

Токсическое влияние наночастиц диоксида титана на морфологические характеристики тимуса

Люция Ахтямовна Шарафутдинова^{1*}, Кирилл Николаевич Синельников¹,
Виктор Владимирович Валиуллин²

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Реферат

Цель. Изучение влияния наночастиц диоксида титана при их пероральном введении на морфофункциональное состояние вилочковой железы крыс.

Методы. В данной работе с использованием классических морфологических подходов и специфичных маркеров: пролиферации — Ki-67, апоптоза — белка p53 и макрофагов — CD68, позволяющих адекватно идентифицировать не только сами клетки, но и их функциональное состояние, проведено исследование тимуса крыс после перорального введения (10 мг/кг массы тела животного, 28 дней) нанодисперсной формы TiO₂ (рутильная форма, 40–60 нм), полученной разведением порошка TiO₂ в дистиллированной воде. Агрегацию наночастиц предотвращали обработкой суспензии нанодисперсного TiO₂ в ультразвуковой ванне. Крысам контрольной группы перорально вводили дистиллированную воду в том же объеме. Серийные парафиновые срезы тимуса окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван Гизону, проводили иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к Ki-67, CD68, p53.

Результаты. Выявлены существенные изменения ткани вилочковой железы при воздействии НЧ TiO₂. В тимусе экспериментальных животных установлено уменьшение доли коркового вещества на 17,6%, отмечается значительное снижение плотности клеточной популяции за счет уменьшения количества тимоцитов. Иммуногистохимическое типирование позволило обнаружить, что в условиях воздействия НЧ TiO₂ наблюдается снижение числа Ki-67-позитивных клеток в корковом веществе дольки вилочковой железы, что говорит об угнетении процессов пролиферации в этих условиях. На фоне воздействия НЧ TiO₂ обнаружено увеличение в 5,18 раз количества клеток, вступающих в апоптоз в корковом веществе дольки тимуса опытной группы, о чем свидетельствуют результаты иммуногистохимического исследования экспрессии маркера апоптоза белка p53. Возможно, в качестве компенсаторного механизма происходит выраженное увеличение количества макрофагов, на что указывает повышение среднего числа CD68-иммунопозитивных клеток в корковом веществе тимуса опытной группы в 2,61, а в мозговом веществе — в 1,35 раз.

Вывод. Обнаруженные морфофункциональные изменения тимуса при пероральном введении наночастиц TiO₂ свидетельствуют об их иммуносупрессивном действии.

Ключевые слова: наночастицы диоксида титана, тимус, Ki-67, CD68, p53.

Для цитирования: Шарафутдинова Л.А., Синельников К.Н., Валиуллин В.В. Токсическое влияние наночастиц диоксида титана на морфологические характеристики тимуса. *Казанский мед. ж.* 2018; 99 (6): 947–953. DOI: 10.17816/KMJ2018-947.

Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on morphological characteristics of thymus

L.A. Sharafutdinova¹, K.N. Sinel'nikov¹, V.V. Valiullin²

¹Bashkir State University, Ufa, Russia;

²Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Abstract

Aim. Study of effects of titanium dioxide nanoparticles administered orally on the rodent thymus morphological and functional state.

Methods. The study used classical morphological approaches and specific markers of proliferation — Ki-67,

apoptosis — p53 protein and macrophages — CD68, which allow adequately identifying not only the cells themselves, but also their functional state. The rodent thymus was analyzed after oral administration (10 mg/kg of body weight of the animal, 28 days) of the TiO_2 nanoparticles (rutile form, 40–60 nm) obtained by diluting the TiO_2 powder in distilled water. Aggregation of the nanoparticles was prevented by processing a suspension of nanodispersed TiO_2 in an ultrasonic bath. The rats of the control group were orally injected with distilled water in the same volume. Serial paraffin sections of the thymus were stained with hematoxylin-eosin, picrofuxin according to Van Gieson, immunohistochemical staining was performed with antibodies to Ki-67, CD68, p53.

Results. Significant changes of the tissue of thymus gland under the influence of TiO_2 nanoparticles were revealed. In the thymus of experimental animals, a decrease in the proportion of cortex was found to be 17.6%, a significant decrease in the density of the cell population due to decrease in the number of thymocytes was demonstrated. Immunohistochemical typing revealed that under the influence of TiO_2 nanoparticles, a decrease in the number of Ki-67-positive cells in the cortex of the lobule of the thymus gland was observed, which indicates the inhibition of proliferation in these conditions. Under the influence of TiO_2 nanoparticles, an increase of the amount of cells entering apoptosis in the cortex of the thymus segment of the experimental group by 5.18 times was observed, as evidenced by the results of immunohistochemical study of the expression of apoptosis marker p53 protein. Perhaps, as a compensatory mechanism there is a pronounced increase in the number of macrophages, as indicated by an increase in the average number of CD68 immunopositive cells in the cortex of the thymus of the test group by 2.61, and in the brain substance by 1.35.

Conclusion. The revealed morphological and functional changes of the thymus with oral administration of TiO_2 nanoparticles indicate their immunosuppressive effect.

Keywords: titanium dioxide nanoparticles, thymus, Ki-67, CD68, p53.

For citation: Sharafutdinova L.A., Sinel'nikov K.N., Valiullin V.V. Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on morphological characteristics of thymus. *Kazan medical journal*. 2018; 99 (6): 947–953. DOI: 10.17816/KMJ2018-947.

К наночастицам (НЧ) относят 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 обуславливает их широкое использование в различных отраслях промышленности и биомедицине. Вместе с тем существует оправданное опасение, что их небольшие размеры являются причиной беспрепятственного прохождения через биологические барьеры, а очень высокая удельная поверхность (в расчете на единицу массы) и реакционная способность могут привести к увеличению продукции активных форм кислорода и далее к повреждению биологических структур.

Среди применяемых в настоящее время наноматериалов широко используются НЧ диоксида титана (TiO_2). 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_2 на различные органы и ткани определяет высокий интерес исследователей к биологической безопасности их использования. При этом последствия повреждения различных клеточных типов организма и причины такой уязвимости к воздействию НЧ практически не исследованы.

Неблагоприятное воздействие НЧ TiO_2 на клетки и ткани человека может проявиться как в производственных условиях, так и в результате преднамеренного использования, связанного с их включением в состав продовольственных, промышленных и фармакологических товаров. В настоящее время НЧ TiO_2 широко используются для производства красок, бумаги, пластмасс, чернил, лекарственных препаратов, продуктов (пищевая добавка E171), косметики, зубных паст, солнцезащитных кремов и т.д. [1]. К пищевым продуктам с высоким содержанием НЧ TiO_2 относятся жевательные резинки и леденцы [2]. По данным просвечивающей электронной микроскопии около 36 % частиц в составе E171 имеют размер меньше, чем 100 нм [3]. Однако следует подчеркнуть, что исследования по безопасности НЧ существенно отстают от масштабного их использования. Несмотря на то, что наноматериалы активно используются уже более 15 лет, ни один из них не был изучен в полном объеме на безопасность ни в одной стране мира. Вместе с тем для подавляющего большинства токсикологов очевидно, что наночастицы должны рассматриваться как потенциально опасные материалы [4]. Для дальнейшего безопасного развития нанотехнологий и их внедрения во все сферы жизни необходимо углублять представления о структуре и свойствах нанообъектов, выявлять фундаментальные принципы и закономерности их

поведения и воздействия на окружающую среду и живые организмы.

Среди различных систем организма наиболее уязвимой к любым неблагоприятным воздействиям является иммунная система. Уже хорошо известно, что результатом негативного воздействия различных НЧ на иммунную систему человека является угнетение ее функций и, как следствие этого, увеличение частоты и тяжести инфекционных заболеваний, а также повышение риска злокачественных новообразований [5]. Кроме того, нарушение иммунологических функций организма, вызванное воздействием НЧ, может спровоцировать развитие аллергических и аутоиммунных заболеваний [6]. Такая иммуносупрессия связана, в том числе, и с процессами, происходящими в этих условиях в тимусе [7, 8], который является одним из ключевых звеньев иммунной системы, обеспечивающих антигеннезависимую дифференцировку Т-лимфоцитов и секрецию гормонов, поддерживающих численность этих клеток. По этой причине тимус особенно восприимчив к действию различных токсикантов как за счет непосредственного контакта с ними, так и за счет высвобождения высоких доз глюкокортикоидов, являясь следствием воздействия НЧ [9, 10].

Таким образом, структурно-функциональные изменения в тимусе, возникающие на фоне воздействия различных токсикантов, являются важными показателями их иммунотоксичности. Однако до сих пор нет достаточных сведений о клеточных основах нарушений в этой железе при воздействии наноматериалов, в частности НЧ TiO_2 , что объясняется в том числе и низкой информативностью классических морфологических подходов. Использование иммуногистохимических методов при адекватном подборе маркеров позволяет корректно идентифицировать как клеточный состав, так и функциональные изменения клеток тимуса, возникающие на фоне введения этих НЧ. В нашей работе с использованием специфичных маркеров пролиферации клеток (Ki-67), апоптоза (p53) и специфичного маркера макрофагов (CD68) проведено исследование тимуса крыс после перорального введения наночастиц TiO_2 .

Цель исследования — изучение влияния наночастиц диоксида титана на морфофункциональное состояние вилочковой железы крыс при их пероральном введении.

Объектом исследования являлся тимус половозрелых самцов крыс линии Wistar массой 170–210 г ($n=24$). Исследование влияния НЧ

TiO_2 на морфофункциональные показатели тимуса проводили после перорального введения крысам опытной группы изучаемого соединения (10 мг/кг массы тела животного, ежедневно в течение 28 дней). Крысам контрольной группы перорально вводили дистиллированную воду в том же объеме. Животных выводили из эксперимента на 30-й день опыта путем декапитации под эфирным наркозом с соблюдением основных требований к эвтаназии, изложенных в Приложении № 4 к «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Всех животных содержали в одинаковых условиях вивария на стандартном сбалансированном рационе, 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. Исследование одобрено Локальным Этическим комитетом ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН (протокол № 2 от 25 апреля 2016 г.). 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.

Забор и фиксацию материала проводили согласно общепринятой методике. Для гистологического исследования готовили парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван Гизону и изучали с помощью микроскопа Axiolmager Z1 (C. Zeiss, Германия). Определяли относительную площадь (%), занимаемую корковым и мозговым веществом, общее число клеток на площади 100 мкм². С целью идентификации различных клеточных элементов в структурно-функциональных зонах тимуса и оценки его функционального состояния применяли иммуногистохимический метод окрашивания срезов (4–6 мкм) с использованием моноклональных антител, маркера пролиферации клеток — Ki-67 (MKI67), апоптоза — p53 (FL-393), специфичного маркера макрофагов — CD68 (клон ED1) (SantaCruz-Biotechnology, 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), ядра и цитоплазмы (для маркера p53). Количество клеток, экспрессирующих изучаемые маркеры, выражали в виде среднего

числа Ki-67-, p53- и CD68-иммунопозитивных клеток. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием лицензионного пакета прикладных программ Statistica V7.0 (Stat Soft Inc., США). В модуле «Основные статистики» («Basic Statistics») по всем изученным количественным показателям были подсчитаны следующие основные характеристики: выборочное среднее (Mean), стандартную ошибку среднего (Standard Error of Mean) и стандартное отклонение (Standard Deviation). Поскольку распределение признаков в группах, оцененное с помощью критерия Шапиро — Уилка (Shapiro — Wilk's W-test), соответствовало закону нормального распределения, для сравнительного анализа групп использовали параметрические методы (t-критерий Стьюдента). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Изучение препаратов тимуса, окрашенных гематоксилин-эозином, показало, что в контрольной группе он имеет типичное дольчатое строение, характерное для этого вида животных. Исследование структурных особенностей тимуса животных опытной группы позволило выявить морфологические изменения со стороны паренхиматозного и стромально-сосудистого компонентов органа. Структурные преобразования тимуса крыс на фоне воздействия НЧ TiO_2 проявлялись в увеличении количества соединительно-тканного компонента (рис. 1–1), выраженном утолщении капсулы и междольковых перегородок, расширении и полнокровии сосудов микроциркуляторного русла с явлениями стаза/сладжа эритроцитов, что, возможно, связано с отеком. Морфометрический анализ тимуса контрольной группы показал, что площади субкапсулярной зоны и глубокой зоны коры, а также мозгового вещества дольки существенно изменяются по сравнению с аналогичными показателями животных интактной группы (табл. 1). Так, в тимусе экспериментальных животных установлено уменьшение доли коркового вещества на 17,6% ($p = 0,024$). Вместе с тем в этой зоне тимуса отмечается значительное снижение плотности клеточной популяции за счет уменьшения количества тимоцитов: число лимфоцитов на единицу площади в субкапсулярной зоне снижается на 26,7%, а в глубоком корковом веществе — на 19,3%.

Вероятно, уменьшение плотности клеток за счет сокращения числа лимфоцитов в тимусе опытной группы животных связано с падением их пролиферативного потенциала, что нашло подтверждение в результатах оценки уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Иммуногистохимическое типирование позво-

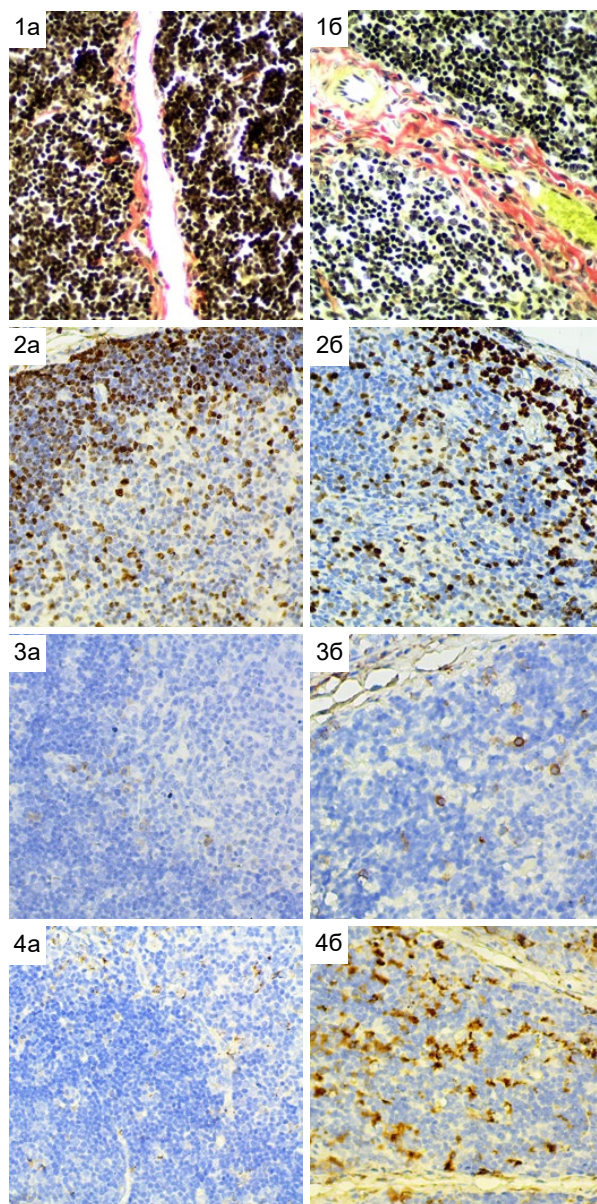


Рис. 1. Тимус крысы контрольной (А) и опытной (Б) групп животных

Примечание: 1 — окраска по Ван Гизону; 2 — иммуногистохимическое окрашивание антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (Ki-67). Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.100; 3 — иммуногистохимическое окрашивание антителами к белку p53. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.100; 4 — иммуногистохимическое окрашивание антителами к CD68-маркеру макрофагов. Непрямая стрептавидин-биотиновая система детекции. Ув.100.

лило обнаружить, что в условиях воздействия НЧ TiO_2 наблюдается снижение числа Ki-67-позитивных клеток в корковом веществе долек вилочковой железы ($p = 0,013$) (табл. 2, рис. 1–2).

На фоне воздействия НЧ TiO_2 количество клеток, экспрессирующих p53 в корковом

Таблица 1. Площади (%) морфофункциональных зон тимуса контрольной и опытной групп животных ($M \pm Sd$)

Морфофункциональные зоны тимуса		Контроль	Опыт (30 дней)
Корковое вещество	Субкапсулярное вещество	$6,7 \pm 1,65$	$5,10 \pm 0,83^*$
	Глубокая кора	$70,5 \pm 8,02$	$54,50 \pm 5,30^*$
Мозговое вещество		$22,8 \pm 1,9$	$40,40 \pm 3,15^*$

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

Таблица 2. Среднее число Ki-67- и p53-иммунопозитивных клеток в морфофункциональных зонах долек тимуса контрольных и опытных групп животных ($M \pm Sd$)

Морфофункциональные зоны тимуса	Ki-67		p53	
	Контроль	Опыт (30 дней)	Контроль	Опыт (30 дней)
Корковое вещество	$143,1 \pm 10,81$	$128,2 \pm 11,92^*$	$3,41 \pm 0,64$	$17,69 \pm 3,3^*$
Мозговое вещество	$144,0 \pm 36,33$	$160,40 \pm 24,62$	$2,76 \pm 0,61$	$2,62 \pm 0,9$

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

веществе дольки тимуса опытной группы животных, значительно увеличилось по сравнению с аналогичным показателем интактных крыс, тогда как в мозговом веществе уровень экспрессии p53 остался примерно на прежнем уровне (табл. 2, рис. 1–3), что нашло подтверждение в том числе и при изучении препаратов тимуса опытной группы животных, окрашенных гематоксилин-эозином, где в дольках железы определялось увеличение клеток с признаками деструкции.

Как уже было отмечено выше, важнейшим клеточным типом тимуса являются макрофаги, участвующие как в антигеннезависимой дифференцировке Т-лимфоцитов, так и в селекции плохо обученных клеток. Изменение количества макрофагов может свидетельствовать об эффективности функционирования тимуса. У животных опытной группы при иммуногистохимической оценке уровня экспрессии маркера макрофагов CD68 в тимусе обнаруживается тенденция к увеличению количества макрофагов (рис. 1–4). Среднее число CD68-иммунопозитивных клеток в корковом веществе тимуса опытной группы увеличилось в 2,61 раза, а в мозговом веществе — в 1,35 раза. Это может быть связано суказанными выше реактивными изменениями в микроциркуляторном русле органа и, как следствие этого, с увеличением количества мигрирующих моноцитов в тимус.

Таким образом, нами установлено, что под воздействием НЧ TiO_2 в тимусе крыс обнаруживаются реактивные изменения, заключающиеся в гибели лимфоцитов, уменьшении их относительной плотности в корковом веществе долек органа, увеличении объема междольковой

соединительной ткани, возможном нарушении гемодинамики. Поскольку тимус обеспечивает дифференцировку тимоцитов и синтез гормонов, регулирующих созревание лимфоцитов, то площадь субкапсулярной зоны коры является одним из показателей функциональной активности органа. Обнаруженное нами уменьшение площади коркового вещества тимуса при воздействии НЧ TiO_2 , возможно, свидетельствует о снижении функциональных возможностей этой железы и угнетении лимфоцитопоза и дифференцировки лимфоцитов в нем. Уменьшение числа лимфоцитов в корковом веществе тимуса может привести к сокращению их популяции в периферической крови. Таким образом, НЧ TiO_2 в изученной концентрации оказывают ингибирующий эффект на функциональную активность тимуса, и, как следствие этого, по-видимому, происходит угнетение как клеточного, так и гуморального иммунных ответов.

Морфологические изменения тимуса под воздействием НЧ TiO_2 могут быть связаны в том числе с повреждением ДНК лимфоцитов, что проявляется в снижении их пролиферативной активности и усилении апоптоза. Это нашло подтверждение в результатах проведенного исследования. Наши данные согласуются данными проведенных в последние годы исследований токсического действия НЧ TiO_2 на других моделях, свидетельствующие об иммуносупрессивном действии последних. Так, при изучении влияния внутрибрюшинного введения мышам в течение четырех недель НЧ TiO_2 на иммунные клетки и рост клеток меланомы (B16/F10) Moon E.Y., et al. (2011 г.) обнаружили угнетение пролиферации В- и Т-лимфоцитов, усиление процессов апоптоза различных видов клеток,

активацию макрофагов, а также значительное увеличение размера опухоли [11]. В другой работе внутрижелудочное введение НЧ TiO_2 значительно снижало пролиферацию CD4^+ и CD8^+ Т-клеток, а также их соотношение в печени мышей, что в конечном итоге приводило к подавлению иммунного ответа [12].

Известно, что эпителиальные клетки тимуса продуцируют и секретируют целый спектр гормонов, к которым принадлежат тималин, тимозин и тимопоэтин. Гормоны тимуса принимают участие в создании специфической внутренней среды тимуса, где пролиферируют и созревают лимфоциты, и таким образом влияют на антигеннезависимый и антигензависимый этапы дифференцировки Т-лимфоцитов, созревание регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов в тимусе, функциональные свойства Т-лимфоцитов, активность макрофагов и т.д. Полученные нами данные могут свидетельствовать не только о прямом действии НЧ на клетки тимуса, но и возможный вклад в эти процессы может внести нарушение уровня гормональной активности.

Токсичность НЧ TiO_2 и молекулярные механизмы их действия на различные ткани организма в последние годы активно изучаются, однако до сих пор нет полной картины последствий их влияния на организм. Вместе с тем в исследованиях *in vitro* показано [13, 14] — воздействие различных НЧ приводит к повышенной генерации активных форм кислорода во многих клетках организма, что является одним из повреждающих факторов для большинства изученных клеток. Применительно к НЧ TiO_2 обнаружено, что их воздействие приводит к усилению перекисного окисления липидов, активации ряда каспаз, в конечном итоге к повреждению ДНК. Как следствие этого — последующая гибель клеток [15].

В качестве одной из причин иммуносупрессивного эффекта НЧ TiO_2 , как уже отмечалось выше, рассматривается индукция образования активных форм кислорода в большинстве различных клеточных типов организма, а иммунокомпетентные клетки являются высокочувствительными к действию свободных радикалов, которые вызывают в них развитие окислительного стресса и, по-видимому, способствуют угнетению иммунитета [16]. Полученные данные указывают на то, что в предложенных условиях усиление процессов апоптоза значительно превосходит репаративный потенциал железы, что и определяет деструктивные процессы в органе, которые были нами обнаружены.

ВЫВОД

Таким образом, можно утверждать, что среди механизмов реализации токсического влияния НЧ TiO_2 важное значение имеют увеличение интенсивности апоптоза, угнетение пролиферации и дифференцировки лимфоцитов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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; 16 (6): 397–404. DOI: 10.29252/ijrm.16.6.397.
2. Winkler H.C., Notter T., Meyer U., Naegeli H. Critical review of the safety assessment of titanium dioxide additives in food. *J. Nanobiotechnology*. 2018; 16: 51. DOI: 10.1186/s12951-018-0376-8.
3. Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46: 2242–2250. DOI: 10.1021/es204168d.
4. Ковалева Н.Ю., Раевская Е.Г., Рощин А.В. Проблемы безопасности наноматериалов: нанобезопасность, нанотоксикология, наноинформатика. *Химическая безопасность*. 2017; 1 (2): 44–87. [Kovaleva N.Yu., Raevskaya E.G., Roshchin A.V. Aspects of nanomaterial safety: nanosafety, nanotoxicology, nanoinformatics. *Khimicheskaya bezopasnost'*. 2017; 1 (2): 44–87. (In Russ.)] DOI: 10.25514/CHS.2017.2.10982.
5. Wang X., Reece S.P., Brown J.M. Immunotoxicological impact of engineered nanomaterial exposure: mechanisms of immune cell modulation. *Toxicol. Mech. Methods*. 2013; 23 (3): 168–177. DOI: 10.3109/15376516.2012.757686.
6. 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; 30: 275–279. DOI: 10.1177/009286159603000132.
7. Hong F., Zhou Y., Zhou Y., Wang L. Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO_2 . *Environ. Toxicol.* 2017; 32 (10): 2234–2243. DOI: 10.1002/tox.22439.
8. Ngobili T.A., Daniele M.A. Nanoparticles and direct immunosuppression. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2016; 241 (10): 1064–1073. DOI: 10.1177/1535370216650053.
9. Кварацхелия А.Г., Ключкова С.В., Никитюк Д.Б., Алексеева Н.Т. Морфологическая характеристика тимуса и селезенки при воздействии факторов различного происхождения. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2016; 5 (3): 77–83. [Kvaratskheliya A.G., Klochkova S.V., Nikityuk D.B., Alekseeva N.T. Morphological characteristics of the thymus and spleen under different factors of origin. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2016; 5 (3): 77–83. (In Russ.)] DOI: 10.18499/2225-7357-2016-5-3-77-83.
10. Susan A. Elmore. Enhanced Histopathology of the Immune System: A Review and Update. *Toxicol. Pathol.* 2012; 40 (2): 148–156. DOI: 10.1177/0192623311427571.
11. Moon E.Y., Yi G.H., Kang J.S., Lim J.S., Kim H.M., Pyo S. An increase in mousetumor growth by an *in vivo* immunomodulating effect of titanium dioxide nano-

particles. *J. Immunotoxicol.* 2011; 8 (1): 56–67. DOI: 10.3109/1547691X.2010.543995.

12. Dua Y., Liu J., Ma L., Li N., Liu H., Wang J., Zheng L., Liu C., Wang X., Zhao X., Yan J., Wang S., Wang H., Zhang X., Hang G.F. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials.* 2010; 31: 894–899. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.003.

13. Eom H.J., Choi J. P38 MAPK Activation, DNA Damage, Cell Cycle Arrest and Apoptosis As Mechanisms of Toxicity of Silver Nanoparticles in Jurkat T Cells. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44: 8337–8342. DOI: 10.1021/es1020668.

14. Fröhlich E. Cellular Targets and Mechanisms in the Cytotoxic Action of Non-biodegradable Engineered Nanoparticles. *Curr. Drug. Metab.* 2013. 14 (9): 976–988. DOI: 10.2174/1389200211314090004.

15. Liu Y., Gao Y., Liu Y., Li B., Chen C., Wu G. Oxidative stress and acute changes in murine brain tissues after nasal instillation of copper particles with different sizes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 14 (6): 4534–4540. DOI: 10.1166/jnn.2014.8290.

16. Park E., Yi J., Chung K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.* 2008. 180: 222–229. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.06.869.