

УДК 616.8-092

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

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗЁНКИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА

<sup>1</sup> Башкирский государственный университет,  
г. Уфа, Республика Башкортостан, Российская Федерация;<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет,  
г. Казань, Республика Татарстан, Российская Федерация*L.A. Sharafutdinova<sup>1</sup>, V.V. Valiullin<sup>2</sup>*

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RATS SPLEEN WHEN EXPOSED TO THE NANOPARTICLES OF TITANIUM DIOXIDE

<sup>1</sup> Bashkir State University, Ufa, Russian Federation;<sup>2</sup> Kazan Medical University, Kazan, Russian Federation

**Резюме. Введение.** Среди применяемых в настоящее время наноматериалов широко используются наночастицы (НЧ) диоксида титана (TiO<sub>2</sub>). Они обладают рядом потребительских достоинств, связанных с хорошей фотокаталитической активностью, высокой химической и термической стабильностью и относительно невысокой стоимостью. Однако быстрый рост числа публикаций о токсическом воздействии НЧ TiO<sub>2</sub> на различные органы и ткани свидетельствует о высоком уровне интереса исследователей к биологической безопасности их использования. Это обусловлено в первую очередь тем, что последствия повреждения различных клеточных типов организма НЧ TiO<sub>2</sub> и причины такой уязвимости к их воздействию практически не исследованы. **Цель работы:** Изучение морфофункциональных изменений селезенки крыс при длительном пероральном воздействии НЧ TiO<sub>2</sub>. **Материал и методы.** В данной работе с использованием классических морфологических подходов и специфичных маркеров: пролиферации — Ki-67 и макрофагов — CD68 проведено исследование селезенки крыс после ежедневного перорального введения (10 мг/кг массы тела животного, 28 дней) НЧ TiO<sub>2</sub> (рутильная форма, 40-60 нм). Серийные парафиновые срезы селезенки окрашивали гематоксилином-эозином, проводили иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к Ki-67, CD68. **Результаты.** Морфометрический анализ ткани селезенки опытной группы животных выявил увеличение площади, занимаемой белой пульпой; возрастание общего количества лимфоидных узелков, среди которых значительно повышается доля первичных; снижение абсолютного числа клеток на единицу площади в зонах белой пульпы по сравнению с ана-

**Abstract. Introduction.** Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles (NP) are widely used among other modern nanomaterials. They have a number of consumer advantages associated with good photocatalytic activity, high chemical and thermal stability and relatively low cost. However, a rapid increase in the number of publications dedicated to the toxic effects of TiO<sub>2</sub>-NP on various organs and tissues indicates a high level of interest among the researchers in the biological safety of their use. This is primarily due to the fact that the effects of TiO<sub>2</sub>-NP damage to the various cellular types of the body and the reasons of such vulnerability are practically not investigated. **Objective.** To study the morphofunctional changes in the rat spleens after long-term oral exposure to TiO<sub>2</sub>-NP. **Material and methods.** Classical morphological approaches and specific markers: proliferation — Ki-67 and macrophages — CD68 were used in this study. Spleens of rats after daily oral administration (10 mg / kg body weight of the animal, 28 days) of TiO<sub>2</sub>-NP (rutile form, 40-60 nm) were investigated. Serial paraffin sections of the spleen were stained with hematoxylin and eosin. The immunohistochemical staining was performed using antibodies to Ki-67, CD68. **Results.** Morphometric analysis of the spleen tissues of the experimental group of animals revealed an increase in the area occupied by white pulp; an increase in the total number of lymphoid nodules, among which the share of primary lymph nodes considerably increased; a decrease in the absolute number of cells per unit area in the zones of white pulp compared with the similar indices of intact animals. The immunohistochemical study revealed a decrease in the intensity of cell proliferation in all compartments of the spleen and an increase in the number of macrophages in the red pulp in response to the effects of the nanoparticles

логичными показателями интактных животных. Иммуногистохимическое исследование выявило снижение интенсивности пролиферации клеток во всех компартментах селезенки и увеличение числа макрофагов в красной пульпе в ответ на воздействие изучаемых наночастиц. **Заключение.** При пероральном введении НЧ  $\text{TiO}_2$  крысам происходят негативные изменения структурных и иммуногистохимических характеристик селезенки, соответствующие иммунодепрессивному состоянию.

**Ключевые слова:** наночастицы, диоксид титана, селезенка, Ki-67, CD68

under study. **Conclusion.** Oral administration of  $\text{TiO}_2$ -NP lead to negative changes in the structural and immunohistochemical characteristics of the rat spleens, corresponding to the immunodepressive state.

**Keywords:** nanoparticles, titanium dioxide, spleen, Ki-67, CD68

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Шарафутдинова Люция Ахтямовна  
sharafla@yandex.ru

Contact details of the corresponding author:

Lucia A. Sharafutdinova  
sharafla@yandex.ru

Дата поступления 21.12.2018

Received 21.12.2018

Образец цитирования:

Шарафутдинова Л.А., Валиуллин В.В. Морфологическая характеристика селезенки крыс при воздействии на организм наночастиц диоксида титана. Вестник уральской медицинской академической науки, 2018. – Том 15. – № 6. – С. 830–839. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-6-830-839.

For citation:

Sharafutdinova L.A., Valiullin V.V. Morphological characteristics of rat spleens when exposed to titanium dioxide nanoparticles. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2018, Vol. 15, No. 6, pp. 830–839. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-6-830-839 (In Russ).

## Введение

Среди появившихся в последнее время токсикантов серьезное внимание приковано к новым объектам, полученным с использованием нанотехнологий, к числу которых относят различные материалы и препараты, содержащие наночастицы — изолированные твердофазные объекты, имеющие отчетливо выраженную границу с окружающей средой, размеры которых во всех трёх измерениях составляют от 1 до 100 нм. Ряд уникальных физико-химических свойств НЧ, по сравнению с традиционными микроструктурными материалами, обуславливает их широкое использование в различных отраслях промышленности и биомедицине. Вместе с тем, существует оправданное опасение, что их небольшие размеры и очень высокая удельная поверхность (в расчете на единицу массы) и значительная реакционная способность позволяет им беспрепятственно проникать через биологические барьеры, увеличивать продукцию активных форм кислорода, повреждающих внутриклеточные биологические структуры.

Среди применяемых в настоящее время наноматериалов, наиболее широко используются НЧ диоксида титана ( $\text{TiO}_2$ ). Они обладают рядом потребитель-

ских достоинств, связанных с хорошей фотокаталитической активностью, высокой химической и термической стабильностью и относительно невысокой стоимостью, что позволяет использовать их в микроэлектронике, энергетике, химической и пищевой, парфюмерно-косметической промышленности, оптике, строительстве, контроле и охране состояния окружающей среды [1, 2]. Быстрый рост числа публикаций о воздействии НЧ  $\text{TiO}_2$  на различные органы и ткани свидетельствует о высоком интересе исследователей к биологической безопасности их использования [3-5]. Вместе с тем, клеточные основы повреждения различных органов и тканей и причины такой уязвимости к воздействию НЧ практически не исследованы. Неблагоприятное воздействие НЧ  $\text{TiO}_2$  на клетки и ткани человека проявляется как в производственных условиях, где контакт с ними неизбежен, так и в результате преднамеренного использования, связанного с их включением в состав продовольственных, промышленных и фармакологических товаров [6-9].

Еще одним фактором, который следует учитывать при исследовании разнообразных токсических эффектов НЧ  $\text{TiO}_2$ , является способность накапливаться в организме [10-12], а это может привести к отсрочен-

ным во времени проявлениям токсического действия этих соединений. Кроме того, нарушение структуры и функции любого органа, которые обнаруживаются после введения НЧ, могут быть как следствием прямого их воздействия на различные клетки, так и суммарным эффектом повреждения других органов и систем организма.

Одной из наиболее уязвимых и чувствительных к любым токсикантам в организме является иммунная система. Уже хорошо известно, что результатом негативного влияния различных НЧ на иммунную систему человека является угнетение ее многочисленных функций и, как следствие этого, увеличение частоты и тяжести инфекционных заболеваний, а также повышение риска злокачественных новообразований [13-17]. Кроме того, нарушение иммунологических функций организма, вызванное воздействием НЧ, может спровоцировать развитие аллергических и аутоиммунных заболеваний [18]. Одним из центральных звеньев иммунной системы является селезенка, осуществляющая лимфопоэз, дифференцировку лимфоцитов и утилизацию эритроцитов. Ввиду большого количества чувствительных к любым негативным воздействиям различных клеточных типов в селезенке: ретикулярных клеток, макрофагов, дифференцирующихся лимфоцитов, и протекания в этом органе значительного числа разнообразных процессов, неблагоприятное влияние ксенобиотиков неизбежно приведет к угнетению ее функции. Однако клеточные основы воздействия НЧ  $\text{TiO}_2$  на селезенку практически не исследованы, а имеющиеся данные противоречивы.

**Цель работы:** изучение морфофункциональных характеристик селезенки крыс при длительном пероральном воздействии наночастиц диоксида титана.

### Материал и методы

В эксперименте использовали крыс линии Wistar половозрелого возраста массой 210-350 грамм, из которых было сформировано 2 группы: 1-я группа (10 крыс) — интактные животные (контроль); 2-я группа (10 крыс) — ежедневное пероральное введение наночастиц диоксида титана (10 мг/кг массы тела) в течение 30 дней. Для приготовления взвеси НЧ  $\text{TiO}_2$  использовали ультразвуковую ванну. Животных содержали в вентилируемом помещении при температуре 20°C, при световом режиме 12/12 (освещение с 8.00 часов), на стандартном пищевом рационе вивария, при свободном доступе к воде и пище, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Для изучения последствий перорального введения НЧ  $\text{TiO}_2$  изучали структуру селезенки у животных на 30-е сутки после окончания эксперимента. Для гистологи-

ческого исследования селезенку фиксировали в 10% растворе формалина, с последующим обезвоживанием в этаноле возрастающей концентрации, и заливали в парафин. Из парафиновых блоков на санном микротоме изготавливались срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином. Относительное соотношение площадей, занимаемых различными структурно-функциональными зонами селезенки, определяли с помощью микроскопа МИК-МЕД-5 (ЛОМО) с использованием программной оболочки Levenhuk ToupView. В гистологических препаратах селезенки определяли соотношение площади, занимаемой белой и красной пульпой, отдельными структурно-функциональными зонами белой пульпы, долю первичных и вторичных лимфоидных узелков, абсолютное число клеток на единицу площади (100 мкм<sup>2</sup>) в различных зонах белой пульпы селезенки.

С целью идентификации различных клеточных элементов в структурно-функциональных зонах селезенки применяли иммуногистохимический метод окрашивания парафиновых срезов (4-6 мкм) с использованием поликлональных антител, маркера пролиферации клеток — Ki-67 (MKI67), специфичного маркера макрофагов — CD68 (клон ED-1) (SantaCruzBiotechnology, США) и системы визуализации Leica BOND (Novocastra™, Германия), с докраской гематоксилином. Положительную реакцию оценивали по коричневому окрашиванию ядра (для маркера Ki-67) или цитоплазмы (для маркера CD68). Количество клеток, экспрессирующих изучаемые маркеры выражали в виде среднего числа Ki-67 и CD68-иммунопозитивных клеток. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием лицензионного пакета прикладных программ «STATISTICA» v.7.0 (Stat Soft Inc., США). Для всех имеющихся выборок проводили анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение признаков в группах не являлось нормальным, сравнительный анализ групп проводился с помощью непараметрических методов. В случае, если нулевая гипотеза об отсутствии различий отклонялась, проводили парное сравнение групп с использованием непараметрического теста Манна-Уитни. Количественные данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — выборочное среднее,  $m$  — стандартная ошибка средней. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Изучение препаратов, окрашенных гематоксилином эозином, показало, что селезенка крыс контрольной группы имеет типичное строение (рис. 1а). Снаружи она покрыта равномерной по всему периметру капсулой, состоящей из плотной волокнистой соединитель-



ной ткани, эластических волокон и гладкомышечных клеток. От капсулы внутрь селезёнки, перпендикулярно, отходят трабекулы, представленные волокнистой соединительной и гладкой мышечной тканями.

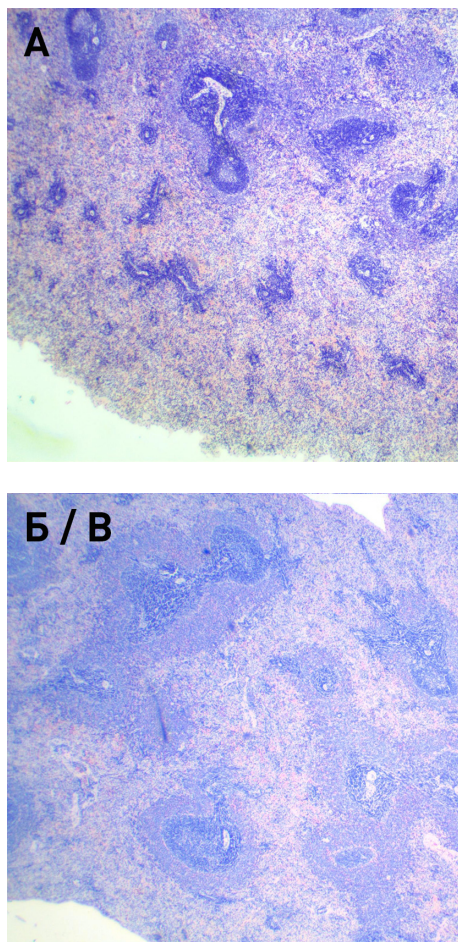


Рисунок 1. Селезенка крысы контрольной (А) и опытной (Б) группы. Окраска гематоксилином-эозином.  $\times 100$

Figure 1. Spleens of the rats from the control (A) and the experimental (B) group. Staining with hematoxylin-eosin.  $\times 100$

Паренхима органа образована ретикулярной тканью и представлена красной и белой пульпой, относительные площади которых составляют  $28,54 \pm 1,06\%$  и  $71,46 \pm 0,93\%$  соответственно. Структурные компоненты красной и белой пульпы хорошо определяются благодаря разной плотности расположения в них клеточных элементов. Белая пульпа включает лимфоидную ткань в виде первичных и вторичных лимфоидных узелков (В-зона), периартериальные лимфоидные влагища (ПАЛВ, Т-зона), окружающие пульпарные артерии и маргинальную зону, относительные площади которых составили  $34,53 \pm 1,04\%$ ;  $14,05 \pm 0,64\%$  и  $50,20 \pm 1,78\%$  соответственно (рис. 2а). Среди лимфоидных узелков преобладают узелки с центрами размножения (герминативные центры), занимающие  $27,70 \pm 0,86\%$  площади среза. Красная пульпа селезен-

ки крыс intactных животных также образована ретикулярной тканью с расположенными в ней форменными элементами крови, которые придают ей такой цвет, макрофагами и содержит большое количество кровеносных сосудов.

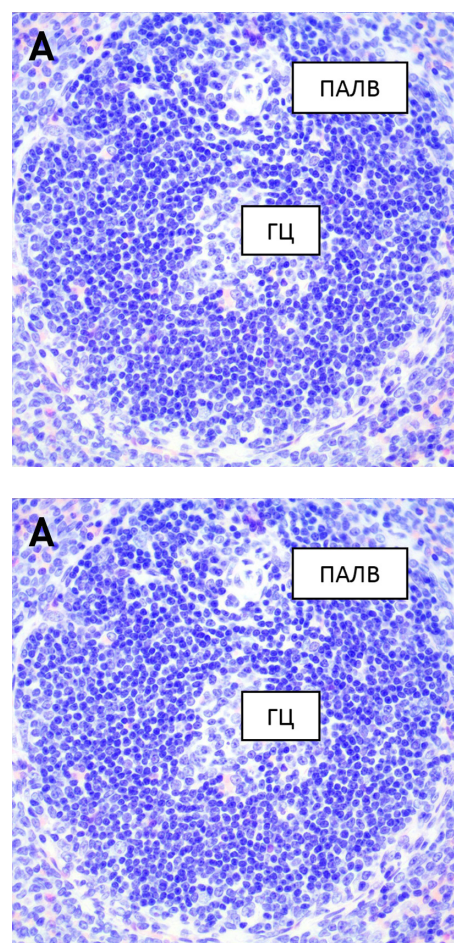


Рисунок 2. Лимфоидный узелок селезенки контрольной (А) и опытной группы (Б) животных. Об.: ГЦ — герминативный центр, ПАЛВ — периартериальное лимфоидное влагище. Окраска гематоксилином-эозином.  $\times 400$

Figure 2. Spleens of the rats from the control (A) and the experimental (B) group. ГЦ — germinal centres, ПАЛВ — periarterial lymphoid sheaths. Staining with hematoxylin-eosin.  $\times 400$

В селезенке животных опытной группы выявляются существенные морфологические изменения по сравнению с intactными животными (рис. 1б). Морфометрический анализ ткани селезенки выявил увеличение площади, занимаемой белой пульпой по сравнению с контролем на  $11,67\%$  ( $p < 0,05$ ). В белой пульпе селезенки крыс экспериментальных животных обнаружено увеличение общего количества лимфоидных узелков на  $47,22\%$  по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы животных ( $p < 0,05$ ). Обнаруживается тенденция к уменьшению на  $8,33\%$  доли вторичных лимфоидных узелков и увеличение на

63% доли первичных, без центров размножения по сравнению с аналогичным показателем интактных животных. Среди вторичных лимфоидных узелков селезенки экспериментальной группы животных увеличилось количество узелков с опустошением герминативных центров, что косвенно свидетельствует об угнетении лимфопоэза (Рис. 2 б). В этих условиях количество лимфобластов в таких центрах было уменьшено и они располагались рыхло: абсолютное число клеток на единицу площади в составе герминативного центра лимфоидных узелков селезенки опытной группы животных уменьшилось на 10,54%, а площадь, занимаемая реактивными центрами увеличилась на 96,26% ( $p<0,05$ ).

Площадь ПАЛВ у опытной группы животных по сравнению с аналогичным показателем селезенки контрольной группы увеличивается на 16,44% ( $p>0,05$ ), однако в них уменьшается на 12,07% ( $p<0,05$ ) плотность расположения клеток на единицу площади, что может косвенно свидетельствовать об уменьшении их поступления из вилочковой железы, где согласно Hong и др. (2017), на фоне введения НЧ  $TiO_2$ , обнаруживаются негативные изменения структурно-функциональных характеристик органа [19].

Нами обнаружено, что в селезенке животных опытной группы на 21,34% увеличивается диаметр центральной артериолы по сравнению с этим показателем интактных животных, а толщина стенки этого сосуда увеличивается на 14,17% ( $p<0,05$ ), что может быть связано с периваскулярным отеком центральных артерий, и как следствие этого, возможно нарушение гемодинамики в органе.

При исследовании мантийной зоны в селезенке экспериментальных животных было выявлено снижение плотности расположения клеток в этой части лимфоидного узелка на 15,27% ( $p<0,05$ ) и уменьшение занимаемой площади на 14,74% ( $p>0,05$ ) по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы животных, что возможно связано с угнетением пролиферации лимфоцитов, вызванного воздействием НЧ  $TiO_2$ .

Площадь маргинальной зоны в селезенке опытных животных уменьшалась незначительно, а абсолютное число клеток, приходящихся на единицу площади, снижалась на 17,54% ( $p<0,05$ ). Снижение плотности расположения клеток в этой зоне, возможно, является следствием уменьшения миграции незрелых лимфоцитов из тимуса в селезенку. Известно, что именно маргинальная зона участвует в иммунном ответе, являясь местом захвата антигенов и иммунных комплексов из крови, здесь происходит кооперация и взаимодействие этих клеток, активация В-лимфоцитов и их дальнейшая дифференцировка в плазматциты [20]. Обнаруженное нами разрежение клеток в селезенке экс-

периментальных животных может в конечном итоге привести к нарушению их взаимодействия с антигенами, дифференцировки В-лимфоцитов, уменьшению числа плазматических клеток, продуцирующих антитела, а, следовательно, к снижению интенсивности гуморального иммунного ответа.

Таблица 1  
Доля Ki67 (%) — иммунопозитивных клеток в различных функциональных зонах селезенки крыс контрольной и опытной групп животных

Table 1  
Percentage (%) of Ki67 — immunopositive cells in various functional zones of the rats spleens in the control and the experimental groups of animals

| Зоны/Zone                             | Контроль/<br>Control | Опыт (30 дней)/ 30 days |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Герминативные центры/germinal centres | 79,29±2,05           | 73,05±1,44*             |
| Мантийная зона/<br>mantle zone        | 7,16±0,51            | 4,56±0,51*              |
| Маргинальная зона/<br>marginal zone   | 21,63±0,85           | 9,17±0,47*              |
| ПАЛВ/ periarterial lymphatic sheaths  | 14,62±0,48           | 8,71±1,51*              |

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

Note: \* — statistically significant differences compared with the control group ( $p<0,05$ ).

Таблица 2  
Доля (%) CD 68 — иммунопозитивных клеток в различных функциональных зонах селезенки крыс контрольной и опытной групп животных

Table 2  
Percentage (%) of CD 68 — immunopositive cells in various functional zones of the rats spleens in the control and the experimental groups of animals

| Зоны/Zone                             | Контроль/<br>Control | Опыт (30 дней)/ 30 days |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Герминативные центры/germinal centres | 2,76±0,55            | 1,05±0,33*              |
| Мантийная зона/<br>mantle zone        | 2,74±1,13            | 0,01±0,00*              |
| Маргинальная зона/<br>marginal zone   | 11,29±0,97           | 3,36±0,77*              |
| ПАЛВ/ periarterial lymphatic sheaths  | 5,10±1,30            | 4,104±0,44              |
| Красная пульпа/ red pulp              | 18,99±0,49           | 25,1±2,92*              |

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

Note: \* — statistically significant differences compared with the control group ( $p<0,05$ ).



Проведенное нами иммуногистохимическое исследование в целом подтвердило данные наблюдения, дополнив их некоторыми деталями морфологических изменений, свидетельствующих об угнетенном состоянии селезенки как органа у животных экспериментальной группы. Так, при иммуногистохимическом анализе пролиферативной активности клеток лимфоидных узелков селезенки (рис. 3) с помощью антител к маркеру пролиферации Ki-67 выяв-

лено снижение пролиферативного потенциала клеток во всех структурно-функциональных зонах органа после воздействия НЧ TiO<sub>2</sub> (табл. 1). Обнаружено, что в герминативных центрах лимфоидных узелков селезенки крыс опытной группы среднее число Ki-иммунопозитивных клеток уменьшилось на 7,89%, в мантийной зоне — на 36,31%, в маргинальной зоне — на 57,61%, а в ПАЛВ — на 40,42%.

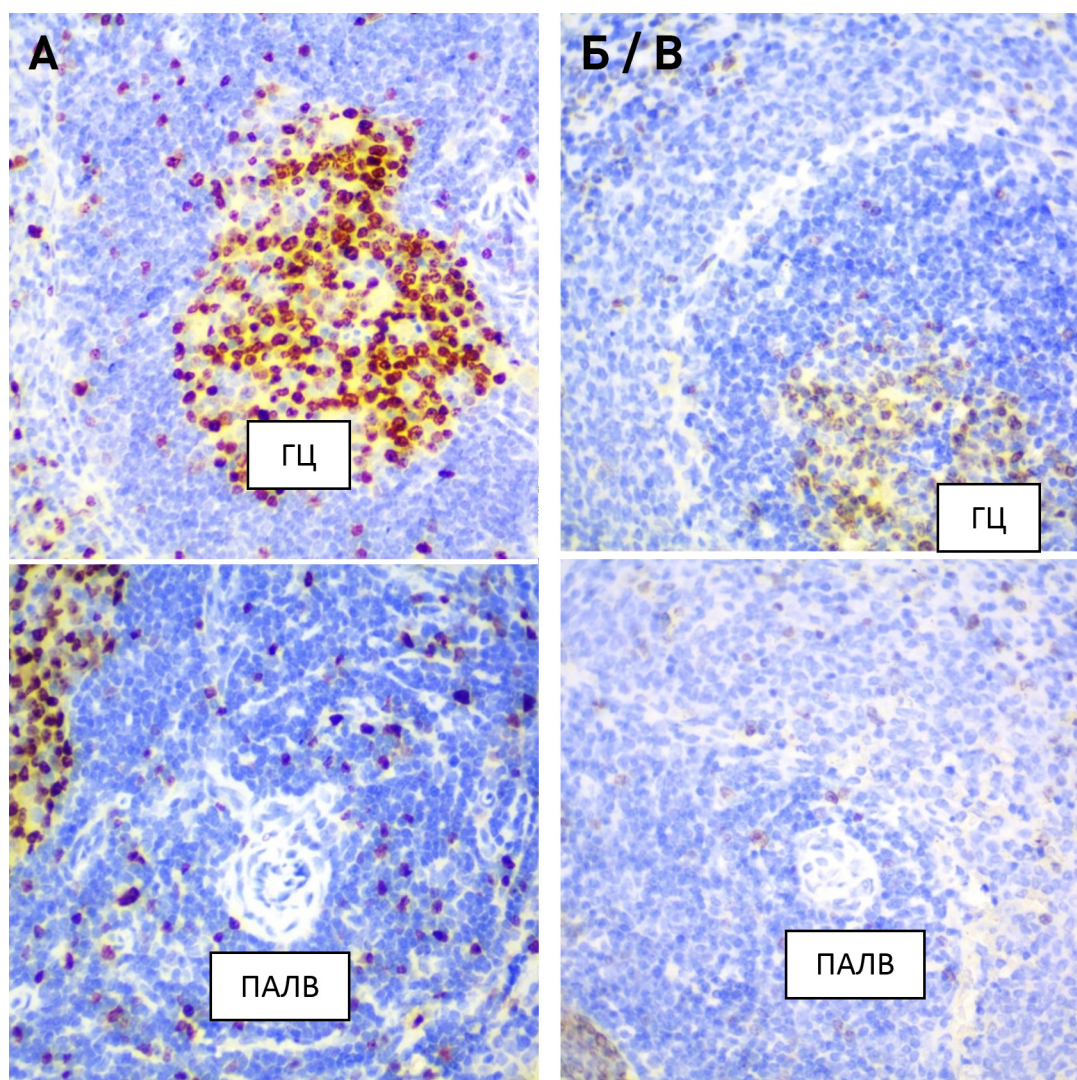


Рисунок 3. Селезенка крысы контрольной (А) и опытной (Б) группы. Об.: ГЦ — герминативный центр лимфоидного узелка, ПАЛВ — периартериальное лимфоидное влагалище. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (ki-67). Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции.  $\times 400$

Figure 3. Spleens of the rats of the control (A) and the experimental (B) group. ГЦ — germinal centres, ПАЛВ — periarterial lymphoid sheaths. Immunohistochemical staining with antibodies to the nuclear antigen of proliferating cells (ki-67). Indirect streptavidin-biotin detection system.  $\times 400$ .

При иммуногистохимическом выявлении маркера мононуклеарной макрофагической системы CD68 в ткани селезенки контрольных животных было выявлено, что наибольшее число CD68+ клеток в поле зрения выявляется в красной пульпе (табл. 2). В белой пуль-

пе селезенки животных контрольной группы содержание CD68+ клеток относительно невелико. Нами обнаружено, что под влиянием НЧ TiO<sub>2</sub> уровень экспрессии CD68-иммунопозитивных клеток в красной пульпе селезенки крыс опытной группы увеличивается на

32,17%, тогда как в герминативном центре и маргинальной зоне значительно уменьшается ( $p < 0,05$ ) (рис. 4).

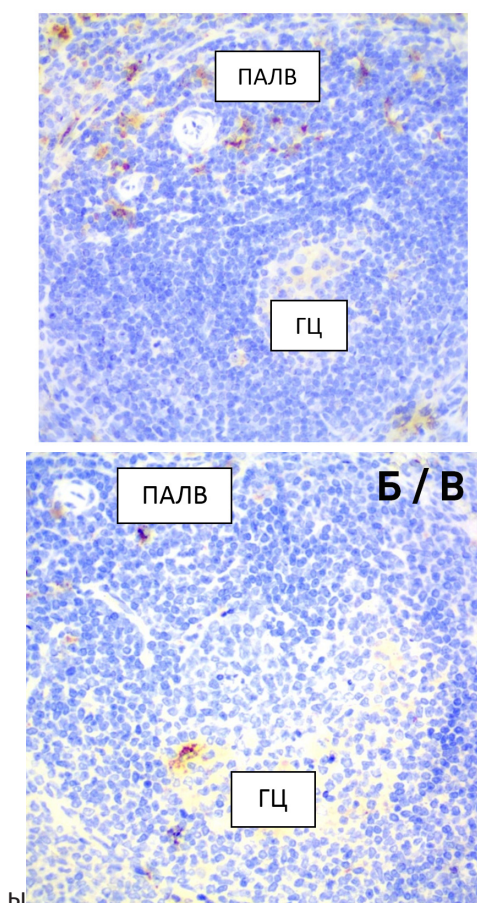


Рисунок 4. Селезенка крысы контрольной (А) и опытной (Б) группы. Об.: ГЦ — герминативный центр лимфоидного узелка, ПАЛВ — периартериальное лимфоидное влагалище. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к маркеру макрофагов CD68. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции.  $\times 400$

Figure 4. Spleen of the rats from the control (A) and the experimental (B) group. ГЦ — germinal centre of lymphoid follicles, ПАЛВ — periarterial lymphoid sheaths. Immunohistochemical staining with antibodies to the macrophage marker CD68. Indirect streptavidin-biotin system detection system.  $\times 400$ .

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало, что при пероральном введении НЧ  $\text{TiO}_2$  крысам происходят изменения иммуногистохимических характеристик ткани селезенки, соответствующие иммунодепрессивному состоянию. При этом, как показал морфометрический анализ, эти изменения являются отражением снижения уровня процессов пролиферации клеток, изменением числа макрофагов в ответ на воздействие изучаемых наночастиц.

Полученные нами данные в целом согласуются с результатами других исследований, в которых показано, что при ежедневном внутрибрюшинном введении мы-

шам НЧ  $\text{TiO}_2$  в течение 45 дней НЧ обнаруживаются в селезенке, что приводит к гиперемии красной и белой пульпы, усилению пролиферативных процессов в лимфатических узелках и интенсивности апоптоза клеток. Кроме того, в селезенке таких животных обнаруживается высокая скорость накопления активных форм кислорода, активация каспазы-3 и -9, ингибирование экспрессии Bcl-2 и изменения в уровнях Bax, а также цитохрома с [21]. Через 30 дней перорального введения НЧ  $\text{TiO}_2$  в ткани селезенки возникает окислительный стресс, опосредованный активацией p38-Nrf-2 сигнального пути и снижение эффективности иммунного ответа [22]. В другой работе при хроническом введении мышам различных доз НЧ  $\text{TiO}_2$  (2,5; 5 и 10 мг) в течение 90 дней были обнаружены морфологические признаки повреждения селезенки, которые сопровождалось снижением иммунной функции организма, о чем также свидетельствовали клинические и биохимические гематологические показатели (число лейкоцитов, кровяных пластинок, лимфоцитов, содержание гемоглобина, иммуноглобулинов). Более того, существенно изменялась экспрессия воспалительных и апоптотических цитокинов, что приводило к воспалению и апоптозу [23]. В аналогичных условиях Sang с колл. (2014) в дендритных клетках селезенки показали изменение уровня экспрессии макрофагального белка воспаления (МИП)-1 $\alpha$  и значительного числа других цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа [24]. Кроме того, анализ с использованием микрочипов показал, что пероральное введение НЧ  $\text{TiO}_2$  в дозе 10 мг/массы тела вызывает нарушение экспрессии 1041 генов, связанных с иммунными/воспалительными реакциями, апоптозом, окислительным стрессом, сигнальной трансдукцией, пролиферацией клеток в селезенке мышей [25].

Таким образом, полученные нами данные дополняют сведения о негативном влиянии НЧ  $\text{TiO}_2$  на иммунную систему организма и свидетельствуют о том, что различные клеточные типы селезенки оказываются чрезвычайно чувствительными к действию НЧ, которые накапливаются в этом органе, вызывая в клетках селезенки усиление апоптоза, окислительный стресс и, как следствие этого, угнетение функций органа.

### Заключение

Результаты нашего исследования свидетельствуют об уязвимости селезенки — одного из ключевых звеньев иммунной системы — для НЧ  $\text{TiO}_2$ , их введение неизбежно приводит к нарушению иммунного статуса организма, а это необходимо учитывать при разработке мер безопасности на соответствующих производствах и установлении безопасных уровней содержания НЧ  $\text{TiO}_2$  в продовольственных товарах, лекарственных препаратах, средствах гигиены и т.д.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Rompelberg C., Heringa M.B., van Donkersgoed G., Drijvers J., Roos A., Westenbrink S., Peters R., van Bommel G., Brand W., Oomen A.G. Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population. *Nanotoxicology*. 2016. No. 10 (10). pp.1404-1414.
2. Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S. Bernd Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res*. 2012. No. 14. p. 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>.
3. Hongbo S., Ruth M., Vincent C., Jinsbun Z. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*. 2013. No. 10 (15). pp. 1-33.
4. Songo B., Liu J., Feng X., Wi L., Shao L. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale res Lett*. 2015. No. 10 (1). p 1042.
5. Syed N.S., Zahir S., Muzammal H., Muzaffar K. Hazardous Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Ecosystem. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2017; [doi.org/10.1155/2017/4101735](https://doi.org/10.1155/2017/4101735).
6. Шарафутдинова Л.А., Валиуллин В.В. Морфологические характеристики гиппокампа крыс на фоне воздействия наночастиц диоксида титана. *Российские нанотехнологии*. 2018. – No. 13 (3-4). – С. 104-107.
7. Шарафутдинова Л.А., Федорова А.М., Башкатов С.А., Синельников К.Н., Валиуллин В.В. Структурно-функциональная характеристика сперматогенного эпителия крыс в условиях воздействия наночастиц диоксида титана. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018. – № 166(8). – С. 241-245.
8. Karimipour M., Zirak Javanmard M., Ahmadi A., Jafari A. Oral administration of titanium dioxide nanoparticle through ovarian tissue alterations impairs mice embryonic development. *J Reprod Biomed (Yazd)*. 2018. No. 16 (6). pp. 397-404.
9. Tsang M.P., Hristozov D., Zabeo A., Koivisto A.J., Jensen A.C., Jensen K.A., Pang C., Marcomini A., Sonnemann G. Probabilistic risk assessment of emerging materials: case study of titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2017. No. 11 (4). pp. 558-568. DOI: 10.1080/17435390.2017.1329952
10. Rollerova E., Tulinska J., Liskova A., Kuricova M., Kovriznych J., Mlynarcikova A., Kiss A., Scsukova S. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/ focus on the development. *Endocr Regul*. 2015. No. 49 (2). pp. 97-112.
11. Tassinari R., Cubadda F., Moracci G., Aureli F., D'Amato M., Valeri M., De Berardis B., Raggi A., Mantovani A., Passeri D., Rossi M., Maranghi F. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology*. 2014. No. 8 (6). pp.

## REFERENCES

1. Rompelberg C., Heringa M.B., van Donkersgoed G., Drijvers J., Roos A., Westenbrink S., Peters R., van Bommel G., Brand W., Oomen A.G. Oral intake of added titanium dioxide and its nanofraction from food products, food supplements and toothpaste by the Dutch population. *Nanotoxicology*. 2016. No. 10 (10). pp.1404-1414.
2. Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S. Bernd Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res*. 2012. No. 14. p. 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>.
3. Hongbo S., Ruth M., Vincent C., Jinsbun Z. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*. 2013. No. 10 (15). pp. 1-33.
4. Songo B., Liu J., Feng X., Wi L., Shao L. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale res Lett*. 2015. No. 10 (1). p 1042.
5. Syed N.S., Zahir S., Muzammal H., Muzaffar K. Hazardous Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Ecosystem. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2017; [doi.org/10.1155/2017/4101735](https://doi.org/10.1155/2017/4101735).
6. Sharafutdinova L.A., Valiullin V.V. Morphological characteristics of the hippocampus of rats against the background of exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Rossiyskie nanotekhnologii = Nanotechnologies in Russia*. 2018. No. 13 (3-4). pp. 104-107 (in Russ).
7. SSharafutdinova L.A., Fedorova A.M., Bashkatov S.A., Sinelnikov K.N., Valiullin V.V. Structural and functional characteristics of the spermatogenic epithelium of rats under the influence of titanium dioxide nanoparticles. *Byulleten eksperimentalnoj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018. No. 166 (8). pp. 241-245 (in Russ).
8. Karimipour M., Zirak Javanmard M., Ahmadi A., Jafari A. Oral administration of titanium dioxide nanoparticle through ovarian tissue alterations impairs mice embryonic development. *J Reprod Biomed (Yazd)*. 2018. No. 16 (6). pp. 397-404.
9. Tsang M.P., Hristozov D., Zabeo A., Koivisto A.J., Jensen A.C., Jensen K.A., Pang C., Marcomini A., Sonnemann G. Probabilistic risk assessment of emerging materials: case study of titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2017. No. 11 (4). pp. 558-568. DOI: 10.1080/17435390.2017.1329952
10. Rollerova E., Tulinska J., Liskova A., Kuricova M., Kovriznych J., Mlynarcikova A., Kiss A., Scsukova S. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/ focus on the development. *Endocr Regul*. 2015. No. 49 (2). pp. 97-112.
11. Tassinari R., Cubadda F., Moracci G., Aureli F., D'Amato M., Valeri M., De Berardis B., Raggi A., Mantovani A., Passeri D., Rossi M., Maranghi F. Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in



654-62. doi: 10.3109/17435390.2013.822114.

12. Heringa M. B., Peters R. J. B., Bleys R. L. A. W., van der Lee M. K., Tromp P. C., van Kesteren P. C. E., van Eijkeren J. C. H., Undas A. K., Oomen A. G., Bouwmeester H. Part Fibre Toxicol. 2018. No. 15. p. 15. doi:10.1186/s12989-018-0251-7.

13. Hong F, Yu X, Wu N, Zhang Y-Q. Progress of in vivo studies on the systemic toxicities induced by titanium dioxide nanoparticles. Toxicology Research. 2017. No. 6 (2). pp. 115-133. doi:10.1039/c6tx00338a.

14. Wang X., Reece S.P., Brown J.M. Immunotoxicological impact of engineered nanomaterial exposure: mechanisms of immune cell modulation. Toxicology mechanisms and methods. 2013. No. 23 (3). pp. 168-177.

15. Ngobili T.A., Daniele M.A. Nanoparticles and direct immunosuppression. Experimental Biology and Medicine. 2016. No. 241 (10). pp. 1064-1073.

16. Fu Y., Zhang, Y., Chang, X., Zhang, Y., Ma, S., Sui, J., Yin L., Pu, Y., Liang G. Systemic Immune Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles after Repeated Intratracheal Instillation in Rat. Int. J. Mol. Sci. 2014. No. 15. pp. 6961-6973.

17. Ngobili T.A., Daniele M.A.. Nanoparticles and direct immunosuppression. Experimental Biology and Medicine. 2016. No. 241 (10). pp. 1064-1073. doi:10.1177/1535370216650053.

18. van Loveren H., Vos J.G., De Waal E.J. Testing immunotoxicity of chemicals as a guide for testing approaches for pharmaceuticals. Drug Info J. 1996. No. 30. pp. 275-279.

19. Hong F., Zhou Y., Zhou Y., Wang L. Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. Environ Toxicol. 2017. No. 32 (10). pp. 2234-2243. doi: 10.1002/tox.224.

20. Cesta M.F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. Toxicologic Pathology. 2006. No. 34 (5). pp. 455-465.

21. Li N., Duan Y. M., Hong M. M., Zheng L., Fei M., Zhao X. Y., Wang J., Cui Y. L., Liu H. T., Cai J. W., Gong S. J., Wang H., Hong F. S. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. Toxicol. Lett. 2010. No. 195 (2-3). pp. 161-168.

22. Wang J., Li N., Zheng L., Wang S. S., Wang Y., Zhao X. Y., Duan Y. M., Cui Y. L., Zhou M., Cai J. W., Gong S. J., Wang H., Hong F. S. P38-Nrf-2 signaling pathway of oxidative stress in mice caused by nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. Biol. Trace. Elem. Res. 2011. No. 140 (2). pp. 186-197.

23. Sang X. Z., Zheng L., Sun Q. Q., Li N., Cui Y. L., Hu R. P., Gao G. D., Cheng Z., Cheng J., Gui S. X., Liu H. T., Zhang Z., Hong F. S. J. The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. Biomed. Mater. Res., Part A. 2012. No. 100 (4). pp. 894-902.

24. Sang X. Z., Fei M., Sheng L., Zhao X. Y., Yu X.H.,

Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. Nanotoxicology. 2014. No. 8 (6). pp. 654-62. doi: 10.3109/17435390.2013.822114.

12. Heringa M. B., Peters R. J. B., Bleys R. L. A. W., van der Lee M. K., Tromp P. C., van Kesteren P. C. E., van Eijkeren J. C. H., Undas A. K., Oomen A. G., Bouwmeester H. Part Fibre Toxicol. 2018. No. 15. p. 15. doi:10.1186/s12989-018-0251-7.

13. Hong F, Yu X, Wu N, Zhang Y-Q. Progress of in vivo studies on the systemic toxicities induced by titanium dioxide nanoparticles. Toxicology Research. 2017. No. 6 (2). pp. 115-133. doi:10.1039/c6tx00338a.

14. Wang X., Reece S.P., Brown J.M. Immunotoxicological impact of engineered nanomaterial exposure: mechanisms of immune cell modulation. Toxicology mechanisms and methods. 2013. No. 23 (3). pp. 168-177.

15. Ngobili T.A., Daniele M.A. Nanoparticles and direct immunosuppression. Experimental Biology and Medicine. 2016. No. 241 (10). pp. 1064-1073.

16. Fu Y., Zhang, Y., Chang, X., Zhang, Y., Ma, S., Sui, J., Yin L., Pu, Y., Liang G. Systemic Immune Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles after Repeated Intratracheal Instillation in Rat. Int. J. Mol. Sci. 2014. No. 15. pp. 6961-6973.

17. Ngobili T.A., Daniele M.A.. Nanoparticles and direct immunosuppression. Experimental Biology and Medicine. 2016. No. 241 (10). pp. 1064-1073. doi:10.1177/1535370216650053.

18. van Loveren H., Vos J.G., De Waal E.J. Testing immunotoxicity of chemicals as a guide for testing approaches for pharmaceuticals. Drug Info J. 1996. No. 30. pp. 275-279.

19. Hong F., Zhou Y., Zhou Y., Wang L. Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. Environ Toxicol. 2017. No. 32 (10). pp. 2234-2243. doi: 10.1002/tox.224.

20. Cesta M.F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. Toxicologic Pathology. 2006. No. 34 (5). pp. 455-465.

21. Li N., Duan Y. M., Hong M. M., Zheng L., Fei M., Zhao X. Y., Wang J., Cui Y. L., Liu H. T., Cai J. W., Gong S. J., Wang H., Hong F. S. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. Toxicol. Lett. 2010. No. 195 (2-3). pp. 161-168.

22. Wang J., Li N., Zheng L., Wang S. S., Wang Y., Zhao X. Y., Duan Y. M., Cui Y. L., Zhou M., Cai J. W., Gong S. J., Wang H., Hong F. S. P38-Nrf-2 signaling pathway of oxidative stress in mice caused by nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. Biol. Trace. Elem. Res. 2011. No. 140 (2). pp. 186-197.

23. Sang X. Z., Zheng L., Sun Q. Q., Li N., Cui Y. L., Hu R. P., Gao G. D., Cheng Z., Cheng J., Gui S. X., Liu H. T., Zhang Z., Hong F. S. J. The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. Biomed. Mater. Res., Part A. 2012. No. 100

Hong J., Ze Y.G., Gui S.X., Sun Q.Q., Ze X., Wang L., Hong F. Immunomodulatory effects in the spleen-injured mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 2014. No. 102 A. pp. 3562–3572.

25. Sheng L., Wang L., Sang X.Z., Zhao X.Y., Hong J., Cheng S., Yu X.H., Liu D., Xu B.Q., Hu R.P., Sun Q.Q., Cheng J., Cheng Z., Gui S.X., Hong F.S. Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology. *J. Hazard. Mater.* 2014. No. 278. pp. 180–188.

(4). pp. 894–902.

24. Sang X. Z., Fei M., Sheng L., Zhao X. Y., Yu X.H., Hong J., Ze Y.G., Gui S.X., Sun Q.Q., Ze X., Wang L., Hong F. Immunomodulatory effects in the spleen-injured mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 2014. No. 102 A. pp. 3562–3572.

25. Sheng L., Wang L., Sang X.Z., Zhao X.Y., Hong J., Cheng S., Yu X.H., Liu D., Xu B.Q., Hu R.P., Sun Q.Q., Cheng J., Cheng Z., Gui S.X., Hong F.S. Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity: a biological pathway explored using microarray technology. *J. Hazard. Mater.* 2014. No. 278. pp. 180–188.

#### Авторы:

Шарафутдинова Люция Ахтямовна  
Башкирский государственный университет  
Кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и общей биологии биологического факультета  
Российская Федерация, 450076, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, дом 32  
sharafla@yandex.ru

Валиуллин Виктор Владимирович  
Казанский государственный медицинский университет  
Доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии  
Российская Федерация, 420012, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, 49  
valiullinvv@yandex.ru

#### Authors:

Lucia A. Sharafutdinova  
Cand. Sci. (Biolog.), Associate Professor of the Department of Physiology and General Biology, Faculty of Biology  
Bashkir State University  
Zaki Validi Str. 32 Ufa Russian Federation 450076  
sharafla@yandex.ru

Viktor V. Valiullin  
Dr. Sci. (Biolog.), Professor of the Department of Histology  
Kazan Medical University, Kazan, Russian Federation  
Butlerova Str., 49 Kazan Russian Federation 420012  
sharafla@yandex.ru