

# Токсикологічні та морфологічні аспекти прояву гострої дії нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag на печінку лабораторних мишей

О. П. Яворовський<sup>id</sup> A,C,D,E,F, С. І. Савосько<sup>id</sup> A,B,C,D,E, В. М. Рябовол<sup>id</sup> \*A,B,C,D,E, Т. О. Зінченко<sup>id</sup> B,C,D,E

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті;  
F – остаточне затвердження статті

## Ключові слова:

наночастинки  
діоксиду титану,  
гістологія печінки,  
гепатотоксичність,  
нанотоксичність.

Патологія. 2023.  
Т. 20, № 2(58).  
С. 162-169

\*E-mail:  
riabovol1@ukr.net

**Мета роботи** – дослідження особливостей токсичної дії нанопорошків TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag на морфологію та елементний склад печінки лабораторних мишей.

**Матеріали та методи.** У дослідженні використано модель гострої інтоксикації на лабораторних тваринах. Мишам внутрішньоочеревинно вводили нанопорошки TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag у дозі 4000 мг/кг, 7000 мг/кг або 10000 мг/кг. Впродовж двох тижнів спостерігали за тваринами, оцінювали летальність, досліджували накопичення нанопорошку в органі та морфологію тканин печінки. У зразках печінки визначали вміст титану та срібла методом оптико-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою. Мікропрепарати тканини печінки досліджували на світловому мікроскопі Olympus BX51. Мікропрепарати печінки досліджували також сканувальною електронною мікроскопією (SEM) за допомогою приладу Tescan Mira 3, визначали елементний склад за допомогою енергодисперсійного спектрометра Oxford instruments, X-max 80 mm<sup>2</sup>.

**Результати.** Виявили залежність летальності мишей від дози нанопорошків; летальність вища при впливі нано-TiO<sub>2</sub>-Ag порівняно з нано-TiO<sub>2</sub>. Методом пробіт-аналізу розрахували середньосмертельні дози. Для нано-TiO<sub>2</sub> LD<sub>50</sub> становить 4783,30 мг/кг, для нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – 724,44 мг/кг. Встановлено накопичення титану, а також титану та срібла в печінці після впливу нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag відповідно. Загалом спостерігали тенденцію до посилення залежності вмісту титану в тканині печінки від збільшення введеної дози нанопорошків.

Гістологічними методами досліджували морфологічні зміни в печінці. Найбільш характерні морфологічні ознаки токсичної дії нано-TiO<sub>2</sub> на тканину печінки – дистрофічні зміни на рівні 67,7 % (цитоплазматична вакуолізація в гепатоцитах), а в разі впливу нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – початкові некротичні зміни на рівні 70 % (гепатоцити з пікнозом ядер). Зазначимо, що токсичну дію нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag значно рідше виявляли за фокальними некрозами та запальними реакціями (фокальна інфільтрація), в окремих випадках визначали адаптаційні зміни – збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів. У зразках печінки виявили агломерати чужорідного матеріалу (кристалічні включення), що досліджували спектрально; встановили високий вміст титану (Ti). За результатами SEM, морфометрія показала, що розміри наночастинок і їхніх агломератів становлять від 80 нм до 20 мкм.

**Висновки.** Летальність мишей виявилась вищою при введенні композиту нано-TiO<sub>2</sub>-Ag порівняно з нано-TiO<sub>2</sub>. За розрахованими середньосмертельними дозами обидва нанопорошки визначені до 3 класу (помірно небезпечні) небезпечності хімічних речовин за ГОСТ 12.1.007-76. Встановлено, що зі збільшенням введеної дози в тканині печінки лабораторних мишей зростає накопичення титану (при дії нано-TiO<sub>2</sub>), титану та срібла (при дії нано-TiO<sub>2</sub>-Ag). Характерні мікроскопічні ознаки токсичної дії нанопорошків TiO<sub>2</sub> та TiO<sub>2</sub>-Ag після внутрішньоочеревинного введення лабораторним мишам – дистрофічні зміни гепатоцитів, некроз паренхіми печінки, а запальні реакції виявляють рідше. SEM і метод елементної картографії титану підтвердили наявність наночастинок TiO<sub>2</sub> та їхніх агломератів у тканині печінки у разі введення нанопорошку TiO<sub>2</sub>.

## Key words:

titanium dioxide  
nanoparticles,  
liver histology,  
hepatotoxicity,  
nanotoxicity.

Pathologia, 2023. 20(2),  
162-169

## Toxicological and morphological aspects of nano-TiO<sub>2</sub> and nano-TiO<sub>2</sub>-Ag acute action on the liver of mice

O. P. Yavorovskiy, S. I. Savosko, V. M. Riabovol, T. O. Zinchenko

**Aim.** To study the toxic effect of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-Ag nanopowders on the morphology and elemental composition of the laboratory mice liver.

**Materials and methods.** The study used a model of acute intoxication on laboratory animals. Mice were injected intraperitoneally with TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-Ag nanopowders at 4000 mg/kg, 7000 mg/kg, or 10000 mg/kg doses. During two weeks, the animals were observed, lethality was assessed, the accumulation of nanopowder in the organ and the morphology of liver tissues were investigated. The content of titanium and silver in liver samples was determined by optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma. Liver tissue micropreparations were examined using an Olympus BX51 light microscope. Also, the micropreparations of the liver were examined by scanning electron microscopy (SEM) using the Tescan Mira 3 device, and the elemental composition was determined using an energy dispersive spectrometer Oxford instrument, X-max 80 mm<sup>2</sup>.

**Results.** The dependence of the mice lethality on the nanopowders dose was revealed; mortality was higher when exposed to nano-TiO<sub>2</sub>-Ag compared to nano-TiO<sub>2</sub>. Average lethal doses were calculated using probit analysis. For nano-TiO<sub>2</sub>, the LD<sub>50</sub> is 4783.30 mg/kg; for nano-TiO<sub>2</sub>-Ag – 724.44 mg/kg. The accumulation of titanium, titanium, and silver in the liver after exposure to nano-TiO<sub>2</sub> and nano-TiO<sub>2</sub>-Ag was established. In general, there was a tendency to increase the content of titanium in the skin tissue with an increase in the administered dose of nanopowders.

Morphological changes in the liver were studied by histological methods. The most characteristic morphological signs of the toxic effect of nano-TiO<sub>2</sub> on tissue were dystrophic changes at the level of 67.7 % (cytoplasmic vacuolization in hepatocytes), and when exposed to nano-TiO<sub>2</sub>-Ag – initial necrotic changes at the level of 70 % (hepatocytes with nuclear pyknosis). It is worth noting that the toxic effect of nano-TiO<sub>2</sub> and nano-TiO<sub>2</sub>-Ag is much less often manifested by focal necrosis and inflammatory reactions (focal infiltration), in some cases, there were adaptive changes that provoked an increase in the number of binuclear hepatocytes. In case of detection agglomerates of a foreign object (crystalline inclusions) were obtained, which were examined spectrally and showed a high content of titanium (Ti). SEM morphometry showed that the size of nanoparticles and their agglomerates ranged from 80 nm to 20 μm.

**Conclusions.** The lethality of mice was higher when the composition of nano-TiO<sub>2</sub>-Ag was introduced compared to nano-TiO<sub>2</sub>. Based on the calculated average lethal doses, both nanopowders were assigned to the 3<sup>rd</sup> class (moderately dangerous) of the danger of chemical substances according to the classification of GOST 12.1.007-76. It was established that with an increase in the injected dose in the tissue of the products of laboratory mice, the accumulation of titanium (under the action of nano-TiO<sub>2</sub>) and titanium and silver (under the action of nano-TiO<sub>2</sub>-Ag) increases. Characteristic microscopic signs of the toxic effect of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-Ag nanopowders after intraperitoneal injection in laboratory bags are dystrophic changes in hepatocytes, necrosis of parenchymal disease, while inflammatory reactions occur less often. SEM and the method of elemental mapping of titanium confirmed the presence of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their agglomerates in skin tissue when TiO<sub>2</sub> nanopowder was administered.

Наноматеріали все ширше використовують у різних галузях економічної діяльності, включаючи біологію та медицину. Наночастинки діоксиду титану (нано-TiO<sub>2</sub>) – одні з найефективніших фотокаталізаторів, що застосовують для знешкодження органічних забруднювачів, знезаражування, створення антимікробних і самоочищених поверхонь. Так, наночастинки TiO<sub>2</sub> використовують для очищення та знезараження повітря приміщень, очищення стічних вод. Фотокаталітичну активність наночастинок TiO<sub>2</sub> значно підвищує додавання до нанодіоксиду титану певної кількості срібла (нано-TiO<sub>2</sub>-Ag) [1]. Виражена фотокаталітична активність зумовлює високу біологічну дію наночастинок TiO<sub>2</sub> – віруцидну, бактерицидну, фунгіцидну [2,3].

Як показали попередні дослідження, під час виробництва наноматеріалів наночастинки надходять у повітря робочої зони та можуть потрапляти в організм операторів синтезу інгаляційним шляхом, забруднювати шкіру й спецодяг. Відомо, що наночастинки діоксиду титану чинять шкідливу дію на клітинному рівні через оксидативний стрес, формуючи активні форми кисню [3,4,5,6].

Виявлено зміни, спричинені впливом наночастинок металів, експресії генів, що відповідають за циркадні ритми організму, регуляцію метаболізму та апоптоз клітин [7,8]. У фаховій літературі наведено доволі обмежені дані щодо впливу наночастинок TiO<sub>2</sub> на печінку, хоча добре відомо, що ключову роль у детоксикації екзогенних хімічних речовин відіграє саме цей орган [9,10]. Тому теоретичний і практичний гігієнічний інтерес викликає дослідження впливу нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag на структуру органа на рівні і світлової, й електронної мікроскопії, а також накопичення в ньому наночастинок або хімічних елементів, з яких складаються наночастинки.

## Мета роботи

Дослідження особливостей токсичної дії нанопорошків TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag на морфологію та елементний склад печінки лабораторних мишей.

## Матеріали і методи дослідження

Експерименти здійснили на лабораторних мишах на базі віварію Національного медичного університету

імені О. О. Богомольця. Для дослідження гострої токсичності нано-TiO<sub>2</sub> випробували 7 доз у діапазоні від 3000 мг/кг до 11000 мг/кг, нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – 4 дози в діапазоні від 1000 мг/кг до 10000 мг/кг. Мишей поділили на групи по 6 особин для кожної дози нанопорошків. Середньосмертельні дози (LD<sub>50</sub>) для обох нанопорошків розраховували методом пробіт-аналізу в модифікації В. Б. Прозоровського.

Накопичення хімічних елементів наночастинок і морфологічних змін тканини в печінці вивчали на 45 мишах-самках лінії BALB/c. Миші одноразово отримали нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag у дозі 4000 мг/кг, 7000 мг/кг або 10000 мг/кг шляхом внутрішньоочеревинного введення. Для кожної дози нанопорошків сформували дослідну групу із 6 тварин (загалом 6 груп); у контрольній групі – 9 мишей. Суспензію нанопорошків готували на фізіологічному розчині (0,9 % NaCl) з перемішуванням на магнітній мішалці перед введенням. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин (0,9 % NaCl), який застосовували як дисперсне середовище. Після введення нанопорошку спостерігали за станом тварин упродовж двох тижнів, оцінювали прояви інтоксикації, здійснювали облік загинув особин. Тварин із контрольної та дослідних груп, які не загинули впродовж двох тижнів, виводили з експерименту на 14 добу методом декапітації під наркозом пропофолу 1 %.

Умови утримання та використання лабораторних тварин відповідали правилам і положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують із дослідними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986), погоджені комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, протокол № 128 від 23.12.2019 р.

Досліджували нанопорошок TiO<sub>2</sub>, синтезований методом термічного розкладу метатитанової кислоти шляхом нагрівання до температури 700 °C зі швидкістю нагріву 5 °C/хв, та наноккомпозит діоксиду титану зі сріблом (нано-TiO<sub>2</sub>-Ag), отриманий методом хімічного осадження метатитанової кислоти з додаванням нітрату срібла в кількості 4 % від маси композиту при температурі 500–600 °C, які одержані в Інституті проблем матеріалознавства імені І. М. Францевича НАН України. Середній розмір дисперсної фази для TiO<sub>2</sub>

у композитному матеріалі становив 13–20 нм, для Ag – 35–40 нм [1, 11].

Вміст хімічних елементів Ti та Ag у зразках печінки визначали за допомогою методу оптико-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (ОЕС-ІЗП) на приладі Optima 2100 DV (Perkin-Elmer, США) [12]. Наважку органів мишей проводили на аналітичних вагах, поміщали в автоклав, додавали 3,0 мл концентрованої нітратної кислоти (Merck) та витримували 30 хв. Потім мінералізували у мікрохвильовій печі MARS-one. Після охолодження пробу переміщували в мірний посуд і доводили об'єм до 5,0 мл деіонізованою водою. Статистично результати опрацьовували за допомогою інсталюваного програмного забезпечення приладу ОЕС-ІЗП WinLab32 в операційній системі Windows XP prof.

Печінку мишей для гістологічного дослідження брали після загибелі чи виведення з експерименту. Зразки органів фіксували у 10 % розчині формаліну (рН 7,4), зневоднювали в ізопропанолі (3 серії, 99,8 %), ущільнювали в парафіні (3 серії) (Leica Surgipath Paraplast Regular). Парафінові зрізи завтовшки 4 мкм виготовляли на мікромомі Thermo Microm HM 360. Зрізи депарафінізували, забарвлювали гематоксиліном та еозином, сіріусом червоним із дозобарвленням гематоксиліном Вейгерта. Мікропрепарати досліджували на мікроскопі Olympus BX51, фотографували при збільшенні  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Мікроскопічні зміни печінки оцінювали за методом, що наведено в статті [12].

Із парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 4 мкм, фіксували на округлі кремнієві скельця діаметром 6–8 мм (знежирені, без покриття). Скельця депарафінізували в ксилолі як для гістологічного дослідження, висушували в установці Samdri-780A у критичній точці  $\text{CO}_2$ . В установці Gatan 682 PECS створювали покриття Au/Pd завтовшки 15 нм. Сканувальну електронну мікроскопію (СЕМ) здійснили, застосувавши прилад Tescan Mira 3 LMU (Чехія). Зразки досліджували в режимі детекції вторинних (вибитих електронів з атомів, SE) та зворотновідбитих (BSE) електронів. Елементний склад і поелементне картування одержали за допомогою енергодисперсійного спектрометра Oxford instruments, X-max 80 mm<sup>2</sup> (Велика Британія).

Статистично результати дослідження опрацьовували, здійснивши перевірку на нормальність розподілу за критерієм W Шапіро–Вілка. Для статистичного опрацьовування використали параметричні критерії: Ст'юдента, дисперсійний аналіз, метод множинних порівнянь Шеффе. Застосували також непараметричні критерії: W-критерій Вілкоксона, ранговий однофакторний аналіз Краскела–Волліса, множинні порівняння за критерієм Данна. Відмінність вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ . Під час роботи використали пакет програм MedStat v.5.2 (Copyright© 2003–2019) [13].

## Результати

Для визначення гострої токсичності  $\text{nano-TiO}_2$  випробували 7 доз у діапазоні від 3000 мг/кг до 11000 мг/кг.

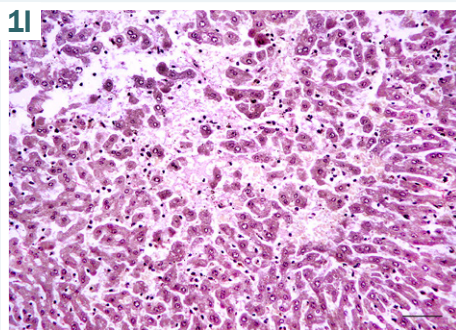
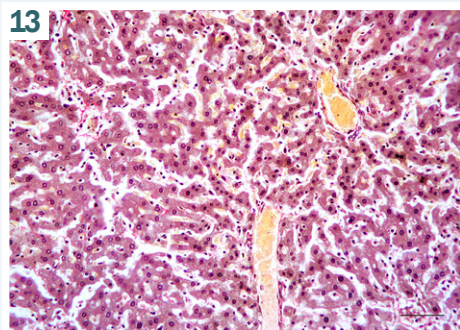
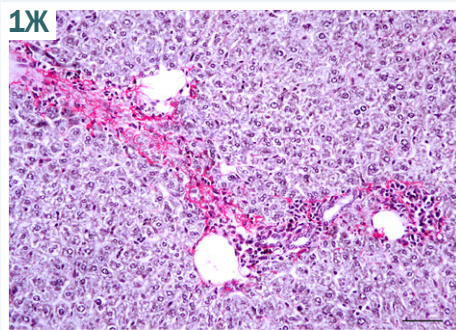
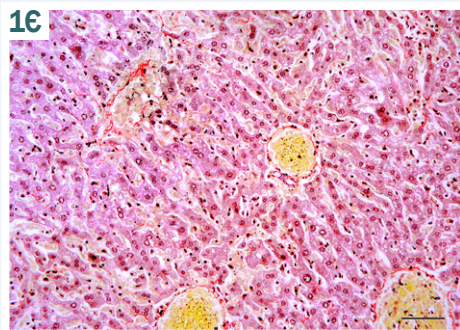
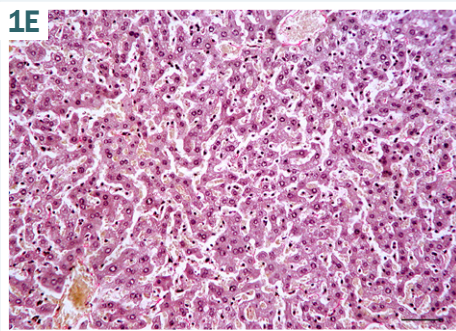
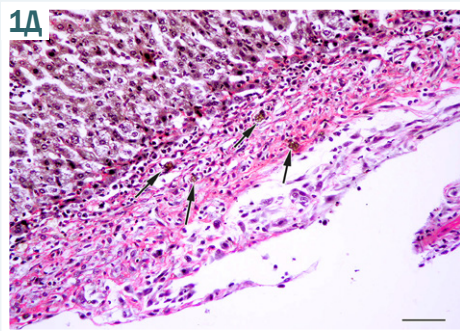
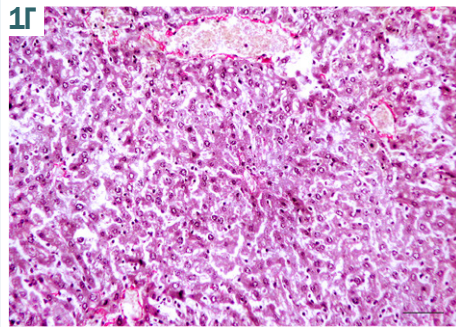
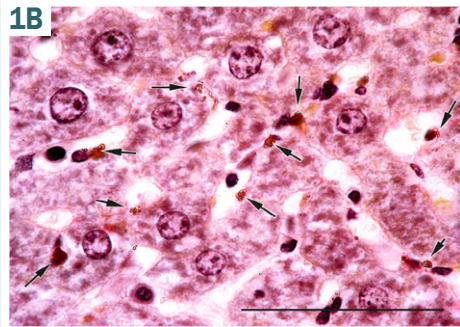
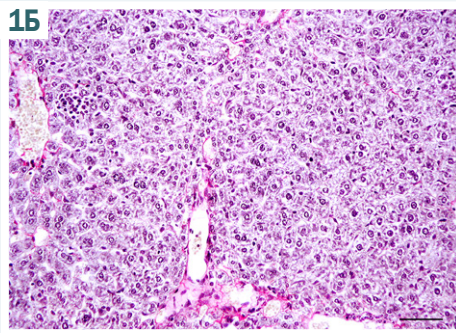
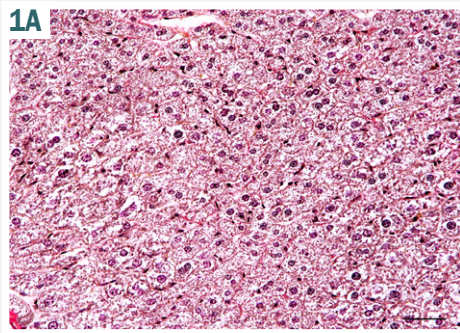
Гостру токсичність  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$  оцінювали при введенні 4 доз у діапазоні від 1000 мг/кг до 10000 мг/кг. При введенні  $\text{nano-TiO}_2$  в дозі 5000 мг/кг і більше, а для  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$  – у дозі 1000 мг/кг і більше спостерігали клініку гострого отруєння: втрату інтересу до їжі та води, зниження рухової активності, загальмованість і пригніченість тварин. Упродовж двох тижнів спостерігали загибель мишей, як правило, кількість випадків підвищувалась зі збільшенням введеної дози. Доза  $\text{nano-TiO}_2$  9000 мг/кг визначена як абсолютно смертельна, доза  $\text{nano-TiO}_2$  4000 мг/кг – максимально переносна. Для  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$  доза 7000 мг/кг була абсолютно смертельною, максимально переносна доза – менше за 1000 мг/кг. Застосувавши метод пробіт-аналізу в модифікації В. Б. Прозоровського, розрахували середньосмертельні дози нанопорошків, що досліджували. Для  $\text{nano-TiO}_2$   $\text{LD}_{50}$  становила 4783,30 мг/кг; для  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$  – 724,44 мг/кг.

В експерименті на мишах для вивчення накопичення хімічних елементів наночастинок і морфологічних змін тканини в печінці зафіксували летальність дослідних тварин. Так, за результатами спостереження за групами мишей, яким вводили  $\text{nano-TiO}_2$ , виявили: доза 4000 мг/кг не спричиняє загибель, доза 7000 мг/кг зумовлює летальність 33 % особин (загинули наприкінці другої доби), доза 10000 мг/кг призвела до загибелі всіх тварин здебільшого наприкінці першої доби. У групах мишей, яким вводили  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , зафіксували загибель більшості тварин наприкінці першої доби, зокрема доза 4000 мг/кг спричинила летальність на рівні 83 %, дози 7000 мг/кг і 10000 мг/кг – 100 %.

Дані, що характеризують вміст у тканині печінки титану (Ti) та срібла (Ag) при введенні нанопорошків у різних дозах (4000 мг/кг, 7000 мг/кг і 10000 мг/кг), наведено в таблиці 1. Виявили тенденцію до посилення залежності вмісту титану в тканині печінки від збільшення дози нанопорошку. Винятком була доза 4000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , але зауважимо, що її введення не призвело до загибелі тварин до завершення експерименту, а при введенні інших доз зафіксували загибель мишей до кінця першої доби. Припускаємо, що відбувся перерозподіл і накопичення наночастинок  $\text{TiO}_2$  з інших органів і тканин у печінку. Крім того, можна припустити, що у дозі 10000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , який за  $\text{LD}_{50}$  є більш токсичним, ніж  $\text{nano-TiO}_2$ , інтенсивніше заповнював інтерстиціальний простір у тканині печінки мишей та спричиняв руйнування мембрани гепатоцитів.

Аналогічну залежність виявили щодо накопичення срібла в тканині печінки мишей при введенні нанопорошку  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  у дозах 4000 мг/кг, 7000 мг/кг, 10000 мг/кг. Про це свідчать не тільки виявлені достовірні зміни, але й верхня межа вірогідного інтервалу, що зростала з 3,40 мкг/г до 4,42 мкг/г і 6,27 мкг/г при введенні доз 4000 мг/кг, 7000 мг/кг і 10000 мг/кг відповідно.

Внутрішньоочеревинне введення фізіологічного розчину (контроль) не позначилось на морфології паренхіми печінки (рис. 1А), а  $\text{nano-TiO}_2$  та  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$  спричиняли зміни печінки, зокрема пошкодження клітин печінки гепатоцитів і клітин кровоносних судин (рис. 1Б–І).



**Рис. 1.** Гістологічні зміни печінки мишей у контролі та після одноразового внутрішньоочеревинного введення  $\text{nano-TiO}_2$  або  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ .

**А:** печінка тварин контрольної групи;

**Б:** некротичні зміни гепатоцитів, вакуолізація цитоплазми гепатоцитів печінки тварин після введення 4000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 14 доба;

**В:** включення  $\text{nano-TiO}_2$  (стрілка) у печінці тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 2 доба;

**Г:** некротичні зміни печінки тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 2 доба;

**Д:** включення  $\text{nano-TiO}_2$  (стрілка) та колагеногенез у субкапсулярній ділянці печінки тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 14 доба;

**Е:** розширення капілярів печінки тварин після введення 10000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2$ , 1 доба;

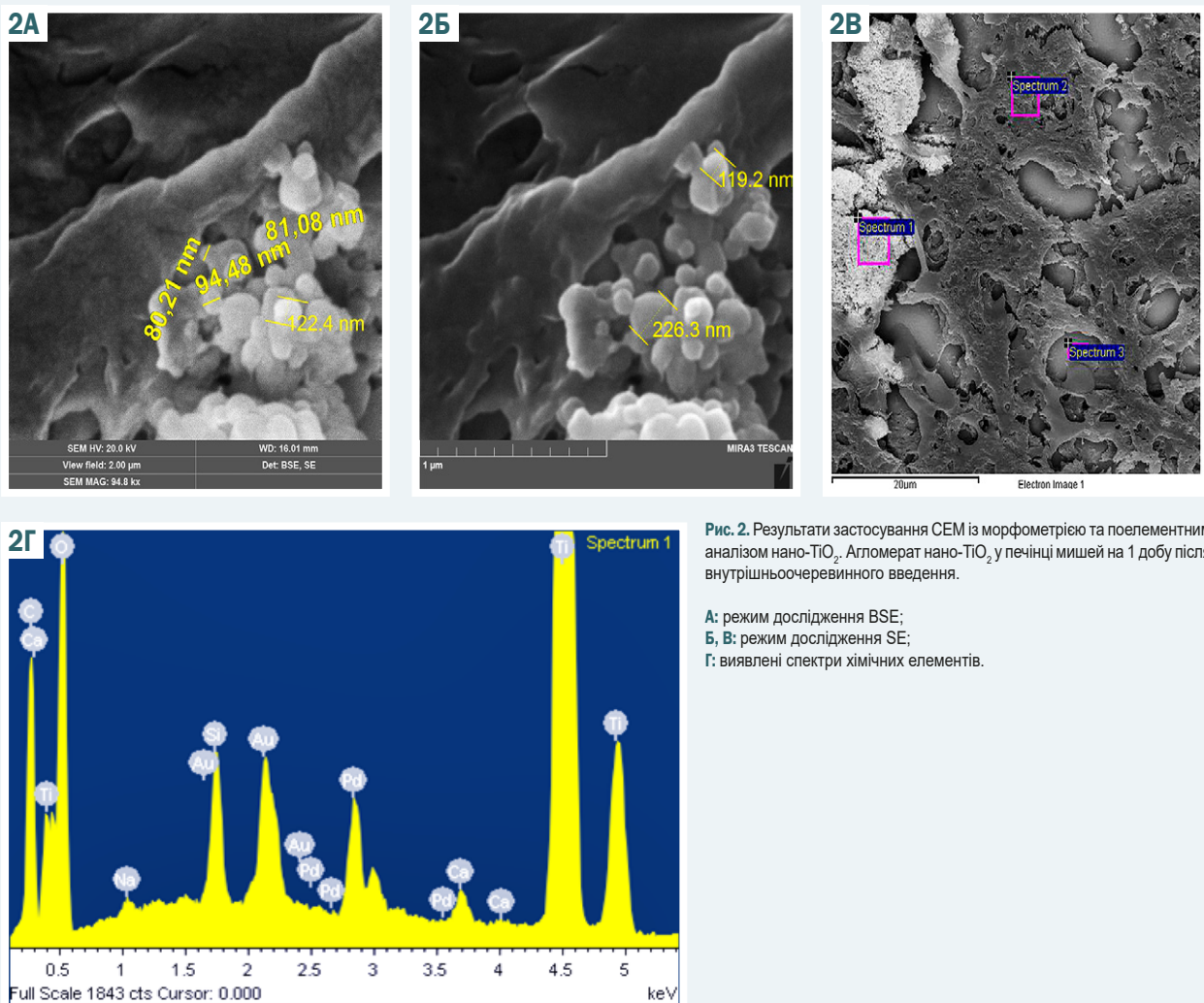
**Є:** розширення капілярів і некроз гепатоцитів печінки тварин після введення 4000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 1 доба;

**Ж:** некротичні зміни печінки тварин після введення 4000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 14 доба;

**З:** розширення капілярів і некроз гепатоцитів печінки тварин після введення 7000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 1 доба;

**И:** ділянки некрозів у печінці тварин після введення 10000 мг/кг  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$ , 1 доба.

Забарвлення – сіріус червоний, гематоксилін Вейгерта.  
Шкала 100 мкм.



**Рис. 2.** Результати застосування СЕМ із морфометрією та поелементним аналізом  $\text{nano-TiO}_2$ . Агломерат  $\text{nano-TiO}_2$  у печінці мишей на 1 добу після внутрішньоочеревинного введення.

**А:** режим дослідження BSE;  
**Б, В:** режим дослідження SE;  
**Г:** виявлені спектри хімічних елементів.

При введенні нанопорошку  $\text{TiO}_2$  у дозі 7000 мг/кг у зразках печінки виявляли агломерати чужорідного матеріалу (кристалічні включення) і після аутопсії мишей, що загинули наприкінці другої доби (рис. 1В), і в особин, що були виведені з експерименту шляхом декапітації на 14 добу досліду (рис. 1Д). Кристалічні скупчення виявили в інтерстиціальному просторі, поблизу гепатоцитів балок печінкових часточок, вздовж стінки деяких гемокапілярів; в разі великої щільності кристалічних агломератів у паренхімі печінки спостерігали включення у просвіті мікросудин і жовчних проток (рис. 1В).

Неоднорідність виявлення, очевидно, пов'язана з дозою та характером розподілу  $\text{nano-TiO}_2$  та  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$  в очеревині після введення. Виявили реакцію сполучної тканини на чужорідний матеріал, відбувалась інкапсуляція кристалічних включень у ділянках капсули печінки, зафіксували значний колагеногенез в осередках виявлення  $\text{nano-TiO}_2$  та  $\text{nano-TiO}_2\text{-Ag}$  (рис. 1Д). Дрібноосередкові кристали у паренхімі печінки, які визначали в разі введення нанопорошків у дозах 7000 мг/кг і 10000 мг/кг, спричиняли фокальний некроз гепатоцитів (рис. 1Г, 1І), паренхіма органа, архітектоніка структурно-функціональних одиниць печінки (часточки печінки) суттєво змінені.

На рис. 2 і в таблиці 2 наведено виявлені агломерати  $\text{nano-TiO}_2$  у тканині печінки за результатами СЕМ і їхній елементний склад із високим вмістом Ті. Зразки печінки проаналізували методом спектрометрії, результати наведено як поелементну картограму (табл. 2). Це дало змогу достовірно ідентифікувати наявність Ті у кристалічних включеннях, виявити дифузний розподіл Ті у тканині печінки та встановити локалізацію агломератів  $\text{nano-TiO}_2$  для наступної морфометрії.

Морфометрія показала, що розміри наночастинок і їхніх агломератів становлять від 80 нм до 20 мкм (рис. 2А, 2Б, 2В). Спектрограма дала змогу виявити 9 хімічних елементів. Наявність в спектрах 1, 2 і 3 хімічних елементів вуглецю (С), азоту (N), кисню (O), натрію (Na), магнію (Mg), алюмінію (Al) і кальцію (Ca) має біологічне походження, пов'язане з вмістом клітин тканин печінки. Титан, виявлений у спектрах, підтверджує наявність в тканині печінки наночастинок  $\text{TiO}_2$  (табл. 2).

Головні зміни морфології гепатоцитів (враховуючи посмертні зміни, аутолітичні процеси) – вакуолізація цитоплазми (оптично порожня цитоплазма гепатоцитів), пікноз ядер, збільшення кількості двоядерних гепатоцитів. Набряк гепатоцитів, різка дилатація

**Таблиця 1.** Вміст титану і срібла в печінці мишей після введення наночастинок TiO<sub>2</sub> і TiO<sub>2</sub>-Ag, медіана (95 % ВІ), мкг/г, n = 6

Група	Доза, мг/кг	Хімічний елемент, мкг/г	
		Ti	Ag
Контроль	–	0,34 (95 % ВІ 0,30–0,42)	0,003 (95 % ВІ 0,003–0,003)
Нано-TiO <sub>2</sub>	4000	124,29 (95 % ВІ 11,54–275,92)*	–
	7000	49,72 (95 % ВІ 19,09–263,19)	–
	10000	78,37 (95 % ВІ 18,17–121,67)	–
Нано-TiO <sub>2</sub> -Ag	4000	30,80 (95 % ВІ 4,60–137,80)	2,53 (95 % ВІ 1,38–3,40)*
	7000	42,77 (95 % ВІ 4,60–666,42)	2,75 (95 % ВІ 0,74–4,42)*
	10000	299,25 (95 % ВІ 7,72–449,72)*	1,75 (95 % ВІ 1,14–6,27)*

\*: p < 0,05, статистично вірогідна відмінність порівняно з контролем.

**Таблиця 2.** Результати аналізу поелементного складу в агломератах нано-TiO<sub>2</sub> в печінці (спектр 1) і контрольне дослідження біологічного зразка (спектр 2), скла (спектр 3)

Спектр	C	N	O	Na	Mg	Al	Si	Ca	Ti	Загалом
Спектр 1, Ti-вмісні об'єкти	24,5	–	40,5	0,4	–	–	1,2	0,4	33,0	100,0
Спектр 2, органічний матеріал	59,8	12,9	14,2	1,6	0,5	0,2	8,7	1,6	0,3	100,0
Спектр 3, тест-об'єкт скло	35,0	–	33,8	4,3	1,2	0,3	20,4	4,0	0,7	100,0

**Таблиця 3.** Мікроскопічні зміни печінки після внутрішньоочеревинного введення нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag

Характер змін	Тип гістопатологічних змін	Відсоток (%) домінуючих змін від загальної кількості тварин у групі під впливом нано-TiO <sub>2</sub> , n = 12	Відсоток (%) домінуючих змін від загальної кількості тварин у групі під впливом нано-TiO <sub>2</sub> -Ag, n = 10
Дистрофічні	Цитоплазматична вакуолізація (гідропічна дистрофія) в гепатоцитах	66,7	60,0
Переднекротичні	Гепатоцити з пікнозом ядер	25,0	70,0
Некротичні	Фокальні некрози	8,3	30,0
Запальні	Фокальна інфільтрація запальних клітин	8,3	20,0
Адаптаційні	Збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів	8,3	40,0

синусоїдних капілярів печінки, некроз клітин судин на 14 добу після введення нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag свідчать про їхню токсичну дію та порушення бар'єрної функції судин печінки, а отже й ураження гепатоцитів. У разі введення нано-TiO<sub>2</sub> у дозах 4000 мг/кг і 10000 мг/кг на 14 добу експерименту мікроскопічно виявляли більшу кількість двоядерних гепатоцитів порівняно зі зразками контрольної групи. Це може свідчити про певні адаптаційні та репаративні зміни в гепатоцитах.

При внутрішньоочеревинному введенні нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag відбулось розширення мікросудин паренхіми печінки, зокрема синусоїдних капілярів, центральної вени, портальної вени у триадах. Судини триад у портальних часточках різко кровонаповнені, а мікроциркуляція синусоїдними капілярами відрізнялася, була неоднорідною. Летальність лабораторних мишей після внутрішньоочеревинного введення нано-TiO<sub>2</sub>-Ag могла бути спричинена токсичною дією на клітини кровоносних судин.

Зрідка виявляли фокальну запальну інфільтрацію (макрофаги, лімфоцити). На 14 добу макрофаги фагоцитували клітинний детрит. Однак навіть у ділянках, де виявлено кристалічний чужорідний матеріал, не виникала запальна інфільтрація. Імовірність розвитку запального процесу у відповідь на внутрішньоочеревинне введення нано-TiO<sub>2</sub> та нано-TiO<sub>2</sub>-Ag невисока. TiO<sub>2</sub> може взаємодіяти з білками і ферментами в інтерстиціальному просторі печінки, спричиняючи генерацію активних форм кисню, що можуть індукувати запальну відповідь. Але у нашому

дослідженні виявлено неспецифічні явища некрозу, що домінували над імовірністю виникнення запальної реакції. Наведені зміни печінки систематизовано і наведено в *таблиці 3*.

Зробили висновок, що найбільш характерні мікроскопічні ознаки токсичної дії нано-TiO<sub>2</sub> – дистрофічні зміни на рівні 67,7 % (цитоплазматична вакуолізація в гепатоцитах), а при впливі нано-TiO<sub>2</sub>-Ag – початкові некротичні зміни на рівні 70,0 % (гепатоцити з пікнозом ядер). Зазначимо, що токсичну дію нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag значно рідше виявляли за фокальними некрозами та запальними реакціями (фокальна інфільтрація), в окремих випадках спостерігали адаптаційні зміни – збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів.

## Обговорення

Протягом дослідження порівняли вплив гострої дії нано-TiO<sub>2</sub> і нано-TiO<sub>2</sub>-Ag на токсикологічні, морфологічні зміни і вміст металів у печінці лабораторних мишей. Встановлено, що нано-TiO<sub>2</sub>-Ag більш токсичний, ніж нано-TiO<sub>2</sub> за величиною середньосмертельної дози. Показано, що зі збільшенням введеної дози (від 4000 мг/кг до 10000 мг/кг) в тканині печінки лабораторних мишей зростає накопичення титану (при дії нано-TiO<sub>2</sub>), титану та срібла (при дії нано-TiO<sub>2</sub>-Ag).

За результатами світлової мікроскопії встановили, що характерними ознаками токсичної дії нано-TiO<sub>2</sub> виявились дистрофічні зміни на рівні 67,7 % (цитоплазматична вакуолізація в гепатоцитах), а при впливі на-

но- $\text{TiO}_2$ -Ag – початкові некротичні зміни на рівні 70,0 % (гепатоцити з пікнозом ядер). Наголосимо, що токсична дія нано- $\text{TiO}_2$  і нано- $\text{TiO}_2$ -Ag значно рідше проявлялась фокальними некрозами та запальними реакціями (фокальна інфільтрація), в окремих випадках виявляли адаптаційні й репаративні зміни, зокрема збільшення кількості бінуклеарних гепатоцитів. Застосування SEM і методу картографії дало змогу виявити дифузний розподіл титану в тканині печінки та встановити локалізацію, розміри наночастинок і їхніх агломератів.

Дані, що одержали, відповідають результатам дослідження W. G. Kreyling et al. [14]: наночастинок  $\text{TiO}_2$  вибірково накопичуються, крім інших внутрішніх органів, в печінці лабораторних тварин. За даними авторів, виведення наночастинок відбувається достатньо повільно, що посилює їхній токсичний вплив на організм [14].

Результати нашого дослідження доповнюють відомості, викладені в роботі Rupal Shrivastava et al. [4]. Так, застосувавши методи електронної мікроскопії автори показали, що наночастинок накопичуються в різних компартментах гепатоцитів і клітинах Купфера.

Разом з тим, відомості, що ми встановили, відрізняються від результатів дослідження A. T. Saber et al. [15], які зробили висновок, що головним проявом токсичної дії нано- $\text{TiO}_2$  є запальні зміни в тканині печінки. Ці відмінності можна пояснити тим, що основну частину морфологічних змін ми виявили на аутопсійному матеріалі, а також різним дизайном експериментів, дозами, способами введення, різною дисперсністю наноматеріалу тощо.

Загалом результати, встановлені у цьому дослідженні, показали: потрапляння в організм високих доз нано- $\text{TiO}_2$  або нано- $\text{TiO}_2$ -Ag може бути причиною не тільки дистрофічних, запальних змін, але й некрозу паренхіми печінки. Це зумовлює необхідність продовження вивчення ролі наночастинок діоксиду титану в печінці, особливо щодо відновних процесів в органах.

## Висновки

1. Встановили залежність летальності лабораторних тварин від дози нанопорошків  $\text{TiO}_2$  і  $\text{TiO}_2$ -Ag, введених внутрішньоочеревинним шляхом. Летальність виявилась вищою при введенні композиту нано- $\text{TiO}_2$ -Ag порівняно з нано- $\text{TiO}_2$ .  $\text{LD}_{50}$  для нанопорошку  $\text{TiO}_2$  дорівнює 4783,30 мг/кг,  $\text{LD}_{50}$  для нанопорошку  $\text{TiO}_2$ -Ag – 724,44 мг/кг. Це дає підстави визначити їх до 3 класу (помірно небезпечні) небезпечності хімічних речовин за ГОСТ 12.1.007-76.

2. Нанопорошки  $\text{TiO}_2$  і  $\text{TiO}_2$ -Ag накопичуються у печінці лабораторних тварин при внутрішньоочеревинному введенні. Встановлено, що зі збільшенням введеної дози (від 4000 мг/кг до 10000 мг/кг) в тканині печінки лабораторних мишей зростає накопичення титану (при дії нано- $\text{TiO}_2$ ), титану та срібла (при дії нано- $\text{TiO}_2$ -Ag).

3. Характерні мікроскопічні ознаки токсичної дії нанопорошків  $\text{TiO}_2$  та  $\text{TiO}_2$ -Ag після внутрішньоочеревинного введення лабораторним мишам – дистрофічні зміни гепатоцитів, некроз паренхіми печінки, а запальні реакції виявляють рідше.

4. SEM і метод елементної картографії титану підтвердив наявність наночастинок  $\text{TiO}_2$  та їхніх агломератів у тканині печінки при введенні нанопорошку  $\text{TiO}_2$ .

**Перспективи подальших досліджень.** Результати експериментальних досліджень будуть враховані під час обґрунтування гранично допустимого вмісту нанопорошків  $\text{TiO}_2$  та  $\text{TiO}_2$ -Ag у повітрі робочої зони підприємств з їх одержання та застосування.

## Подяка

Висловлюємо вдячність за допомогу у виконанні сканувальної електронної мікроскопії завідувачу лабораторії електронної мікроскопії № 43 Інституту металознавства імені Г. В. Курдюмова НАН України М. А. Скоріку.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 27.04.2023

Після доопрацювання / Revised: 08.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 21.06.2023

## Відомості про авторів:

Яворовський О. П., д-р мед. наук, професор, зав. каф. гігієни та екології № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ; академік Національної академії медичних наук України.

ORCID ID: 0000-0002-4573-8039

Савосько С. І., канд. біол. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5145-2195

Рябовол В. М., аспірант, асистент каф. гігієни та екології № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-1582-7188

Зінченко Т. О., канд. мед. наук, доцент каф. гігієни та екології № 2, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6652-2800

## Information about authors:

Yavorovskiy O. P., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Hygiene and Ecology 2, Bogomolets National Medical University, Kyiv; Academician of National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Savosko S. I., PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Riabovol V. M., Postgraduate Student, Assistant of the Department of Hygiene and Ecology 2, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Zinchenko T. O., PhD, Associate Professor of the Department of Hygiene and Ecology 2, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

## References

- Zahorniy, M. M., Yavorovsky, O. P., Riabovol, V. M., Tyschenko, N. I., Lobunets, T. F., Tomila, T. V., Shirokov, O. V., Ragulya A. V. (2022). Morfolohichni, spektralni y toksykologichni osoblyvosti novoho kompozytno-ho materialu nanodioksydu tytanu z nanosriblom dlia vykorystannia v medytsyni ta biolohii [Morphological, spectral and toxicological features of new composite material of titanium nanodioxide with nanosilver for use in medicine and biology]. *Medycini Perspektivi*, 27(1), 152-159. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2022.1.254381>
- Pankivska, Yu. B., Biliavska, L. O., Povnitsa, O. Yu., Zagorniy, M. M., Ragulya, A. V., Kharchuk, M. S., & Zagorodnya, S. D. (2019). Antyade-

- novirusna aktyvnist nanochastynok dioksydu tytanu [Antiadenoviral activity of titanium dioxide nanoparticles]. *Mikrobiolohichniy zhurnal*, 81(5), 73-84. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.05.073>
3. Ahmadpour Kermani, S., Salari, S., & Ghasemi Nejad Almani, P. (2021). Comparison of antifungal and cytotoxicity activities of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles with amphotericin B against different *Candida* species: In vitro evaluation. *Journal of clinical laboratory analysis*, 35(1), e23577. <https://doi.org/10.1002/jcla.23577>
  4. Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., & Flora, S. J. (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub>, ZnO and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug and chemical toxicology*, 37(3), 336-347. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.866134>
  5. Hong, F., Ji, J., Ze, X., Zhou, Y., & Ze, Y. (2020). Liver Inflammation and Fibrosis Induced by Long-Term Exposure to Nano Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) Nanoparticles in Mice and Its Molecular Mechanism. *Journal of biomedical nanotechnology*, 16(5), 616-625. <https://doi.org/10.1166/jbn.2020.2921>
  6. Jia, X., Wang, S., Zhou, L., & Sun, L. (2017). The Potential Liver, Brain, and Embryo Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles on Mice. *Nanoscale research letters*, 12(1), 478. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2242-2>
  7. Minchenko, D. O., Tsymbal, D. O., Yavorovsky, O. P., Solokha, N. V., & Minchenko, O. H. (2017). Expression of genes encoding IGFBPs, SNARK, CD36, and PECAM1 in the liver of mice treated with chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles. *Endocrine regulations*, 51(2), 84-95. <https://doi.org/10.1515/enr-2017-0008>
  8. Yavorovskiy, O., Omelchuk, S., Sokurenko, L., Zinchenko, T., Solokha, N., Aleksichuk, V., & Brukhno, R. (2019). Environmental and occupational hazards of metal nanocompounds production and application: hygienic, clinical and toxicological aspects. *Wiadomosci lekarskie*, 72(8), 1504-1511.
  9. Apte, U., Krishnamurthy, P. (2011). Detoxification Functions of the Liver. In: S. Monga (Ed.). *Molecular Pathology of Liver Diseases* (Vol. 5, pp. 147-163). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7107-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7107-4_11)
  10. Grant, D. M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *Journal of inherited metabolic disease*, 14(4), 421-430. <https://doi.org/10.1007/BF01797915>
  11. Riabovol, V. M. (2020). Osoblyvosti budovy, fizyko-khimichnykh i toksykolohichnykh vlastyvoitei nanochastynok dioksydu tytanu, odezhanoho za tekhnolohiieiu termichnoho rozkladu (literaturnyi ohliad i vlasni doslidzhennia) [Features of structure, physico-chemical and toxicological properties of titanium dioxide nanoparticles obtained by thermal decomposition technology (literary review and own research)]. *Dovkilia ta zdorovia*, (4), 63-70. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.32402/dovkil2020.04.063>
  12. Modrzynska, J., Mortensen, A., Berthing, T., Ravn-Haren, G., Szarek, J., Saber, A. T., & Vogel, U. (2021). Effect on Mouse Liver Morphology of CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and Carbon Black Nanoparticles Translocated from Lungs or Deposited Intravenously. *Applied Nano*, 2(3), 222-241. <https://doi.org/10.3390/applnano2030016>
  13. Antononov, M. Iu. (2018). *Matematycheskaia obrabotka y analiz medyko-byolohycheskykh dannykh* [Mathematical processing and analysis of biomedical data]. Kyiv: MYTs "Medinform". [in Russian].
  14. Kreyling, W. G., Holzwarth, U., Haberl, N., Kozempel, J., Hirn, S., Wenk, A., Schleh, C., Schäffler, M., Lipka, J., Semmler-Behnke, M., & Gibson, N. (2017). Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats: Part 1. *Nanotoxicology*, 11(4), 434-442. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306892>
  15. Saber, A. T., Jacobsen, N. R., Mortensen, A., Szarek, J., Jackson, P., Madsen, A. M., Jensen, K. A., Koponen, I. K., Brunborg, G., Gützkow, K. B., Vogel, U., & Wallin, H. (2012). Nanotitanium dioxide toxicity in mouse lung is reduced in sanding dust from paint. *Particle and fibre toxicology*, 9, 4. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-4>