



# EFFECT OF TITANIUM NITRIDE NANOPARTICLES ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE RAT LUNG IN THE CHRONIC EXPERIMENT

Yavorovskiy O.P., Stechenko L.O., Solokha N.V., Kryvosheieva O.I., Chukhrai S.M.

## ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК НІТРИДУ ТИТАНУ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ РЕСПІРАТОРНОГО ВІДДІЛУ ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ У ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ

# Н

**ЯВОРОВСЬКИЙ О.П.,  
СТЕЧЕНКО Л.О., СОЛОХА Н.В.,  
КРИВОШЕЄВА О.І.,  
ЧУХРАЙ С.М.**

Національний медичний  
університет  
ім. О.О. Богомольця, м. Київ

УДК 541.4-022.513.2:616.24:  
57.012.4:57.084

**Ключові слова:**  
нанопорошок нітрид титану,  
плазматичні клітини,  
пневмосклероз.

аноматеріали у науці та техніці стрімко впроваджуються в усі галузі промисловості і, як правило, створюють певну небезпеку для здоров'я операторів, зайнятих виготовленням і застосуванням нанопорошків і наноматеріалів. Це пояснюється тим, що нанопорошки характеризуються унікальними фізико-механічними та хімічними властивостями на відміну від їхніх макроформ [1]. Затребуваними у наш час є нанопорошки тугоплавких безкисневих сполук металів, зокрема нанокompatитного нітриду титану, який використовується не лише у промисловості як тугоплавка, термостійка сполука для покриття виробів з металу, а й в ортопедії для виготовлення корегуючих пластин, імплантів та протезів [2]. Нанонітрид титану CAS номер 25583-20-4 має такі фізико-хімічні характеристики: середній розмір 20 нм, колір – вугільно-чорний, високу температуру плавлення – 2950°C, площу поверхні – 50-80 м<sup>2</sup>/г, густину нанофази – 0,08 г/см<sup>3</sup>, дійсну густину –

5,22г/см<sup>3</sup>, значну твердість, високотемпературну хімічну стабільність, високі термальні властивості (теплопровідність). Крім того, нанопорошку нітриду титану властива висока стійкість до механічних впливів і ушкоджень.

У лабораторії фізико-хімії і технології нанокераміки і нанокompatитів Інституту проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України розробляється і відпрацьовується на дослідній установці технологічний процес одержання нанопорошку нітриду титану методом термічного синтезу. Він є багатостадійним з ручними операціями, тому може характеризуватися негативним впливом на організм операторів наностановки низки шкідливих факторів виробничого середовища і трудового процесу. Як показали наші дослідження [3], провідним чинником виступає забруднення повітря робочої зони пиловими частинками, як ультрамікроскопічними, так і нанодіапазону (рис. 1 і 2). Пилові частинки можуть потрапляти на

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ НИТРИДА ТИТАНА  
НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ РЕСПИРАТОРНОГО ОТДЕЛА  
ЛЕГКИХ КРЫС В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ**  
**Яворовский А.П., Стеченко Л.А.,  
Солоха Н.В., Кривошеева А.И., Чухрай С.М**  
*Национальный медицинский университет  
им. А.А. Богомольца, г. Киев*

В статье представлены данные собственных экспериментальных исследований по выявлению влияния наночастиц нитрида титана на организм операторов, работающих с наностановками. **Цель** исследования заключалась в изучении влияния нанопорошка нитрида титана на ультраструктуру легких подопытных животных при интратрахеальном введении в хроническом эксперименте.

**Материалы и методы.** Проводилось электронномикроскопическое исследование ультраструктурных изменений легких на белых крысах массой 170-200 г. Материал для исследования (легкие) забирали через определенные сроки с момента введения. На ультратоме LKB III (Швеция) изготавливались ультратонкие срезы, которые окрашивались и фотографировались под электронным микроскопом ПЭС-125К при

увеличениях в 4,8-20 тысяч раз.

**Результаты.** Ультраструктурный анализ легких показал, что через сутки после введения наночастиц нитрида титана они оказывались в части альвеол, их действие было направлено на повреждение аэрогематического барьера; респираторный, альвеолярный эпителий частично потерпел десквамации. Через 7 суток отмечался отек респираторного эпителия и его отслоение от базальной мембраны, увеличилось количество коллагеновых и эластических волокон. Увеличение срока наблюдения до 6 месяцев после введения наночастиц показало отек респираторного эпителия, расширение базальных мембран и разрастание коллагеновых волокон. В просвете альвеол наблюдались плазматические клетки, отвечающие за гуморальный иммунитет. Через год после начала эксперимента также отмечался пневмосклероз.

**Выводы.** Таким образом, увеличение срока наблюдения указывает на развитие пневмосклероза в паренхиме легких, как результат – нарушение газообмена и гемомикроциркуляции.

**Ключевые слова:** нанопорошок нитрид титана, плазматические клетки, пневмосклероз.

© Яворовський О.П., Стеченко Л.О., Солоха Н.В., Кривошеева О.І., Чухрай С.М.  
СТАТТЯ, 2017.



шкіру, слизові оболонки, спецодяг оператора.

**Мета** нашого дослідження полягала у вивченні впливу нанопорошку нітриду титану на ультраструктуру легень піддослідних тварин за умов інтра-трахеального введення у хронічному експерименті.

**Матеріали та методи дослідження.** Електронномікроскопічне дослідження ульт-

Рисунок 1

### Молекулярна модель сполуки TiN

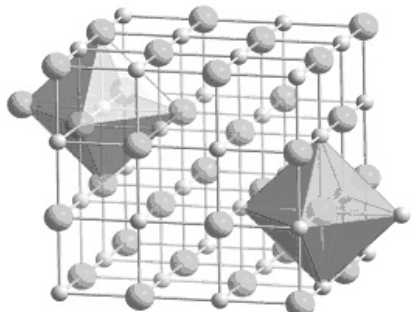
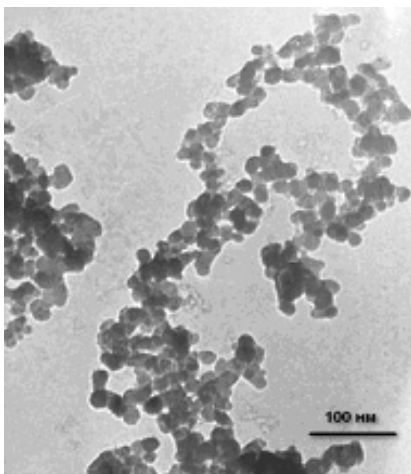


Рисунок 2

### Електроннограма нанонітриду титану. Позитивний контраст. Збільшення 1:100 000



## ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

раструктурних змін легень проводили на 20 білих щурах масою 170-200 г, кожному з яких інтра-трахеально вводили 1 мл суспензії ультрамікроскопічного порошку нітриду титану у дозі 50 мг на фізіологічному розчині. Матеріал для дослідження (легені) забирали за 1 добу, 7 днів, 6 місяців та 1 рік з моменту введення. Контролем слугували легені білих щурів, які перебували в умовах віварію без експериментальних втручань, а також легені білих щурів, яким інтра-трахеально вводили 1 мл фізіологічного розчину.

Шматочки легень експериментальних щурів фіксували в 1% розчині чотирьохокису осмію за Колфільдом. Зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (70%, 80%, 90%, 100%) та ацетоні. Заливали у суміш епон-аралдит згідно з загальноприйнятою методикою [4]. З отриманих блоків виготовляли напівтонкі зрізи, які забарвлювали толудіновим синім та за Хаят. Після прицільної орієнтації на напівтонких зрізах на ультратомі LKB III (Швеція) виготовляли ультратонкі зрізи, які контрастували 2% розчином уранілацетату та

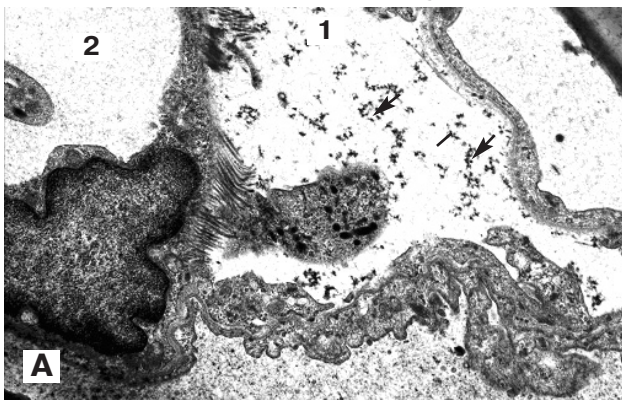
цитратом свинцю. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом ПЕМ-125К при збільшеннях у 4,8–20 тисяч разів.

**Результати дослідження.** Ультраструктурний аналіз легень за умов впливу наночасточок нітриду титану показав, що за добу після введення в альвеолах респіраторного відділу спостерігаються наночастинки розміром 25-45 нм. Вони утворюють конгломерати з декількох частинок (рис. 3А, 3Б).

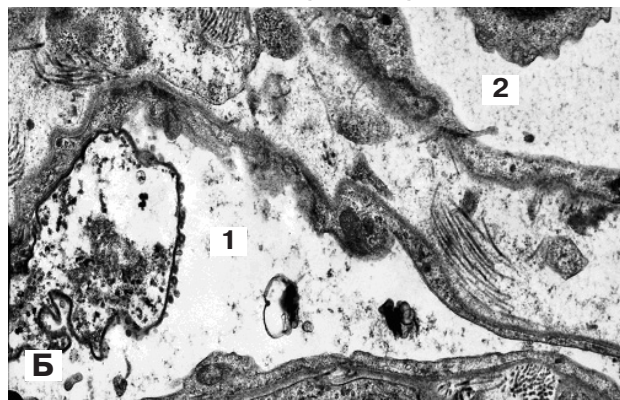
У тих альвеолах, де присутні наночастинки, респіраторний епітелій частково десквамований або ж лізована плазмолема, при цьому фрагментується базальна мембрана, і у просвіт альвеоли виступають компоненти міжальвеолярних септ (колагенові та еластичні волокна). Базальна мембрана кров'яних капілярів також локально ушкоджується, і формені елементи крові проникають у просвіт альвеол. У частини альвеол конгломерати наночастинок оточені мембраною альвеолярних макрофагів (рис. 4А), які захоплюють їх, та клітинний детрит від секреторних альвеолоцитів, що продукують сурфактант. Функція цих клітин

Рисунок 3

### Легені за 1 добу після введення наночастинок нітриду титану



Наночастинки (↓) прикріплені до плазматичної мембрани у просвіті альвеол (1). Просвіт капіляра (2).



Електронномікроскопічне фото. 3б.: А – 12000; Б – 12000.

також порушена, про що свідчить формування ламелярних тілець.

Вони переважно неоднорідні, зменшена кількість ламел, набряклі або ж утворюють гігантські тільця, які витісняють ядро та інші органели. Така клітина вже не спроможна утворювати сурфактантний комплекс (рис. 4Б).

Отже, за 1 добу після введення наночастинок нітриду титану вони виявлялись у частині альвеол, та їхня дія була спрямована на пошкодження аерогематичного бар'єру, оскільки респіраторний, альвеолярний епітелій частково зазнавав десквамації, а його базальна мембрана була відсутня або ж деструктурована за рахунок порушення пошарового розташування її компонентів. Підвищена кількість макрофагів та плазматичних клітин, порівняно з контрольною групою, вказує на активацію гуморальної ланки імунітету. Усі відзначені нами зміни паренхіми легень були вогнищевими і мали реактивний характер.

За 7 діб після введення наночастинок нітриду титану вони виявляються у просвітах альвеол значно у меншій кількості, ніж у попередній термін дослідження. Часточки, як правило, були прикріплені до мембран або ж розміщувались у клітинному детриті макрофагів разом з залишками інших органел (рис. 5).

Газообмін при цьому порушувався, доказом чого є набряк респіраторного епітелію та його відшарування від базальної мембрани. У міжальвеолярних септальних перетинках збільшується кількість колагенових та еластичних волокон, які можуть стимулювати

запальні процеси.

Як і у попередній термін спостереження, активізується макрофагальна система, свідченням чого є накопичення блукаючих макрофагів у просвіті альвеол, а також проліферація прикріплених макрофагів та макрофагів сполучної тканини септальних просторів.

Збільшення терміну спостереження до 6 місяців після введення наночастинок нітриду титану показало наявність поодиноких наночастинок у цитоплазмі блукаючих макрофагів, в яких відзначалася велика кількість первинних, вторинних (фагосом) лізосом та залишкових тілець, що містять ламелярні тільця секреторних альвеолоцитів та поодинокі наночастинок.

Газообмін пошкоджувався, по-перше, за рахунок неякісного продукування секреторними клітинами сурфактанту та його десквамації разом з плазматичними мембранами у просвіті альвеол, по-друге, внаслідок порушення структурної організації таких компонентів аерогематичного бар'єру, як респіраторний епітелій, його набряк, розширення базальних мембран та розростання там колагенових волокон, що також призводить до ускладнення газообміну. Як і у попередні терміни спостережень, за 6 місяців у просвіті альвеол спостерігаються плазматичні клітини, які відповідають за гуморальний імунітет. Секреторні клітини дещо краще збережені, але їхні ламелярні тільця, які є неповноцінними, виходять за межі клітин і можуть поглинатися макрофагами. Таким чином, збільшення терміну спостереження вказує на розвиток пневмосклерозу у паренхімі

легень і, як результат – порушення газообміну та гемомікроциркуляції.

За 1 рік після початку експерименту також відзначається пневмосклероз. Міжальвеолярні перетинки розширені з розростанням колагенових та еластичних волокон. У просвіті альвеол є поодинокі наночастинок нітриду титану. У респіраторному епітелії спостерігається відсутність органел метаболічного плану, присутні тільки у невеликій кількості мікропіноцитозні пухирці, які беруть участь у транспортних процесах, та мікрофіламенти. Ендотеліальне вистелення стоншене до розмірів двох плазматичних мембран. Локально воно відшаровується від базальної мембрани, яка розпушена та має гомогенну структуру, а в її зоні розміщені колагенові, еластичні волокна та основна речовина, які випинаються у просвіт кровоносних капілярів, утруднюючи на цій ділянці газообмін. Слід відзначити, що у цей термін дослідження спостерігаються «вуали», утворені виростами респіраторного епітелію, які перекривають альвеолу у місцях обтурації просвітів кровоносних капілярів макрофагами та плазматичними.

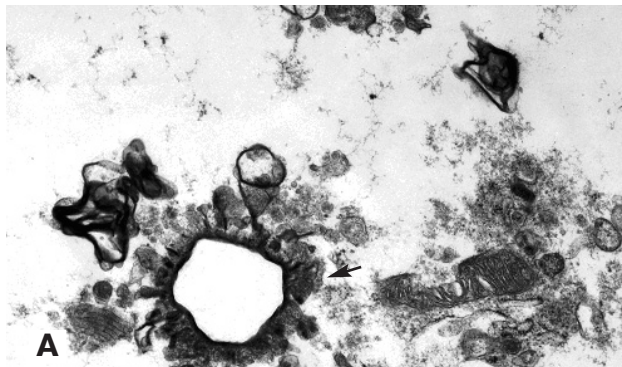
Частково у респіраторному відділі легень відновлюється структурна організація його компонентів, але при цьому зберігається велика кількість колагенових волокон у міжальвеолярних перетинках та деяких ділянках аерогематичного бар'єру.

#### Висновки

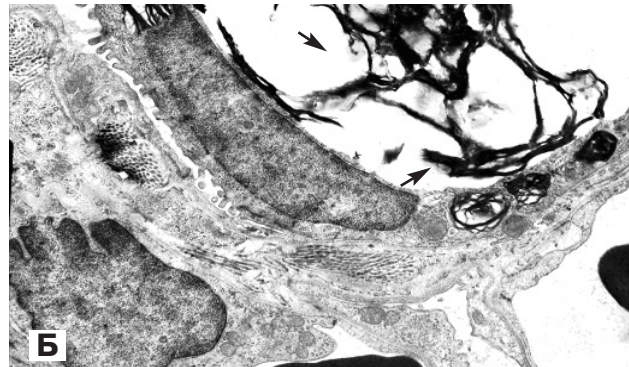
1. Технологічний процес одержання нанопорошку нітриду титану методом термо-

Рисунок 4

#### Легені за 1 добу після введення наночастинок нітриду титану



Електронномікроскопічне фото. А – макрофаг (1). Клітинний детрит (↓). Зб. – 12000.



Б – секреторний альвеолоцит з пошкодженими ламелярними тільцями. Зб. – 12000.

**EFFECT OF TITANIUM NITRIDE NANOPARTICLES ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE RAT LUNG IN THE CHRONIC EXPERIMENT**

**Yavorovskiy O.P., Stechenko L.O., Solokha N.V., Kryvosheieva O.I., Chukhrai S.M. National O.O. Bohomolets Medical University, Kyiv**

Data of our experimental studies on the detection of the effect of titanium nitride nanoparticles on the body of the operators working with nanofacilities are presented in the article.

**Objective.** We studied the effect of titanium nitride nanopowder on the ultrastructures of the lungs of the experimental animals at the intratracheal introduction in the chronic experiment.

**Materials and methods.** We performed the electronic microscope study of the ultrastructural changes in the lungs of white rats of 170-200 g weight. Material for the study (lungs) was taken within definite terms from the moment of introduction. Ultrathin sections were made on ultratom LKB III (Sweden). They were painted and photographed under electronic microscope PEM-125K at a magnification of 4.8-20 thousand diameters.

**Results.** Ultrastructural analysis of the lungs showed that in 1 day after the introduction of titanium nitride nanoparticles they were identified in the part of alveoli and their effect was directed to the damage of aerohematic barrier; respiratory, alveolar epithelium partially suffered a desquamation. In 7 days an edema of the respiratory epithelium and its detachment from the basal membrane were noted, a number of collagen and elastic fibers were increased. Increase of the observation period to 6 months after the introduction of nanoparticles demonstrated the edema of respiratory epithelium, basal membrane expansion, and proliferation of collagen fibers. Plasma cells, responsible for humoral immunity, were observed in the lumen of the alveoli. Pneumosclerosis was noted in a year after the beginning of the experiment as well.

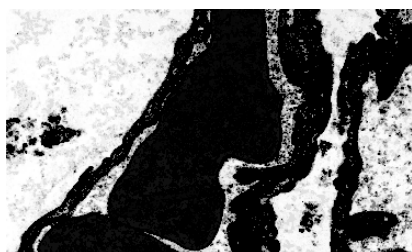
**Conclusions.** Thus, increase of the period of observation points to the development of pneumosclerosis in lung parenchyma and, as a result, the violations of gas exchange and hemomicrocirculation.

**Keywords:** titanium nitride nanopowder, plasma cells, pneumosclerosis.

синтезу характеризується впливом на працівників низки шкідливих виробничих чинників, серед яких специфічним і потенційно небезпечним є пил наночастинок нітриду титану, який із повітря робочої зони може потрапити інгаляційним шляхом та забруднювати

Рисунок 5

**Легені за 7 днів після введення наночастинок нітриду титану**

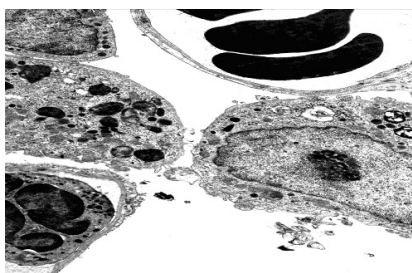


Клітинний детрит (1) у просвіті альвеол. Аерогематичний бар'єр.

Електронномікроскопічне фото. Зб.: А – 8000, Б – 12000.

Рисунок 6

**Легені за 6 місяців після введення наночастинок нітриду титану. Скупчення макрофагів. Наночастинок**



Електронномікроскопічне фото. Зб.: А – 9500.

шкіру, спецодяг і поверхні технологічного обладнання.

2. Електронномікроскопічне дослідження показало, що у легенях щурів на ранніх етапах експерименту (1 та 7 доба) наночастинок спостерігались у просвіті альвеол та клітинному детриті десквамованих альвеолоцитів. Результатом їхньої дії є пошкодження аерогематичного бар'єру і розвиток запальних процесів. При збільшенні терміну спостереження (6 місяців та 1 рік) поодинокі частинки виявлялись у макрофагах або ж у десквамованих елементах сурфактанту. Зміни у структурах респіраторного відділу легень супроводжуються дистрофічними пошкодженнями альвеолоцитів, збільшенням кількості сполучотканинних волокон, ущільненням базальних мембран та розвитком пневмосклерозу.

3. Одержані результати свідчать про необхідність подальшого дослідження токсикологічних властивостей нанопорошку нітриду титану в експериментах на лабораторних тваринах та вивчення їхнього впливу на стан здоров'я операторів у реальних виробничих умовах з метою гігієнічного контролю вмісту їх у повітрі робочої зони.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Chen Z., Meng H., Xing G., Chen Ch., Zhao Yu. Toxicological and biological effects of nanomaterials. *International Journal of Nanotechnology*. 2007. № 4 (1-2). P. 179-196.

2. van Hove R.P., Sierevelt I.N., van Royen B.J., Nolte P.A. Titanium-Nitride Coating of Orthopaedic Implants: A Review of the Literature. *BioMed Research International*. 2015. doi:10.1155/2015/485975

3. Яворовський О.П., Ширококов В.П., Веремей М.І., Боби В.В., Зінченко Т.О., Морозов В.Н. Методичні підходи до гігієнічного контролю над вмістом наночастинок у повітрі робочої зони при отриманні силіцидів металів методом високоенергетичної механоактивації. *Журнал НАМН України*. 2012. № 1. С. 126-130.

4. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. Киев : Вища школа, 1984. 208 с.

**REFERENCES**

1. Chen Z., Meng H., Xing G., Chen Ch. & Zhao Yu. *International Journal of Nanotechnology*. 2007 ; 4 (1-2) : 179-196.

2. van Hove R.P., Sierevelt I.N., van Royen B.J. & Nolte P.A. *BioMed Research International*. 2015. doi:10.1155/2015/485975

3. Yavorovskiy O.P., Shyrobokov V.P., Veremei M.I., Boby V.V., Zinchenko T.O. & Morozov V.N. *ZhurnalN atsonalnoi Akademii Medychnykh Nauk Ukrainy*. 2012 ; 1 : 126-130 (in Ukrainian).

4. Karupu V.Ya. Elektronnaia mikroskopiia [Electronic Microscopy]. Kiev : Vyshcha Shkola ; 1984 : 208 p. (in Russian).

Надійшла до редакції 21.11.2016