассматривается и как митоген, который способствует пролиферации эндотелиальных клеток, и как нейротрофический и нейропро-

текторный фактор, стимулирующий нейрогенез и рост аксонов как в периферической, так и в центральной нервной системе.

Все выше сказанное свидетельствует о том, что существует тесная взаимосвязь нейрогенеза и ангиогенеза, опосредованная физиологическими функциями и состоянием рецепторов VEGF в головном мозге. Однако до сих пор нет ясной картины тканевого распределения рецепторов к VEGF в головном мозге крыс как у интактных крыс, так и при воздействиях различных наноматериалов. Известно, что наивысшей константой связывания с VEGF обладает рецептор VEGFR-1/Flt-1, который мы и использовали в качестве маркера для иммуногистохимического изучения чувствительности клеток гиппокампа к этому гуморальному фактору.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния интраназального введения НЧ  $TiO_2$  на структурные, ультрамикроскопические и иммуногистохимические особенности гиппокампа крыс, а также исследовании чувствительности клеток гиппокампа к эндотелиальному фактору роста сосудов.

#### Материал и методы исследования

Объектом исследования являлись половозрелые самцы крыс линии Wistar массой 170–210 г ( $n=20$ ). Животных контрольной ( $n=9$ ) и опытной групп ( $n=10$ ) содержали в одинаковых условиях вивария на стандартном сбалансированном рационе, при свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции с животными выполнялись согласно приказу МЗ СССР «О гуманном обращении с экспериментальными животными» № 755 от 12 августа 1977 г. в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук» (протокол №2 от 25.04.2016). В работе использовалась дисперсия диоксида титана (рутильная форма, 40–60 нм), полученная разведением порошка  $TiO_2$  в дистиллированной воде. Агрегацию наночастиц предотвращали обработкой суспензии нанодисперсного  $TiO_2$  в ультразвуковой ванне. Распределение частиц  $TiO_2$  по размерам определяли на анализаторе размеров частиц Shimadzu SALD-7101 (Shimadzu): спектральное разрешение 1 нм, диапазон от 10 нм до 300 мкм, методом лазерной дифракции (УФ-лазер, длина волны излучения 375 нм). Изучали влияния ежедневного интраназального введения крысам в течение 30 дней НЧ  $TiO_2$  (10 мг/кг массы тела) на структурные, ультраструктурные и иммуногистохимические характеристики гиппокампа крыс.

Животных выводили из эксперимента на 30-й день опыта под эфирным наркозом. Для гистологического и иммуногистохимического анализа мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Из парафиновых блоков готовили фронтальные срезы толщиной 5–6 мкм на микротоме LEICA 4RM 2145 (Германия), окрашивали крезилом фиолетовым по Нислю. Исследование областей  $CA_1$  и  $CA_3$  гиппокампа контрольной и опытной групп животных осуществляли с помощью светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Подсчитывали основные морфометрические параметры – плотность нейронов на  $0.001 \text{ мм}^3$ , средние площади ядра и перикариона нейронов. Выявление рецепторов к VEGF – VEGFR-1/Flt-1 осуществлялось с помощью иммуногистохимического метода, согласно протоколу производителя, с использованием поликлональных антител (Novus Biologicala, USA) и универсальной системы вторичной детекции для визуализации. Окрашивание проводили в гистостейнере Leica Bond Max (Leica, Германия). Срезы докрасивали гематоксилином и заключали в балзам. Подсчитывали количество Flt-1-иммунопозитивных клеток в одном поле зрения при увеличении в 400 раз. Фотографирование проводили на микроскопе AxioImager Z1, оснащенном фотонасадкой ProgRes C3 и программой анализа изображений Axiovision Release 4.6 (C.Zeiss, Германия).

Для электронно-микроскопического изучения под контролем микроскопа МБС-10 (ЛОМО, Россия) у животных выделяли гиппокамп ( $n=6$ ). Кусочки тканей фиксировали в растворе 2.5% глутарового альдегида на фосфатном буфере Миллонига (рН 7.2–7.4) с дофиксацией в 1% растворе  $OsO_4$ , обезживали и заливали в смесь смол Эпон-812 по общепринятой методике. Ультратонкие срезы, полученные с помощью ультратома EM UC 7 (Leica, Германия), контрастировали 2% водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963), изучали в трансмиссионном микроскопе «JEM-1011» (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. На микрофотографиях проводили анализ структуры нейронов.

Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ STATISTICA V.7.0 ("StatsoftInc", США). Анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределение признаков в группах являлось нормальным,

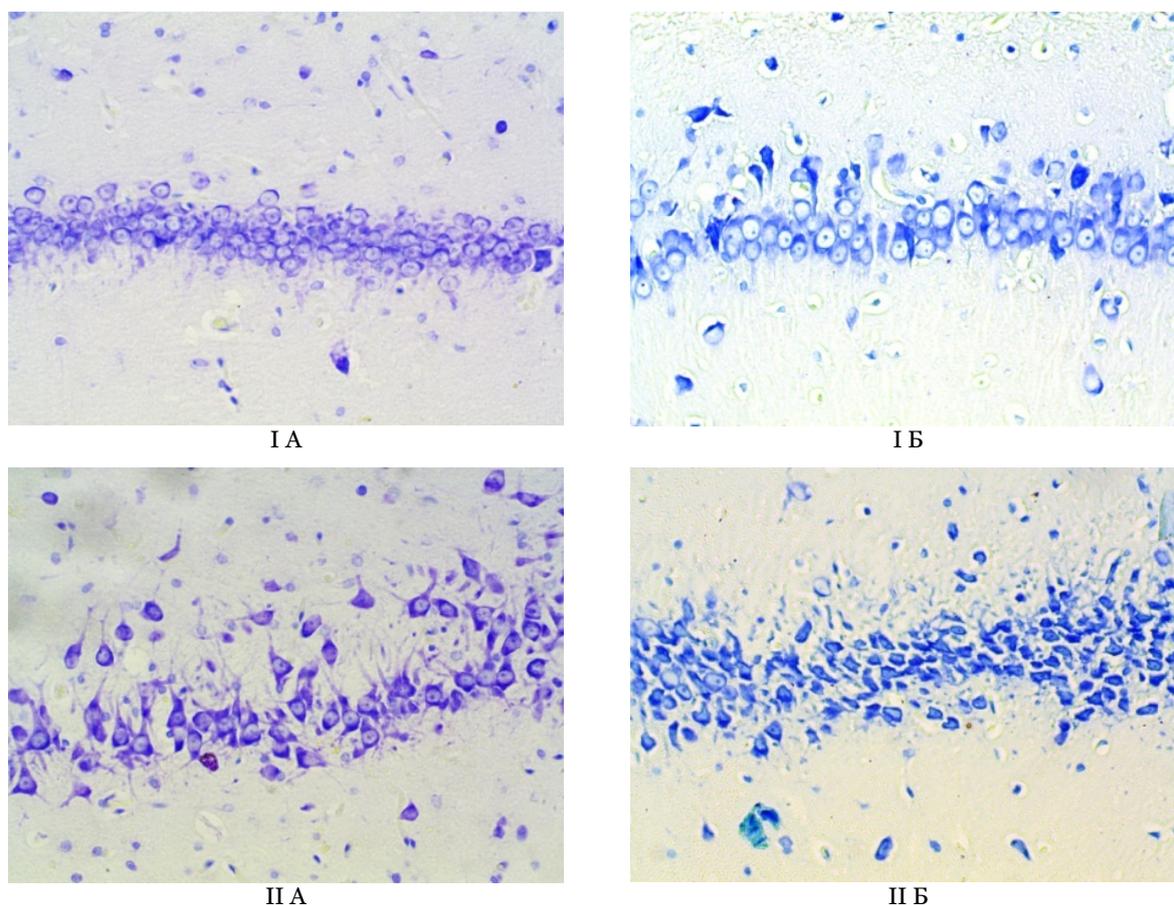


Рис. 1. Пирамидный слой  $CA_1$  (I) и  $CA_3$  (II) полей гиппокампа крысы контрольной группы (A) и после воздействия НЧ  $TiO_2$  (Б). Окраска крезильовым фиолетовым по Ниссля. Ув. 400.

сравнительный анализ групп проводился с помощью параметрических методов (t-критерий Стьюдента). Количественные данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – выборочное среднее,  $m$  – стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

### Результаты и их обсуждение

При исследовании препаратов, окрашенных по методу Ниссля, установлено, что в гиппокампе интактных животных сохранялась хорошо описанная в специальной литературе топография клеточных слоев и зон, характерная для этой структуры (рис. 1, IA). Пирамидный слой зоны  $CA_1$  гиппокампа у таких животных представлял собой область плотно расположенных нейронов традиционной пирамидной формы, в которых четко визуализировались ядро и ядрышко. Глиальные клетки располагались чаще по периферии пирамидного слоя и реже встречались среди плотно расположенных нейронов. При изучении поля  $CA_3$  гиппокампа контрольной группы животных обнаружено, что основные клеточные элементы хорошо были выражены (рис. 1, IIA). Определялись крупные, редко расположенные нейроны с четко выраженными контурами ядра и ядрышка, а также хорошо прослеживались равномерно распре-

ленные клетки глии. Определяемая визуально разница в плотности расположения и количестве нейронов в данных областях гиппокампа подтверждалась данными морфометрического исследования (табл. 1).

В пирамидном слое зоны  $CA_1$  гиппокампа крыс на фоне интраназального введения НЧ  $TiO_2$  (рис. 1, IB) наблюдались признаки деструктивных изменений, которые выражались появлением полиморфности размеров нейронов, приобретении ими веретеновидной формы и резкой гиперхромии цитоплазмы. Нейроны пирамидного слоя располагались неравномерно, компактность их размещения отсутствовала, между клетками наблюдались пустоты и кроме того обнаруживалось увеличение размеров межклеточного пространства, а вокруг нейронов выявлялись очаги глиоза. Наличие структурных нарушений описываемой области гиппокампа у животных экспериментальной группы подтверждалось и изменениями морфометрических параметров этой структуры мозга (табл.). Так, выявлено уменьшение плотности расположения нейронов пирамидного слоя поля  $CA_1$  гиппокампа на 47.45% и снижение средней площади ядра (на 30.89%) и перикариона (на 18.08%) нейронов по сравнению с контрольной группой животных ( $p < 0.05$ ).

В пирамидном слое зоны  $CA_3$  гиппокампа крыс опытной группы отмечалось зна-

**Морфометрические параметры нейронов пирамидного слоя полей CA<sub>1</sub> и CA<sub>3</sub> гиппокампа крыс контрольной группы и после интраназального введения НЧ TiO<sub>2</sub>**

Изучаемый показатель	Контроль		Опыт	
	CA <sub>1</sub>	CA <sub>3</sub>	CA <sub>1</sub>	CA <sub>3</sub>
Плотность нейронов на 0.001 мм <sup>3</sup>	136.01±19.45	89.05±16.70	88.56±18.97*	68.42±16.42*
Средняя площадь перикариона нейронов, мкм <sup>2</sup>	93.38±15.33	122.57±34.13	76.50±35.77*	66.12±33.28*
Средняя площадь ядра нейронов, мкм <sup>2</sup>	55.17±9.7	47.68±9.66	38.13±18.6*	35.95±22.10*

Примечание: \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента для независимых выборок,  $p < 0.01$ ).

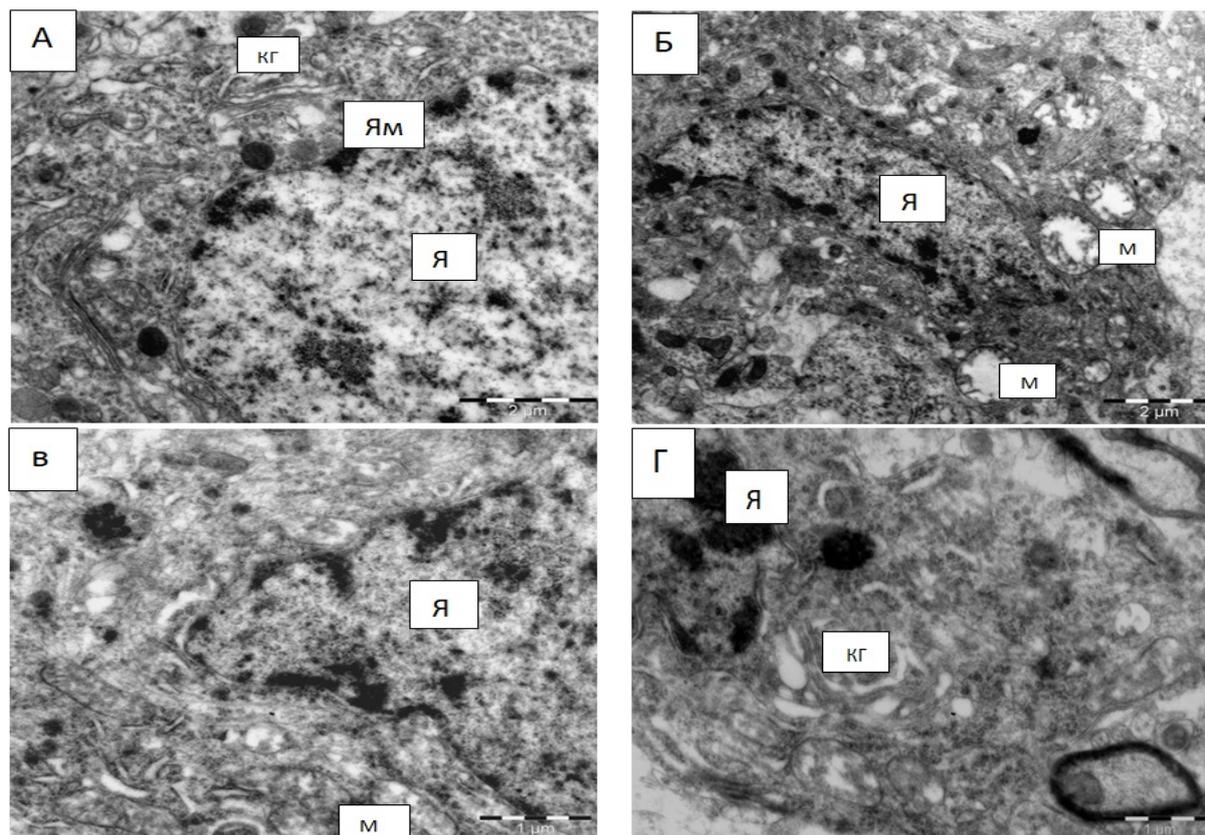


Рис. 2. Ультраструктура нейронов гиппокампа контрольной группы (А) и опытной (Б-Г) групп животных. Электронная микрофотография. Обозначения: Я – ядро, Ям – ядерная мембрана, КГ – комплекс Гольджи, М – митохондрия.

чительное увеличение числа нейронов с признаками дегенерации (рис. 1, II Б), большинство из которых приобретали вытянутую веретеновидную форму и содержали темное пикнотическое ядро с отсутствием ядрышка. Выявлены нарушения citoархитектоники пирамидного слоя, заключающиеся в исчезновении нейронов в ряде участков и снижении удельной плотности их расположения на 20.63% по сравнению с интактными животными (табл.). При морфометрическом исследовании области CA<sub>3</sub> гиппокампа установлено уменьшение средней площади ядра и перикариона нейронов пирамидного слоя относительно контрольной группы животных на 24.6 и 46.06% соответственно.

Обнаруженные нами структурные изменения гиппокампа возможно обусловлены развивающимся в этой области мозга воспа-

лительным ответом на воздействие НЧ, который, по мнению многих авторов, является одним из важных механизмов проявления нейротоксичности НЧ TiO<sub>2</sub>. Так, ранее было показано, что НЧ TiO<sub>2</sub> вызывают воспалительную реакцию в мозге мышей и повышение уровня воспалительных цитокинов, высвобождаемых клетками активированной микроглии. Причем в этих условиях была обнаружена повышенная пролиферативная активность клеток как макро-, так и микроглии и некроз нервной ткани в гиппокампе [14].

При электронно-микроскопическом исследовании в нейронах гиппокампа интактных животных хорошо визуализировались все входящие в состав ядра и цитоплазмы структуры (рис. 2А). Ядро имело сферическую форму и характеризовалось наличием на своей поверхности незначительных инвагинаций

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

Исследование ультраструктурных особенностей гиппокампа экспериментальной группы животных показало, что среди нейронов с неизменной структурой встречались и отдельные клетки с признаками дегенерации (рис. 2 Б–Г). В перикарионе таких нейронов отмечалось просветление матрикса цитоплазмы, значительное уменьшение числа свободных рибосом и полисом, расширение цистерн ЭПС. Обращало внимание заметное визуально определяемое уменьшение объема клеток. Профиль ядра становился вытянутым в медио-латеральном направлении, а контуры ядра имели сложный рельеф поверхности за счет многочисленных впячиваний. Гетерохроматин был образован скоплениями гранул различных по величине и плотности расположения. Аппарат Гольджи визуализировался редко или представлял собой расширенные цистерны без признаков синтетической деятельности. Митохондрии в перикарионах нейронов набухшие, распределены по цитоплазме неравномерно. Целостность крист митохондрий, внешней и внутренней мембраны часто была нарушена. В нейронах определялись вакуоли и значительное число липофуциновых гранул.

Таким образом, проведенные нами электронно-микроскопические исследования гиппокампа показали, что на фоне введения НЧ  $TiO_2$  определяются ультраструктурные изменения нейронов, свидетельствующие о повреждении их энергетического аппарата, что проявляется в разрушении наружных мембран митохондрий и значительной деструкции крист. Кроме того, в нейронах гиппо-

кампа экспериментальной группы животных резко увеличивается просвет цистерн гранулярной эндоплазматической сети, уменьшается число рибосом, отмечается разрыхление ядерной оболочки и наличие множественных инвагинаций в ней, что в совокупности указывает на негативные реактивные изменения структур белоксинтетического аппарата этих клеток. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что суммарный эффект воздействия НЧ  $TiO_2$  на клетки гиппокампа приводит к развитию деструктивных изменений.

Полученные данные об ультраструктурных перестройках гиппокампа на фоне воздействия НЧ  $TiO_2$  хорошо согласуются с результатами других исследований. Так, Long и др. [9, 10] в своих исследованиях *in vitro* впервые показали, что НЧ  $TiO_2$  могут индуцировать дозозависимое повышение уровня  $H_2O_2$  в клетках BV2 (иммортилизованной клеточной линии микроглии мозга), в которых с помощью просвечивающей электронной микроскопии были обнаружены набухшие митохондрии, что указывает на нарушение их функции и, следовательно, энергетического обмена. Подобные эффекты были обнаружены Wang и др. и при исследованиях *in vivo* [15]. При различных способах введения крысам НЧ  $TiO_2$  наблюдалось повышение уровней активных форм кислорода, малонового диальдегида, подавление синтеза эндогенных антиоксидантов – аскорбатпероксидазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [8, 14, 19]. Таким образом, НЧ  $TiO_2$  способны вызвать дисбаланс между процессами образования и ликвидации свободных радикалов: повышенное производство активных форм кислорода, индуцированное воздействием НЧ, превосходит способности биологических антиоксидантов противостоять токсическому окислительному стрессу, что в конечном счете приводит к дисфункциям в ЦНС.

Как уже отмечалось выше уровень васкуляризации – важнейших фактор функционирования всех клеток нервной ткани. Новообразования и рост сосудов поддерживаются целым рядом гормональных факторов, к которым вовлечены в эти процессы клетки обладают чувствительностью, и одним из таких факторов является VEGF. Мы исследовали экспрессию рецептора к VEGF – VEGFR-1 (Flt-1) в различных зонах гиппокампа контрольной и опытной групп животных. Результаты качественной оценки содержания иммунопозитивных клеток показали, что в гиппокампе интактных животных Flt-1-позитивное окрашивание наблюдалось как в нейронах и глиальных элементах, так и в эндотелиальных клетках сосудов (рис. 3).

При сравнительном анализе среднего числа иммунопозитивных клеток в гиппокампе головного мозга животных, подвергнутых воздействию НЧ  $TiO_2$ , было выявлено сниже-

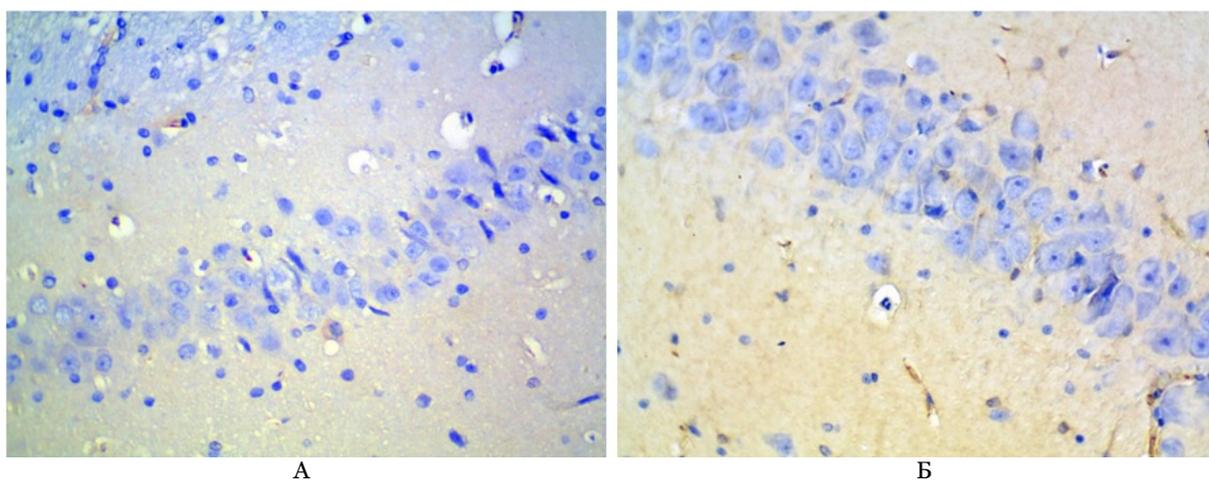


Рис. 3. Экспрессия VEGFR-1 в поле CA<sub>3</sub> гиппокампа мозга крыс контрольной (А) и экспериментальной (Б) групп животных. Ув. 400.

ние числа нейронов, экспрессирующих VEGFR-1 по сравнению с группой интактных животных. В то время как в клетках глии и в эндотелиальных клетках сосудов гиппокампа опытной группы иммунопозитивная реакция была значительно выше в сравнении с этим показателем у контрольной группы животных.

### Заключение

В совокупности на фоне воздействия НЧ TiO<sub>2</sub> в гиппокампе крыс происходит нарушение цитоархитектоники, повышение чувствительности ряда клеток к VEGF наряду с дегенеративными изменениями нейронов, заключающимися в повреждении их белоксинтетического и энергетического аппаратов, что позволяет констатировать наличие компенсаторных реакций в этой области мозга, сопровождаемых активацией процессов ангиогенеза.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Рославцева В. В., Салмина А. Б., Прокопенко С. В., Пожиленкова Е. А., Кобаненко И. В., Резвицкая Г. Г. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в регуляции развития и функционирования головного мозга: новые молекулы-мишени для фармакотерапии. Биомедицинская химия. 2016; 62 (2): 124–133.
2. Тьрсина Е. Г., Никулицкой С. И. Роль регуляторной VEGF/ VEGF-R1-системы в опухолевом ангиогенезе (обзор литературы). Онкогинекология. 2015; 4: 4–12.
3. Фатхутдинова Л. М., Халиуллин Т. О., Залялов Р. Р., Ткачев А. Г., Бирч М. Э., Шведова А. А. Гигиеническая оценка аэрозоля многослойных углеродных нанотрубок в производственных условиях. Российские нанотехнологии. 2016; 11 (1–2): 85–90.
4. Cho W. S., Kang B. C., Lee J. K., Jeong J., Che J. H., Seok S. H. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. Part Fibre Toxicol. 2013; 10(9).
5. Disdier C., Devoy J., Cosnefroy A., Chalansonnet M., Herlin-Boime N., Brun E. Tissue biodistribution of intravenously administrated titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat. Part Fibre Toxicol. 2015; 12:27. doi: 10.1186/s12989-015-0102-8.
6. Geraets L., Oomen A. G., Krystek P., Jacobsen N. R., Wallin H., Laurentie M., Verharen H. W., Brandon E. F., de Jong W. H. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. Part Fibre Toxicol. 2014; 11:1. doi: 10.1186/1743-8977-11-30.
7. Hu R. P., Zheng L., Zhang T. et al. Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. J. Hazard Mater. 2011; 191(1–3): 32–40.
8. Krawczyńska A., Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Lankoff A., Herman A. P., Oczkowski M., Królikowski T., Wilczak J., Wojewódzka M., Kruszewski M. Food Chem Toxicol. 2015; 85: 96–105. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.005.
9. Long T. C., Saleh N., Tilton R. D., Lowry G. V., Veronesi B. Environ Sci Technol. 2006; 40:4346–4352. doi: 10.1021/es060589n.
10. Long T. C., Tajuba J., Sama P., Saleh N., Swartz C., Parker J., Hester S., Lowry G. V., Veronesi B. Environ Health Perspect. 2007; 115: 1631–1637. doi: 10.1289/ehp.10216.
11. Mushtaq G., Khan J. A., Joseph E., Kamal M. A. Nanoparticles, Neurotoxicity and Neurodegenerative Diseases. Curr Drug Metab. 2015; 16 (8): 676–684.
12. Sharafutdinova L. A., Valiullin V. V. Morphological Characteristics of Hippocampus under the Action of Titan Dioxide Nanoparticles in Rats. Nanotechnologies in Russia, 2018; 13 (3–4): 211–214.
13. Shibuya M. et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family// Oncogene. 1990; 5: 519–524.
14. Shrivastava R., Raza S., Yadav A., Kushwaha P., Flora S. J. S. Drug Chem Toxicol. 2014; 37: 336–347. doi: 10.3109/01480545.2013.866134.
15. Wang J., Chen C., Liu Y., Jiao F., Li W., Lao F., Li Y., Li B., Ge C., Zhou G., Gao Y., Zhao Y., Chai Z. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase

- and rutile crystal phases. *Toxicol Lett.* 2008; 183 (1–3): 72–80.
16. Wu J. H., Liu W., Xue C. B., Zhou S. C., Lan F. L., Bi L., Xu H., Yang X., Zeng F. D. Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett.* 2009; 191(1): 1–8. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.05.020.
  17. Yang Z., Liu Z.W., Allaker R. P., Reip P., Oxford J., Ahmad Z., Ren G. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of the Royal So.* 2010; 17(4): 411–422.
  18. Yeh T. K., Chen J. K., Lin C. H., Yang M. H., Yang C. S., Chung S. Y., Fong I. C., Jinn J. P., Mei Y. W., Wan H. C., Ming H. T., Hui T. T. Kinetics and tissue distribution of neutron-activated zinc oxide nanoparticles and zinc nitrate in mice: effects of size and particulate nature. *Nanotechnology.* 2012; 23(8).
  19. Yin J., Kang C., Li Y., Li Q., Zhang X., Li W. *Toxicol Res (Cambridge, U K).* 2014; 3: 367–374.
  7. Hu R.P., Zheng L., Zhang T. et al. Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Hazard Mater.* 2011; 191(1–3): 32–40.
  8. Krawczyńska A., Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Lankoff A., Herman A. P., Oczkowski M., Królkowski T., Wilczak J., Wojewódzka M., Kruszewski M. *Food Chem Toxicol.* 2015; 85: 96–105. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.005.
  9. Long T. C., Saleh N., Tilton R. D., Lowry G. V., Veronesi B. *Environ Sci Technol.* 2006; 40:4346–4352. doi: 10.1021/es060589n.
  10. Long T. C., Tajuba J., Sama P., Saleh N., Swartz C., Parker J., Hester S., Lowry G. V., Veronesi B. *Environ Health Perspect.* 2007; 115: 1631–1637. doi: 10.1289/ehp.10216.
  11. Mushtaq G., Khan J.A., Joseph E., Kamal M.A. Nanoparticles, Neurotoxicity and Neurodegenerative Diseases. *Curr Drug Metab.* 2015; 16 (8): 676–684.
  12. Sharafutdinova L.A., Valiullin V.V. Morphological Characteristics of Hippocampus under the Action of Titan Dioxide Nanoparticles in Rats. *Nanotechnologies in Russia*, 2018; 13 (3–4): 211–214.
  13. Shibuya M. et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family// *Oncogene.* 1990; 5: 519–524.
  14. Shrivastava R., Raza S., Yadav A., Kushwaha P., Flora S. J S. *Drug Chem Toxicol.* 2014; 37: 336–347. doi: 10.3109/01480545.2013.866134.
  15. Wang J., Chen C., Liu Y., Jiao F., Li W., Lao F., Li Y., Li B., Ge C., Zhou G., Gao Y., Zhao Y., Chai Z. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett.* 2008; 183 (1–3): 72–80.
  16. Wu J.H., Liu W., Xue C.B., Zhou S.C., Lan F.L., Bi L., Xu H., Yang X., Zeng F.D. Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett.* 2009; 191(1): 1–8.
  17. Yang Z., Liu Z.W., Allaker R. P., Reip P., Oxford J., Ahmad Z., Ren G. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of the Royal So.* 2010; 17(4): 411–422.
  18. Yeh T.K., Chen J.K., Lin C.H., Yang M.H., Yang C.S., Chung S.Y., Fong I. C., Jinn J. P., Mei Y.W., Wan H.C., Ming H.T., Hui T. T., P L. Kinetics and tissue distribution of neutron-activated zinc oxide nanoparticles and zinc nitrate in mice: effects of size and particulate nature. *Nanotechnology.* 2012; 23(8).
  19. Yin J, Kang C, Li Y, Li Q, Zhang X, Li W. *Toxicol Res (Cambridge, U K).* 2014; 3: 367–374.

### References

1. Roslovtsev V. V., Salmina A. B., Prokopenko S. V., Pozhilenkova E. A., Kobanenko I. V., Razvitka G. G. Sosudisty endotelial'nyi faktor rosta v regulatsii razvitiya i funktsionirovaniya golovno mozga: novye molekuly-misheni dlya farmakoterapii [Vascular endothelial growth factor in the regulation of the development and functioning of the brain: new targets for drug therapy]. *Biomedical chemistry.* 2016; 62 (2): 124–133 (in Russian).
2. Tursina E. G., nikulinskaya S. I. Rol' regulatornoj VEGF/ VEGF-R1-sistemy v opukholevom angiogeneze (obzornyye literatury) [Regulatory role of the VEGF/is expressed by vegfr1-system in tumor angiogenesis (literature review)]. *Gynecologic Oncology.* 2015; 4: 4–12 (in Russian).
3. Fatkhutdinova L. M., Khaliullin, T. O., zalyalov R. R., Tkachev A. G., Beers M. E., Shvedova A. A. Gigienicheskaya otsenka aerolya mnogoslownykh uglerodnykh nanotrubok v proizvodstvennykh usloviyakh [Hygienic evaluation of aerosol multi-walled carbon nanotubes in a production environment]. *Russian nanotechnology.* 2016; 11 (1–2): 85–90 (in Russian).
4. Cho W.S., Kang B.C., Lee J.K., Jeong J., Che J.H., Seok S.H. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10(9).
5. Disdier C., Devoy J., Cosnefroy A., Chalansonnet M., Herlin-Boime N., Brun E. Tissue biodistribution of intravenously administrated titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat. *Part Fibre Toxicol.* 2015; 12:27.
6. Geraets L., Oomen A.G., Krystek P., Jacobsen N.R., Wallin H., Laurentie M., Verharen H.W., Brandon E.F., de Jong W.H. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2014; 11:1. doi: 10.1186/1743-8977-11-30.

### Сведения об авторах

**Шарафутдинова Люция Ахтямовна** – канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет». 450076, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, дом 32. E-mail: sharafla@yandex.ru

**Валиуллин Виктор Владимирович** – д-р биол. наук, профессор кафедры гистологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России. Поступила в редакцию 29.08.2018 г.

*Для цитирования:* Шарафутдинова Л.А., Валиуллин В.В. Структурные особенности и чувствительность клеток гиппокампа к эндотелиальному сосудистому фактору роста на фоне интраназального введения наночастиц диоксида титана. *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2018; 7(4): 94–101. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-4-94-101.

*For citation:* Sharafutdinova L.A., Valiullin V.V. Structure features and sensitivity of hippocampal cells to the endothelial vascular growth factor against the background of intranasal administration of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2018; 7(4): 94–101. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-4-94-101.