

## К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА ВНУТРЕННИЕ ОРГАНЫ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

*Петрицкая Е.Н.<sup>1</sup>, Рогаткин Д.А.<sup>1</sup>,  
Абаева Л.Ф.<sup>1</sup>, Елисеев А.А.<sup>2</sup>, Гаврилов А.И.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ГУ МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского,  
<sup>2</sup>ФНМ МГУ

Активное внедрение наноматериалов в клиническую медицину требует глубокого знания потенциальных рисков и побочных эффектов, возникающих при использовании этих материалов. Для этого необходимо знать «токсикологию наночастиц».

По литературным данным DL50 наночастиц TiO<sub>2</sub> для крыс перорально составляет более 12000 мг/кг. Последние исследования Роберта Шистл показали, что наночастицы TiO<sub>2</sub> могут обладать канцерогенным действием для организма (8).

В экспериментах *in vivo* наблюдали увеличение массы печени и некроз гепатоцитов при воздействии наночастиц TiO<sub>2</sub> размером 80 нм, а также длительный период их полувыведения, поскольку они практически не выводятся почками (1, 6). Oberdorster et al. (10) отмечают, что период полувыведения из легких крыс составляет от 117 до 541 дня в зависимости от размера наночастиц (250–25 нм соответственно).

Однократное пероральное введение наночастиц TiO<sub>2</sub> размером 25 нм и 80 нм в дозе 5000 мг/кг в опытах *in vivo* вызывало их накопление в селезенке, почках и легких, повышение в сыворотке крови лактатдегидрогеназы и  $\alpha$ -гидроксибутират-дегидрогеназы (25 нм), а также увеличение массы печени и некроз гепатоцитов (80 нм) (2).

Исследование длительного перорального воздействия наночастиц диоксида титана не проводилось. Кроме того, наночастицы TiO<sub>2</sub> могут быть разной формы – кристаллические и мезопористые, разных размеров и концентраций.

Учитывая выше изложенное, следует отметить актуальность исследования возможной токсичности наночастиц TiO<sub>2</sub> разных видов и концентрации при пероральном поступлении в организм, оценки степени потенциального вреда здоровью населения и персонала производств, в том числе и при длительном пероральном введении растворов разной концентрации.

Целью нашего исследования являлось исследование возможной токсичности наночастиц TiO<sub>2</sub> двух видов: кристаллического и мезопористого при длительном пероральном введении в организм подопытных животных растворов наночастиц TiO<sub>2</sub> разных концентраций и размеров наночастиц. Работа проводилась совместно с действующим

Центром коллективного пользования «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование» ФНМ МГУ. Указанный центр оснащен современным оборудованием, предназначенным для решения широкого спектра научно-исследовательских задач, в том числе, связанных с получением новых классов наноматериалов и нанокмполитов.

Для приготовления исходных растворов использовали следующие реактивы: TiCl<sub>4</sub> (ч.д.а.), NH<sub>3</sub> 25% (ч.д.а.), HCl (ч.д.а.), дистиллированную воду. Аморфный гель диоксида титана TiO<sub>2</sub> · nH<sub>2</sub>O получали по методике: в определенное количество концентрированной соляной кислоты по каплям добавляли тетрагидрохлорид титана в молярном соотношении HCl:TiCl<sub>4</sub> = 2:1, что приводило к образованию комплекса состава H<sub>2</sub>TiCl<sub>6</sub>. Затем при перемешивании приливали к избытку раствора аммиака раствор H<sub>2</sub>TiCl<sub>6</sub>, в результате гидролиза которого получали белый аморфный осадок состава TiO<sub>2</sub> · nH<sub>2</sub>O. Этот осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре, отмывали в течение длительного времени от хлорид-ионов разбавленным раствором аммиака (до отсутствия реакции с раствором нитрата серебра), а затем дистиллированной водой. Аморфный гель TiO<sub>2</sub> · nH<sub>2</sub>O подвергали гидротермальной (ГТ) обработке в водной среде при температуре 250°C и продолжительности синтеза 6 ч. ГТ синтез проводился в автоклаве Parg 4590 с тефлоновой ячейкой объемом 60 мл (степень заполнения 80%). Автоклав нагревали с постоянной скоростью 3°C/мин в печи сопротивления до температуры изотермической выдержки. По окончании синтеза автоклав охлаждали на воздухе вне печи до комнатной температуры. Синтезированные образцы извлекали, 4–5 раз промывали дистиллированной водой, затем высушивали при 40–50°C. Продукт синтеза отделяли центрифугированием и промывали несколько раз дистиллированной водой.

Мезопористый диоксид титана получали следующим образом: навеску триблоксополимера P123(EО<sub>20</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>20</sub>), растворяли в дистиллированной воде. К полученному раствору для создания кислой среды (pH ≈ 2) добавляли HNO<sub>3</sub>. Затем по каплям при перемешивании на магнитной

мешалке приливали  $Ti(O^iPr)_4$ , что приводило к образованию белой суспензии. Мольное соотношение реагентов в смеси соответствовало:  $1Ti(O^iPr)_4:0,016P123:14,79HNO_3:0,01NH_4F$ :

$164,35H_2O$ . Присутствие  $NH_4F$  в реакционной смеси было необходимо для увеличения эффективности поликонденсации. В ходе гидролиза образцы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне Elmasonic, (мощность 430 Вт, рабочая частота 35 кГц). Обработку проводили по простейшей 1 часа от начала гидролиза образца по 3 раза в течение 10 минут, с перерывом 10 минут, чтобы предотвратить перегрев прибора. После этого суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 72 часов, затем центрифугировали и промывали дистиллированной водой (4 раза по 100 мл), до нейтрального *pH* и высушивали на воздухе при 100°C.

Исследование токсичности проводили на трехнедельных нелинейных мышах-самках ICR весом 11–13 г. В эксперименте участвовали 5 групп животных: первая группа – контрольная, вторая группа – разведение раствора наночастиц  $TiO_2$  кристаллического размером 30 нм с концентрацией 100 мг/л, третья – разведение наночастиц  $TiO_2$  кристаллического размером 30 нм с концентрацией 50 мг/л, четвертая – разведение  $TiO_2$  мезопористого размером 100 нм с концентрацией 100 мг/л, пятая – разведение  $TiO_2$  мезопористого размером 100 нм с концентрацией 50 мг/л. В каждой группе было по 10 мышей. Раствор наночастиц давали вместо питьевой воды в течение 5 месяцев, ежедневно регистрируя вес и количество выпитой жидкости во всех пяти группах. Емкости с растворами регулярно встряхивались для предотвращения образования конгломератов. Животные получали ежедневно свежий раствор наночастиц с учетом норм потребления суточного количества воды. По окончании эксперимента всех животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Извлекали сердце, печень, почки и селезенку, определяли их массу. Для оценки предполагаемого токсического влияния наночастиц  $TiO_2$  проводили морфологическое исследование тканей внутренних органов. Полученные мазки высушивали на воздухе, окрашивали методом Паппенгейма. Исследовали материал методом световой микроскопии, объективы 10 ×, 40 ×, 100 ×.

В результате полученных данных был отмечен нормальный прирост массы тела животных во всех группах: на 13–16 г (до 24–29 г). Внешний вид и поведение экспериментальных групп животных практически не отличалось по сравнению с контрольной группой. Надо отметить увеличение веса печени и почек у всех экспериментальных групп животных.

Исследование мазков-отпечатков органов животных контрольной группы показало: в тканях селезенки – элементы лимфоидной ткани разной степени зрелости, в тканях легких – на фоне элементов крови небольшое количество клеток респираторного эпителия и лейкоцитов (нейтрофилов и лимфоцитов), в печени – на фоне элементов крови группы гепатоцитов, единичные в редких полях зрения, в почке – на фоне элементов крови скопление клеток эпителия почечной ткани небольших размеров, кубической формы и группы крупных клеток округлой формы со светлой цитоплазмой.

При приеме раствора наночастиц кристаллического  $TiO_2$  в концентрации 100 и 50 мг/л в течение 2 месяцев, цитологическая картина в мазках-отпечатках органов мышей показала отсутствие патологических изменений, а принимавших в течение 5 месяцев – в селезенке обнаружены элементы лимфоидной ткани разной степени зрелости, в тканях легкого – немногочисленные эпителиальные клетки респираторного эпителия и умеренно выраженная лимфоидно-плазмноклеточная инфильтрация; в тканях печени и почки – клетки с признаками пролиферации, о чем говорят многочисленные клетки с ядрышками и умеренное количество дистрофически измененных клеток в виде «голых» ядер.

При исследовании воздействия раствора наночастиц  $TiO_2$  мезопористого с концентрацией 100 мг/л и 50 мг/л в течение 2 месяцев изменений в органах не были выявлены, а при приеме наночастиц  $TiO_2$  в течение 5 месяцев была отмечена гиперплазия лимфоидной ткани селезенки, пролиферация гепатоцитов, слабовыраженная лимфоидно-плазмноклеточная инфильтрация тканей легкого, а клетки почечного эпителия были без особенностей, что являлось отличием от воздействия  $TiO_2$  кристаллического.

В рамках проведенных нами исследованиях можно сделать вывод, что наночастицы  $TiO_2$  обладают токсичностью, продолжительность приема наночастиц имеет важное значение вызывая выраженные патоморфологические изменения в печени, селезенке, о чем, например, говорит появление дистрофически измененных клеток в виде «голых» ядер. Надо отметить, что более выраженные изменения были при приеме кристаллических наночастиц  $TiO_2$ , когда наблюдались изменения и в почках, чего не было при исследовании наночастиц мезопористого  $TiO_2$ .

Изучение токсичности наночастиц  $TiO_2$  имеет важное значение для здоровья работающих на производстве наночастиц, в исследовательских центрах. Исследования в этом направлении продолжаются.

**Список литературы**

1. *Schiestl R.* et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability in vivo in Mice, *Cancer Res.*, 15, 2009, 69, 8784.

2. *Chen Z., Meng H., Xing G.* et al. Acute toxicological affects of copper nanoparticles in vivo //The journal of physical chemistry. *Toxicology letters*, 2006. – 163. – 109–120.

3. *Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L.* Pulmonary toxicity studies with TiO<sub>2</sub> particles containing various commercial coatings. *Toxicologist*. 2003; 72: No.1 page 298A.

4. *Jiang J., Oberdorster G., Elder A., Gelein R., Mercer P., Biswas P.* Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? // *Nanotoxicology* 2005. Vol.2. Iss.1. PP.33–42.

5. *Hoet P.M., Bruske-Hohlfeld I., Salata O.V.* Nanoparticles – known and unknown health risks // *Journal of Nanobiotechnology*, 2004, 2–12.