

УДК 538.9, 57.037, 615.015.33

Методы радиоактивных индикаторов и нейтронно-активационного анализа для исследований биокинетики наночастиц в живом организме

А.А. Анциферова¹, Ю.П. Бузулуков¹, В.А. Демин^{1,2}, В.Ф. Демин¹,
Д.А. Рогаткин³, Е.Н. Петрицкая³, Л.Ф. Абаева³, П.К. Кашкаров^{1,2,4}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Акад. Курчатова, 1

²Московский физико-технический институт (университет), 141700, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9

³Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: ansiferova_aa@nrcki.ru, demin.vyacheslav@mail.ru

Поступила в редакцию: 04.07.2014

Принята в печать: 23.10.2014

Рассматриваются физические основы и методические вопросы применения ядерно-физических методов (радиоактивных индикаторов и нейтронно-активационного анализа) для изучения процессов ассимиляции ряда неорганических наночастиц (НЧ) живыми организмами, их распределения по органам и экскреции. Анализируются способы активации изучаемых НЧ в составе коллоидного раствора или биологических образцов, сравниваются достоинства метода радиоактивных индикаторов и нейтронно-активационного анализа, приведен краткий обзор ряда успешных работ, использующих ядерно-физические методы для изучения взаимодействия НЧ серебра, золота, селена, окислов цинка и титана с живым организмом. В качестве примера приведены описание и результаты эксперимента по длительному (30 дней) введению НЧ серебра лабораторным мышам, продемонстрированы возможности нейтронно-активационного анализа для оценки массы остаточной крови (и содержащихся в ней НЧ) в биологических образцах и подтверждения проникновения НЧ через гематоэнцефалический барьер в количественном выражении.

RADIOTRACER METHODS AND NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS FOR THE INVESTIGATION OF NANOPARTICLES BIOKINETICS IN LIVING ORGANISMS

The physical foundations and methodological issues of nuclear activation methods (radiotracers and neutron activation analysis) are discussed in relation to the study of assimilation of a number of inorganic nanoparticles (NPs) by living organisms, their distribution in organs and excretion. The ways of NPs activation as the part of a colloidal solution or biological samples are analyzed. The advantages of the radioactive tracers method and neutron activation analysis are compared. A brief overview of a number of successful works using nuclear methods for studying the interaction of silver, gold, selenium, zinc and titanium oxides NPs with living organisms is presented. As an example, a description and results of the experiment on long-term (30 days) injection of silver NPs into laboratory mice are shown. The abilities of neutron activation analysis to estimate the mass of residual blood (and NPs in it) in biological samples and to confirm the NPs penetration through the blood-brain barrier in a quantitative terms are demonstrated.

ВВЕДЕНИЕ

Производство наноматериалов и их применение в различных сферах человеческой деятельности неуклонно расширяются. Быстро растут объем выпуска потребительских товаров на основе наноматериалов [1] и применение наночастиц (НЧ) в медицине [2–5]. В этой связи особую актуальность приобретает изучение взаимодействия НЧ с живыми организмами. Измерение биокинетических параметров, характеризующих поведение НЧ в организме, таких, как их усвоение, распределение по органам и тканям, метаболизм и экскреция необходимы, в первую очередь, для оценки степени потенциальной опасности НЧ данного вида для живого организма. Эти параметры необходимы как в фундаментальных исследованиях по воздействию НЧ на живую природу, так и в практических применениях НЧ, например в фармакологии, ветеринарии, пищевой промышленности, косметологии и т.д.

На практике биокинетические параметры НЧ, как правило, определяются путем измерения массы или числа НЧ в биологических образцах органов, тканей, крови и выделений лабораторных животных после введения НЧ в организм лабораторных животных [2, 6–11]. Если данные измерения проводятся для биообразцов, отбираемых через различные сроки после введения НЧ в организм, то это позволяет получать характеристики усвоения, распределения и экскреции в зависимости от времени, т.е. динамику изменения изучаемых параметров.

В общем случае, методики измерений содержания НЧ в биологических образцах зависят от химического состава и особенностей структуры НЧ, и на текущий момент не существует универсального метода, пригодного для всех наноматериалов. Ограничиваясь достаточно распространенными на практике методами, необходимо упомянуть электронную и оптическую микроскопию, количественный химический анализ, различные методы спектроскопического элементного анализа (включая различные виды оптической [12] и масс-спектрометрии [13, 14]), нейтронно-активационный анализ [2, 15, 16], хроматографию и методы, основанные на внесении метки в изучаемые НЧ [11]. Таким образом, при выборе методики измерения количества НЧ в биологических образцах существует определенный выбор. Критерии для выбора, наряду с очевидными требованиями точности и чувствительности, включают в себя также такие параметры, как трудоемкость и представительность. Требование малой трудоемкости связано с большим количеством образцов, необходимых для измерения биокинетических параметров (характерное число подлежащих измерению образцов в эксперименте для одного вида НЧ – около 200). Под представительностью понимается возможность получать за одно измерение достоверное интегральное значение количества НЧ в биологическом образце, имеющем макроскопические размеры (от единиц до десятков мм), при возможном неоднородном распределении НЧ по объему образца.

По данным работы [1], в коммерческих наноматериалах наиболее востребованы НЧ на основе неорганических материалов (в частности, серебра, углерода, оксидов титана и цинка, кремния, золота). Это обстоятельство определило направление описываемых в настоящей работе исследований и выбор неорганических НЧ. При анализе методов измерения биокинетических параметров неорганических НЧ был сделан вывод, что значительными преимуществами обладают те из них, которые основаны на внесении меток в исследуемые НЧ. Оказалось, что совокупности требований: точности, чувствительности, малой трудоемкости и представительности измерений в наибольшей мере удовлетворяют некоторые ядерно-физические методы, использующие радиоактивные метки-маркеры, внедряемые в исследуемые НЧ (методы радиоактивных индикаторов или меченых атомов, нейтронно-активационный анализ). Ядерно-физические методы анализа вещества основаны на облучении исследуемых образцов потоками возбуждающего излучения (нейтроны, заряженные частицы, γ -кванты) и последующей регистрации возникающего вторичного излучения атомов образца. Они имеют длительную историю применения в биологии и других областях научных исследований, а в применении к исследованиям НЧ эти методы начали применяться начиная с 1990-х [17, 18]. В отечественной практике эти методы для исследования НЧ ранее либо не применялись вообще, либо редко и несистематично.

В принципе, ядерно-физические методы позволяют использовать метод меченых атомов для количественных измерений наноматериалов любой природы – как органических, так и неорганических, поскольку радиоактивная, изотопная, спиновая или какие-либо другие метки могут быть внесены в любое вещество, однако для НЧ различной природы и состава оптимальными являются разные способы внесения радиоактивной метки и измерения ее активности в образцах. Для рассматриваемых ниже неорганических НЧ внесение радиоактивного маркера наиболее просто реализуется путем нейтронного [2, 11] или протонного [19] облучения НЧ или биообразцов с последующими количественными измерениями активности изотопа-метки гамма-спектрометрическими методами.

МЕТОДИКИ АКТИВАЦИИ НАНОЧАСТИЦ

Наиболее адекватным способом инкорпорирования радиоактивной метки в неорганические НЧ является их активация тепловыми (или эпитепловыми) нейтронами в ходе реакции нейтронного захвата с превращением части ядер в исследуемых НЧ в радиоактивные изотопы. Поскольку химические свойства изотопов (определяемые электронными оболочками атомов) полностью идентичны исходным атомам в активируемых НЧ, изотопная метка не меняет биокинетические характеристики меченых НЧ относительно исходных. Небольшая энергия тепловых или эпитепловых нейтронов не нарушает расположение молекул (атомов) во внутренней структуре НЧ и, кроме того, обуславливает значительные сечения поглощения таких нейтронов активируемыми атомами. Величина активности изотопа-метки в исследуемых образцах может быть измерена по интенсивности бета- или гамма-излучения, генерируемого при бета-распаде ядер изотопной метки, или по интенсивности рентгеновского излучения, образующегося при распаде некоторых нестабильных изотопов в результате реакции К-захвата электронов. В отличие от бета-излучения, гамма- и рентгеновское излучения бета-распадов имеют линейчатый энергетический спектр, который индивидуален для каждого изотопа. Это позволяет при измерениях использовать высокую энер-

гетическую селективность современной гамма-спектрометрической аппаратуры и заметно повысить чувствительность и точность измерений. Кроме того, гамма- и рентгеновское излучения слабо поглощаются материалом образцов (в отличие от бета-излучения), а измерительная аппаратура для них хорошо технически освоена и коммерчески доступна. Исходя из этого, в качестве радиоактивной метки-маркера желательнее выбирать изотопы, испускающие в ходе распада гамма- и/или рентгеновское излучение. Активация неорганических НЧ тепловыми нейтронами ядерного реактора была успешно использована при изучении распределения и тропности НЧ к различным органам и тканям в ряде зарубежных работ [2, 17, 18], а также авторами настоящей работы при проведении экспериментов по изучению биокинетики НЧ окиси цинка [6–8], серебра [9, 10], золота и селена [9, 11].

Важным параметром при выборе радиоактивного маркера является его время жизни, которое не должно быть слишком коротким, чтобы успеть провести измерения до нежелательного снижения его активности, и не слишком большим, поскольку слишком длительный период полураспада пропорционально снижает активность изотопа-метки в связи с уменьшением числа распадов в единицу времени. В общем случае, приемлемое время полураспада лежит в промежутке от нескольких суток до нескольких лет. Вне данного диапазона резко возрастают технические трудности процесса измерений. В таких ситуациях можно использовать другие, более сложные методы активации, помимо облучения тепловыми нейтронами. Возможными вариантами являются активация быстрыми нейтронами в ходе реакции (n, p), протонами – (p, n), (p, 2n) и др., в ходе которых из исходных ядер образуются ядра новых элементов (трансмутация исходных ядер) [11, 19]. В ходе трансмутации могут возникать радиоактивные ядра элементов, соседствующих в таблице Менделеева с исходными элементами и имеющих допустимое время жизни. Большое разнообразие ядерных реакций на быстрых нейтронах или протонах позволяет подобрать нужный способ активации, однако для каждого конкретного вида НЧ и исследуемых образцов, в общем случае, требуется индивидуальный подбор варианта методики.

Источником быстрых протонов может служить циклотрон или иные ускорители заряженных частиц, источником быстрых нейтронов может быть как ядерный реактор (при размещении облучаемых образцов вблизи тепловыделяющих урановых стержней), так и бериллиевая мишень, бомбардируемая быстрыми протонами из циклотрона.

При формировании радиоактивного маркера в НЧ двуокиси титана активация титана тепловыми нейтронами в ходе реакции нейтронного захвата нецелесообразна, поскольку производит изотопы с чрезмерно малым (порядка мс) временем жизни. В то же время в ходе реакции (n, p) при облучении титана нейтронами с энергией более 2.2 МэВ образуются гамма-излучающие изотопы скандия ^{46}Sc и ^{47}Sc с временем полураспада 88.3 и 3.4 сут соответственно. Эта методика была успешно использована авторами в эксперименте по изучению биокинетических параметров НЧ двуокиси титана (рутил) [10].

Следует отметить, что в случае использования трансмутации ядер меченые НЧ уже не полностью идентичны исходным НЧ, поскольку в них содержатся атомы радиоактивного маркера, отличающиеся от атомов исходной НЧ. Это, строго говоря, оказывает влияние на биокинетические характеристики меченых НЧ. Тем не менее изменение биокинетических свойств меченых НЧ за счет изменения заряда части (активированных) ядер и соответственно их химических свойств пренебрежимо мало: при формируемых на практике

активностях образцов порядка десятков-сотен Бк количество активированных ядер, равномерно распределенных внутри НЧ, составляет величину около 10^{-8} – 10^{-6} от общего числа молекул/атомов в составе одной НЧ. Примерно такая же доля меченых атомов находится на поверхности НЧ, т.е. химические и биокинетические свойства поверхности неорганических НЧ меняются несущественно.

Таким образом, возможность активации ядер элементов-маркеров без изменения их заряда предпочтительна трансмутации, хотя и в случае трансмутации изменение биокинетических характеристик пренебрежимо мало. В то же время активация путем трансмутации значительно расширяет границы применимости метода радиоактивных маркеров, делая его пригодным для большого числа элементов таблицы Менделеева.

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ БИОКИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НАНОЧАСТИЦ ПРИ ИХ ВВЕДЕНИИ В ЖИВОЙ ОРГАНИЗМ

Активационные методы для измерения биокинетических параметров НЧ при их введении в живой организм могут реализовываться двумя основными способами. В первом варианте исследуемые НЧ, предварительно меченные радиоактивными изотопами одним из способов, описанных в предыдущем разделе, вводятся в организм лабораторных животных путем, отвечающим задачам эксперимента (перорально или парентерально, включая ингаляцию, трансдермальное или интраназальное введение и т.д.). Во втором варианте животным вводятся нерадиоактивные НЧ, которые активируются на последующем этапе в составе отобранного биообразца, облучаемого нейтронами как целое [2, 10, 17, 18]. По сути, этот вариант методики является классическим нейтронно-активационным анализом и далее так и именуется, в отличие от первого варианта, который мы будем называть далее методом радиоактивных маркеров (или индикаторов). Следует отметить, что в иностранной и отечественной литературе нейтронно-активационный анализ с использованием гамма-спектроскопии часто именуют инструментальным нейтронно-активационным анализом, подчеркивая его отличие от редко используемого ныне нейтронно-активационного анализа с радиохимическим анализом продуктов активации.

Серьезным ограничением нейтронно-активационного анализа являются трудности, связанные с выявлением меченых НЧ в том случае, если они содержат биогенные элементы с высоким естественным содержанием в организме (железо, цинк, селен и др.), которые активируются вместе с исследуемыми наноматериалами из тех же элементов. В образце возникает высокий естественный уровень излучений, свойственных применяемому маркеру, достоверно не отражающий количество НЧ, попавших в организм извне. Например, нейтронно-активационный метод неприменим для НЧ оксидов железа или цинка, в то время как эти же НЧ успешно обнаруживаются и измеряются методом радиоактивных индикаторов.

Следует подчеркнуть, что серьезным преимуществом нейтронно-активационного анализа является возможность вводить животным нерадиоактивные НЧ, что имеет большое значение при экспериментах с длительным введением (недели или месяцы). На практике эксперимент с применением нейтронно-активационного анализа можно проводить в два этапа. На первом «нерадиоактивном» этапе проводится введение животным препарата НЧ и подготовка биообразцов. На втором «радиоактивном» этапе проводится активация биообразцов и измерение в них массы НЧ. Это позволяет научным учреждениям, не имеющим специальной инфраструктуры по работе с радиоактивными веществами, прово-

дить «нерадиоактивную» часть экспериментов своими силами и передавать затем биообразцы для активации и измерений в учреждения, имеющие соответствующую инфраструктуру. Этот вариант взаимодействия успешно использовался на практике в работе [10] и в описанном ниже эксперименте.

Соответственно поставленным задачам подготавливаются для введения препараты, содержащие радиоактивно меченные или неактивированные НЧ (обычно коллоидный раствор исследуемых НЧ в дистиллированной воде). Особенностью многих разновидностей коллоидных растворов с невысоким дзета-потенциалом является их склонность к агломерации с образованием кластеров из нескольких НЧ и увеличением их линейных размеров. В этих случаях для чистоты экспериментов по исследованию влияния именно отдельных НЧ, а не их агломератов, следует применять стерически или электростатически стабилизированные растворы НЧ. В первом варианте поверхность НЧ покрывается специальными стабилизирующими полимерами (например, поливинилпирролидоном), вводимыми в раствор. В случае электростатической стабилизации корректируют pH водной фазы препарата НЧ. В обоих вариантах необходимо тщательно контролировать размеры / распределения по размерам исследуемых НЧ. При необходимости можно подвергать используемые суспензии (препараты) обработке на ультразвуковых диспергаторах, которые достаточно эффективно разрушают образующиеся кластеры НЧ. В случае применения методики радиоактивных маркеров предпочтительно активировать исходные ультрадисперсные порошки НЧ, на которые повышенная температура и интенсивное гамма-излучение в реакторе не оказывают влияния, в то время как при активации готовых взвесей НЧ возможно влияние температуры и гамма-излучения в реакторе на стабилизирующие вещества и процессы агломерации.

Современная измерительная гамма-спектрометрическая аппаратура в настоящее время обладает высокой чувствительностью и значительной энергетической селективностью, которые позволяют с хорошей точностью (порядка единиц процентов и выше) проводить измерения с образцами с активностью порядка нескольких Бк, а при условии достаточно низкого радиоактивного фона (например, в случае применения метода радиоактивных маркеров и низкофоновой гамма-спектрометрии) и до десятых долей Бк. Это дает возможность использовать для введения лабораторным животным дозы препаратов с активностью не более нескольких сотен кБк, не превышающей уровень минимально значимой активности. Последняя определяется в действующих в РФ Нормах радиационной безопасности НРБ-99/2009 как активность, которая настолько мала, что на нее не распространяется действие НРБ-99/2009 и соответствующие ограничения на использование радиоактивных веществ [20]. Таким образом, процедура введения препаратов меченых НЧ безопасна для персонала, а радиационное влияние вводимой дозы меченых НЧ на лабораторных животных пренебрежимо мало.

Через периоды времени после введения препарата, определяемые условиями эксперимента, у животных берутся пробы выделений, а затем отбираются образцы интересующих органов, тканей и крови. Для количественного определения активности радиоактивного маркера в биологических образцах проводят измерения на низкофоновой гамма-спектрометрической аппаратуре интенсивности линий спектра в одном или нескольких энергетических диапазонах, характерных для данного радиоактивного маркера. Для перехода от измеренной активности маркера к массовому содержанию НЧ в биообразцах используют метод сравнения с активностью образца-эталоны, содержащего известное количество вводи-

мого животным препарата изучаемых НЧ [2, 6, 8, 11]. В течение ряда лет (с 2008 года) специалисты НИЦ «Курчатовский институт» совместно с НИИ Питания РАМН, Московским областным научно-исследовательским клиническим институтом им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ) и другими научными и медицинскими учреждениями проводят работы по исследованию биокинетики НЧ в живых организмах ядерно-физическими методами, описанными выше. В ходе этих работ для НЧ серебра, золота, цинка и селена были измерены параметры, характеризующие усвоение этих НЧ организмом лабораторных животных (крыс и мышей) при однократном пероральном введении, распределение введенных НЧ по органам и крови, а также процесс вывода НЧ из организма [6–11]. Для НЧ серебра были также измерены параметры усвоения и распределения их по органам при длительном многократном пероральном введении в организм крыс [10]. Для НЧ серебра и окиси цинка эти методики аттестованы в системе ГОСТ-Р [21, 22]. Также методики рекомендованы нормативным документом Минздрава РФ для определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов [23].

Ниже приведены новые результаты по долговременному введению НЧ серебра мышам. Количественные измерения массы НЧ в биологических образцах проводились сравнением измеренной с помощью гамма-спектрометрии активности биообразцов с эталонными образцами так же, как в работах [2, 11]. Кроме того, большое внимание уделялось измерению линейных размеров используемых НЧ.

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙТРОННО-АКТИВАЦИОННОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ БИОКИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НАНОЧАСТИЦ

В настоящее время наиболее востребованными в товарах широкого потребления являются наноматериалы на основе НЧ серебра [1]. В этой связи, весьма актуальным является изучение биокинетических характеристик НЧ серебра и, в особенности, в отношении преодоления внутренних защитных барьеров организма.

В серии экспериментов с применением ядерно-физических методов были получены биокинетические характеристики стерически стабилизированных НЧ серебра [9, 11] и не имеющие аналогов в мировой практике результаты по транспорту НЧ серебра через гематоэнцефалический барьер в экспериментах, учитывающих наличие остаточной крови в биообразцах [10]. Особый практический интерес для вопросов безопасности человека и соответствующего нормирования представляют исследования, связанные с длительным введением НЧ серебра. Именно такой путь поступления в организм представляет наибольшую потенциальную опасность в условиях возрастающих масштабов использования НЧ серебра в фармакологии, ветеринарии, упаковочных материалах, БАД к пище, гигиенической и косметической продукции [9]. Ниже представлены описание и результаты недавно завершеного эксперимента по исследованию биокинетических параметров НЧ серебра при длительном (30 сут) пероральном введении НЧ в организм лабораторных мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовались процессы бионакопления НЧ серебра препарата «Арговит-С», коммерчески производимого в РФ НПЦ «ВЕКТОР-ВИТА», и НЧ серебра производства МАТИ РГТУ им. Циолковского. НЧ марки «Арговит-С» представляют собой коллоидный раствор с номинальной концентрацией НЧ около 10 мг/мл, диспергированных в дистиллированной воде и покрытых стабилизирующей оболочкой из поливинилпирролидона. Второй тип использованных НЧ серебра

был получен диспергационно-конденсационным методом, в результате которого НЧ оказывались взвешенными в дистиллированной воде с концентрацией 50 мг/л. Процессы агломерации предотвращались очень низкой концентрацией НЧ в растворе, сводящей до минимума взаимодействия НЧ друг с другом (кроме того, возможна слабая электростатическая стабилизация НЧ, согласно описанию производителя). Данный сорт НЧ Ag будем в дальнейшем называть нестабилизированными НЧ серебра.

Для определения размеров НЧ использовался метод динамического рассеяния света (ДРС) на ДРС-спектрометре Malvern. Исходный коллоидный раствор препарата «Арговит-С» с концентрацией 10 мг/мл был высококонцентрированным и непрозрачным. По этой причине для предотвращения процессов многократного рассеяния при измерениях были подобраны оптимальные концентрации, которые составили 100, 50 и 10 мг/л. Для измерения размеров нестабилизированных НЧ серебра, наряду с исходным раствором, использовали растворы с концентрациями 25 и 12.5 мг/л. Разбавление растворов осуществлялось дистиллированной деионизованной водой. Перед каждым измерением растворы тщательно перемешивались и обрабатывались в ультразвуковой ванне в течение 15 мин. Дальнейшие ДРС-измерения проводили через 2 мин после обработки.

Для изучения процессов бионакопления НЧ серебра вводились белым лабораторным мышам-самцам линии SHK, исходной массой 25–30 г. Эксперимент проводился совместно с МОНИКИ, в котором осуществлялось содержание животных, ежесуточное введение им НЧ в течение месяца и подготовка образцов головного мозга, крови и печени для последующей активации и измерений массы НЧ серебра в образцах. Работа с животными проводилась в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.77 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» и приказа Министерства высшего и среднего специального образования № 742 от 13.11.84 года «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Мыши получали сбалансированный по всем основным макро- и микронутриентам корм и воду в количестве 2.5 см³ в сутки.

Животные были разделены на 3 группы по способу кормления и по типу вводимых НЧ:

- группа 1 (5 мышей): контроль, отсутствие препаратов НЧ, время содержания 1 сут;
- группа 2 (5 мышей): однократное энтеральное внутрижелудочное введение НЧ «Арговита-С» в дозе 100 мкг;
- группа 3 (5 мышей): пероральное введение нестабилизированных НЧ серебра в дозе 125 мкг на протяжении 30 дней.

Тестируемые препараты НЧ вводили ежедневно в составе питьевой воды на протяжении 30 дней эксперимента (группа 3) или однократно внутрижелудочно через зонд (группа 2). Контрольная группа мышей получала дистиллированную деионизованную воду в режиме неограниченного доступа.

По окончании эксперимента мышей подвергали анестезии посредством внутрибрюшинного введения 0.6 % раствора уретана и обескровливали из нижней полой вены. Брюшную полость асептически вскрывали, отбирали стерильными инструментами в одноразовые полиэтиленовые контейнеры печень, головной мозг и кровь (0.5 см³).

Пробы подсушивались в вентилируемом шкафу-термостате в течение 24 ч при температуре 75 °С до состояния, близкого к консистенции вяленых пищевых продуктов. Это существенно сокращало их объем и позволяло длительно (до несколь-

ТАБЛИЦА 1 | Основные характеристики исходного нерадиоактивного и радиоактивного изотопов серебра, а также «паразитного» изотопа биогенного натрия

| Элемент | Изотоп мишени | | | | Радиоактивный изотоп | | | |
|---------|-------------------|---------------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| | Изотоп | Содержание в природной смеси, % | Атомная масса, г/м | σ , 10^{-24}см^2 | Изотоп | $T_{1/2}$, сут | Вид излучения | E_{γ} , кэВ |
| Ag | ^{109}Ag | 48.2 | 108.9 | 4.4 | $^{110\text{m}}\text{Ag}$ | 249.8 | β , γ | 657 |
| Na | ^{23}Na | 100 | 23 | 0.53 | ^{24}Na | 0.625 | β , γ | 1369 2754 |

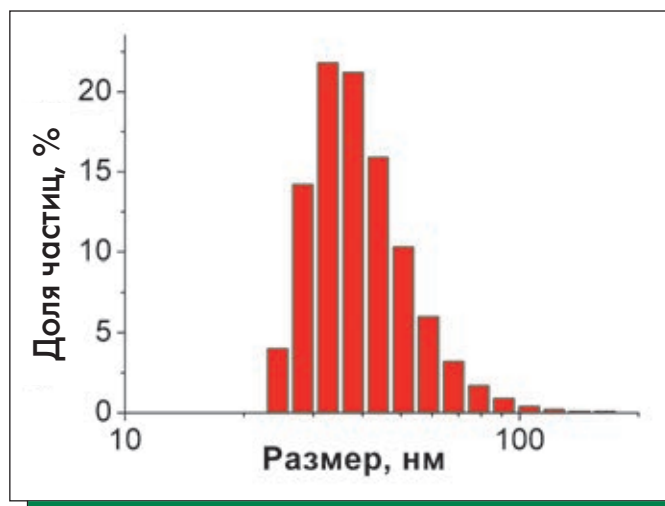


РИСУНОК 1 | Распределение числа частиц по размерам коллоидного препарата «Арговит-С»

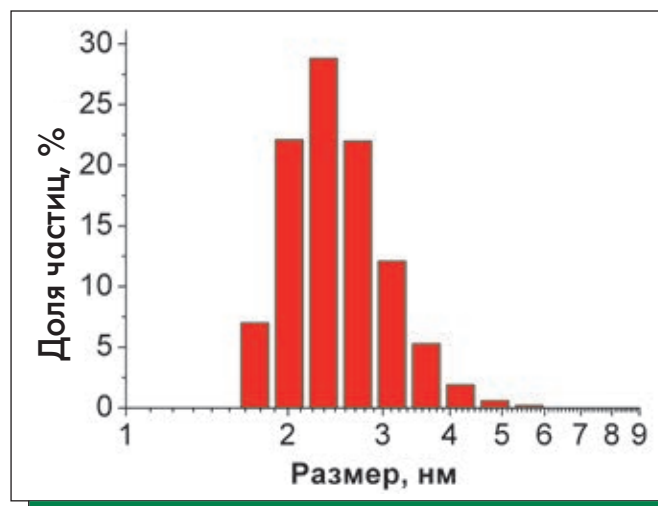


РИСУНОК 2 | Распределение числа частиц по размерам для концентрации нестабилизированного коллоидного серебра 50 мг/л

ких недель) хранить в холодильнике с температурой не выше +5 °С до транспортировки в НИЦ «Курчатовский институт» и проведения последующих измерений. Определение содержания серебра в исследуемых органах и тканях проводилось с помощью описанной выше нейтронно-активационной методики. Для этого подготовленные в МОНИКИ биообразцы органов, тканей и крови были упакованы в маркированные герметичные полиэтиленовые сосуды, которые в свою очередь были помещены в алюминиевые контейнеры для дальнейшей активации в канале реактора.

Нейтронную активацию НЧ серебра в составе биообразцов осуществляли путем облучения потоком тепловых нейтронов в вертикальном экспериментальном канале ВЭК-9 ядерного реактора ИР-8 НИЦ «Курчатовского института». Величина плотности потока нейтронов в течение времени облучения была в среднем постоянной и составляла 5.7×10^{12} нейтронов на см^2 в секунду. Облучение биологических образцов с НЧ серебра проводили в течение 24 ч.

Одновременно с исследуемыми образцами осуществляли активацию эталонных образцов с содержанием серебра в количестве 1 мкг. Эталонные образцы представляли собой высушенный на х/б вате раствор, полученный разведением государственных стандартных образцов (ГСО) нитрата серебра, помещенных в герметичные сосуды из полиэтилена, геометрия которых приблизительно соответствовала геометрии биологических образцов.

После окончания облучения и выведения образцов из активной зоны реактора их выдерживали внутри биоаппараты 14 сут для уменьшения фона гамма-излучения корот-

коживущих изотопов, возникающих при активации ядер контейнера и образца (в основном, ^{24}Na , ^{31}Si и ^{29}Al , с периодами полураспада $T_{1/2} = 14.8$ ч, 2.6 ч и 6.5 мин соответственно), до безопасного уровня. После этого образцы передавались на гамма-спектрометрический анализ.

Активность исследуемых образцов измеряли на гамма-спектрометре производства фирмы Canberra (США) в составе: германиевого полупроводникового детектора GC4018, анализатора DSA-1000, программного обеспечения Genie-2000 (Genie S501, Genie S502). Регистрацию гамма-излучения проводили в энергетических диапазонах, соответствующих наиболее интенсивным спектральным линиям анализируемых элементов (табл. 1).

В процессе гамма-спектрометрических измерений проводилась регистрация гамма-квантов в диапазоне от 60 кэВ до 1.5 МэВ, что позволило, наряду с измерением в биообразцах количества серебра $^{110\text{m}}\text{Ag}$, оценить также содержание ряда изотопов, образующихся из естественно присутствующих в образцах биогенных элементов, в том числе изотопа железа ^{59}Fe . Полученная при этом дополнительная информация использовалась для оценки количества остаточной крови в биообразцах мозга, поскольку это существенно при оценке возможности проникновения НЧ через гематоэнцефалический барьер (см. ниже). Количественное определение содержания НЧ серебра осуществляли с использованием метода эталонов по формуле:

$$m_x = m_y \cdot A_{\gamma,x} / A_{\gamma,y} \quad (1)$$

ТАБЛИЦА 2 | Измеренные значения активности эталонов и значений коэффициентов пересчета из измеренной активности серебра ^{110m}Ag [Бк] в содержание серебра в нг

| № эталонного образца | Масса Ag, нг | Активность, Бк | Коэффициент, нг/Бк | Средний коэффициент, нг/Бк |
|----------------------|--------------|----------------|--------------------|----------------------------|
| 1 | 100 | 6.8 | 14.8 | 14.2 |
| 2 | 500 | 37.0 | 13.6 | |
| 3 | 100 | 5.0 | 19.8 | 19.0 |
| 4 | 500 | 27.0 | 18.2 | |

ТАБЛИЦА 3 | Масса и активность НЧ, измеренных в биообразцах подопытных животных

| Орган | Однократное введение НЧ (d = 34 нм) средние значения по группе | | | Длительное введение НЧ (d = 2.5 нм) средние значения по группе | | |
|--------|---|----------------|------|---|----------------|------|
| | масса, нг | активность, Бк | | масса, нг | активность, Бк | |
| | Ag | Ag | Fe | Ag | Ag | Fe |
| Мозг | 11.3 | 0.5 | 15.3 | 203 | 13.3 | 14.7 |
| Кровь | 18.7 | 1.0 | 205 | 109 | 7.8 | 303 |
| Печень | 165 | 8.7 | 274 | 1110 | 58.6 | 193 |

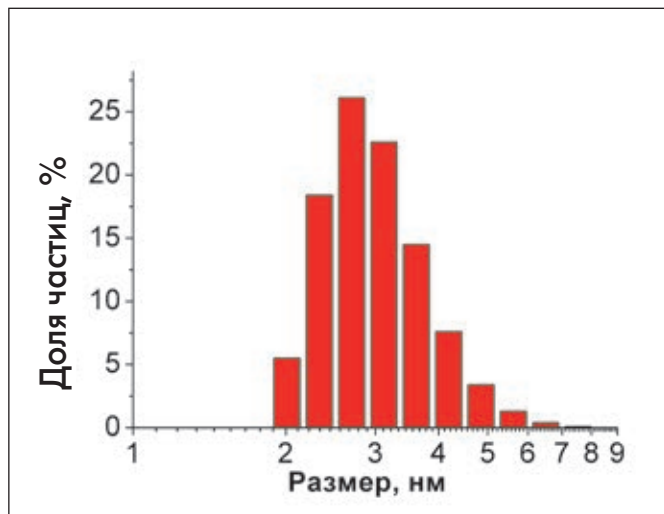


РИСУНОК 3 | Распределение числа частиц по размерам для концентрации нестабилизированного коллоидного серебра 12.5 мг/л

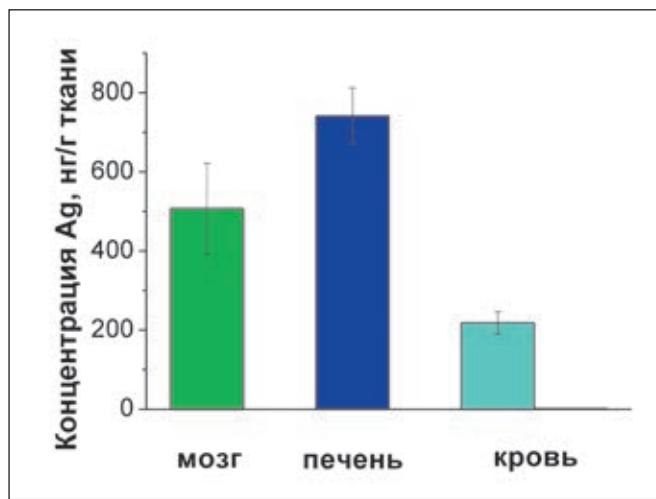


РИСУНОК 4 | Концентрация серебра в различных органах и тканях в результате длительного введения нестабилизированных НЧ серебра мышам

где m_s – известная масса элемента в эталонном образце, $A_{\gamma,x}$ и $A_{\gamma,z}$ – измеренная гамма-активность в исследуемом и эталонном образце соответственно.

Следует отметить, что гамма-спектрометрический анализ активированных биологических образцов был затруднен высоким уровнем непрерывного комптоновского фона во всех диапазонах измерения [24]. Фон обусловлен присутствием в образце радионуклидов ^{24}Na и ^{65}Zn , образующихся при активации биологических образцов из природных натрия и цинка, входящих в состав всех животных тканей, однако существенно более низкого, чем порог критического распознавания (Critical Level) [13]. Порог критического распознавания представляет собой скорость счета, при которой полезный сигнал превышает флуктуацию фона с 50%-ной вероят-

ностью. При незначительных упрощениях формула расчета этого порога L_c (в единицах скорости счета регистрируемых распадов) дается выражением:

$$L_c = 2.33\sqrt{R_b / T}, \quad (2)$$

где R_b – сумма скорости счета внешнего фона и комптоновской компоненты фона, T – время измерения образца, равное в большинстве случаев 3600 с.

Содержание анализируемых химических элементов в органах выражали в нг на грамм массы органа (ткани). Для каждого показателя рассчитывали среднее значение со стандартной ошибкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные измерений методом ДРС показали, что средний гидродинамический диаметр НЧ в препарате «Арговит-С» для всех исследованных концентраций составил 33.7 нм (рис. 1). Следует отметить, что обработка суспензий ультразвуком не приводила к изменению размера НЧ, что говорит о хорошей стерической стабилизации коллоидных растворов.

На рис. 2 и 3 представлены распределения числа частиц по размерам для нестабилизированного коллоидного серебра соответственно в концентрациях 50 и 12.5 мг/л. Видно, что максимум распределения практически не зависит от концентрации, что свидетельствует об отсутствии агломерации у сильно разбавленных растворов. При этом для концентраций НЧ серебра 50 и 25 мг/л распределения числа частиц по размерам оказались практически идентичными, максимум этих распределений лежит в области 2.3 нм (рис. 2). В то же время максимум распределения для концентрации 12.5 мг/л расположен вблизи 2.6 нм (рис. 3), что в сравнении с предыдущими данными находится в пределах точности измерений ДРС.

Обработанные данные измерений по бионакоплению НЧ Ag представлены в табл. 2 и 3 и на гистограммах рис. 4 и 5.

На рис. 4 представлены концентрации серебра в головном мозге, печени и крови для хронического введения нестабилизированных НЧ. Результаты однократного (острого) введения НЧ препарата «Арговит-С» представлены на рис. 5.

Заметим, что по сравнению с острым введением (рис. 5) при хроническом введении (рис. 4) концентрации серебра во всех рассматриваемых органах и тканях значительно возросли, что может свидетельствовать о накопительном эффекте НЧ, а также частично может отражать влияние стабилизирующей полимерной оболочки в случае коллоидного серебра марки «Арговит-С».

Наибольшая концентрация серебра наблюдается в печени, при этом следующим органом-мишенью, накапливающим серебро, оказывается головной мозг (что совпадает с результатами работы [14], в ходе которой исследовалась биокинетика НЧ серебра диаметром 14 нм при их 28-дневном пероральном введении лабораторным крысам и измерении их массы методом ICP-MS), в то время как концентрация Ag в крови оказывается наименьшей. В целом, полученные распределения по органам близки к данным работы [12], а имеющиеся количественные различия могут быть обусловлены разницей размеров НЧ (60 нм в работе [12]). В случае острого введения ситуация изменяется: концентрация серебра в крови превышает концентрацию в мозге. Это, в сочетании с данными табл. 3, может свидетельствовать о преимущественном накоплении НЧ Ag (т.е. медленном выведении по сравнению с всасываемостью из крови) в головном мозге животных, что хорошо коррелирует с выводами работы [13], в которой методом одночастичной ICP-MS изучали биокинетику НЧ серебра диаметром <20 нм при длительном (28 дней, как и в работе [14]) пероральном введении. Концентрации серебра в тканях контрольной группы оказались в большинстве случаев ниже критического порога распознавания (кроме крови, где она оказалась пренебрежимо малой). Этот результат согласуется с имеющимися в литературе данными по естественному содержанию серебра в организме животных [25].

Следует отметить, что ядерно-физический метод в варианте нейтронно-активационного анализа позволяет достоверно произвести оценку количества НЧ, прошедших через гистогематический барьер непосредственно в исследуемый орган или ткань, без учета НЧ, содержащихся в остаточной крови в биообразце в просвете или на стенках крове-

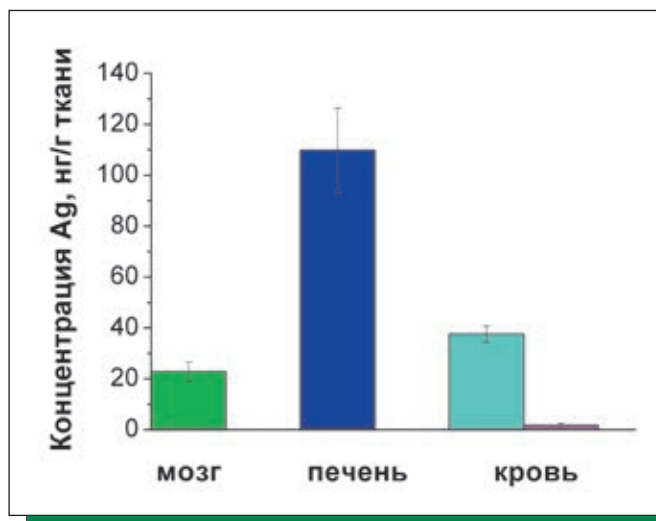


РИСУНОК 5 | Концентрация серебра в различных органах и тканях в результате разового введения стабилизированных НЧ серебра «Арговит-С» мышам. Красный столбец указывает среднее возможное содержание коллоидного серебра в крови мышей контрольной группы

носных сосудов. Для этого необходимо измерить удельную активность отдельно отобранного образца крови животного по исследуемому меченому элементу (в нашем случае ^{110m}Ag), а также по изотопу железа ⁵⁹Fe. Далее, измеряя активность исследуемого органа по тому же изотопу ⁵⁹Fe, определяют максимальное количество (массу) остаточной крови, содержащейся в данном органе (предполагая, что все железо сосредоточено в крови, и получая, таким образом, оценку сверху). Наконец по известной удельной активности крови по исследуемому меченому элементу вычисляют максимально возможную активность этого элемента в кровеносных сосудах рассматриваемого органа. Соответственно оставшаяся активность в органе по исследуемому элементу обусловлена его содержанием непосредственно в тканях органа по другую сторону от полостей кровеносных сосудов. Таким образом, представленный метод может давать однозначное количественное доказательство проникновения НЧ сквозь биологические барьеры. В первую очередь, это представляет интерес для гематоэнцефалического барьера, поскольку многие другие методы часто не способны обеспечить представительного доказательства проникновения наноматериалов сквозь указанный барьер непосредственно в мозговую ткань.

Так, в результате настоящего исследования активности изотопов ⁵⁹Fe и ^{110m}Ag в крови мышей (табл. 3) были получены данные о доле серебра, содержащегося в сосудах головного мозга и составившем не более 15 % от доли всего серебра, содержащегося в головном мозге. При этом в ранее проведенных экспериментах на крысах эта характеристика составила не более 7 % от общего количества серебра [10]. Таким образом, можно утверждать, что НЧ серебра способны проникать через гематоэнцефалический барьер из кровеносных сосудов непосредственно в нейрональную ткань головного мозга в количестве порядка 1×10^{-4} от введенной перорально дозы.

Следует отметить, что результат данной работы является одним из первых прямых доказательств способности НЧ серебра без стабилизирующей оболочки проникать через гематоэнцефалический барьер, демонстрацией возможного накопления НЧ Ag в тканях (печень, головной мозг, кровь), а также потенциальной зависимости результата от наличия стабилизирующей оболочки.

Выводы

В данной работе с использованием методов нейтронно-активационного и гамма-спектрометрического анализа были исследованы процессы бионакопления покрытых стабилизирующей оболочкой (из поливинилпирролидона) и нестабилизированных НЧ серебра в тканях и биожидкостях лабораторных мышей, а также исследованы геометрические характеристики НЧ методом ДРС. Полученные результаты, с учетом разницы в размере изучаемых НЧ, хорошо коррелируют с результатами ранее проведенных отечественных и зарубежных работ по бионакоплению НЧ серебра в организме крыс [10, 13, 14]. При остром введении стабилизированных НЧ выявлен высокий тропизм к некоторым тканям (печень и кровь). В свою очередь, результат хронического введения нестабилизированных НЧ оказался несколько иным: основным органом-мишенью, накапливающим серебро, оказался, наряду с печенью, головной мозг. С использованием ядерно-физических методов оказалось возможным непосредственно установить, что НЧ серебра преодолевают гематоэнцефалический барьер и накапливаются в головном мозге, потенциально будучи способными вызывать когнитивные изменения, проверка чего является предметом будущих исследований.

Таким образом, в настоящей работе выявлена способность нестабилизированных НЧ серебра проникать в организм мышей и накапливаться в различных тканях в результате длительного введения. При этом качественный результат

не зависит от наличия стабилизирующей оболочки и соответствует результатам предыдущих работ по хроническому введению стабилизированных НЧ серебра крысам, а также инвариантен к разнице в размерах использованных НЧ в 13 раз. В то же время количественный результат, скорее всего, следует рассматривать с учетом существенной разницы в размерах НЧ и химической структуры их поверхности (с полимерной оболочкой и без нее). В свою очередь, концентрационные зависимости, полученные в результате острого введения стабилизированного коллоидного серебра мышам, оказались в качественном соответствии с характеристиками острого эксперимента по введению такого же серебра крысам [11].

Анализ указанных особенностей ядерно-физических методов (высокая точность, селективность, возможность выявления НЧ из биоэссенциальных элементов, возможность проведения измерений с гетерогенными макрообразцами), а также совокупность экспериментальных результатов [2, 3–11, 21–23] позволяют сделать вывод о высокой надежности и практичности ядерно-физических методов для изучения биокинетики (включая токсико- и фармакокинетику) многих широко используемых неорганических наноматериалов. ■

Описанные в статье экспериментальные прикладные научные исследования проведены при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (проект RFMEFI57514X0072).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Project on Emerging Nanotechnologies. <http://www.nanotechproject.org>, Woodrow Wilson International Centre for Scholar. Washington, USA.
2. James W.D., Hirsh L.R., West J.L., et al. // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2007. V. 271. P. 455.
3. Semmler-Behnke M., Kreyling W.G., Lipka J., Fertsch S., Wenk A., Takenaka S., Schmid G., Brandau W. // Small. 2008. V. 4. P. 2108.
4. Bhattacharyya S., Khan J.A., Curran G.L., Robertson J.D., Bhattacharya R., Mukherjee P. // Adv. Mater. 2011. V. 23. P. 5034.
5. Arvizo R.R., Saha S., Wang E., Robertson J.D., Bhattacharya R., Mukherjee P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 6700.
6. Распопов Р.В., Бузулуков Ю.П., Марченков Н.С. и др. // Вопросы питания. 2010. № 6. С. 32.
7. Котенко К.В., Беляев И.К., Бузулуков Ю.П. и др. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2011. Т. 56. № 2. С. 5.
8. Kotenko K.V., Belyaev I.K., Buzulukov Yu.P., et al. // Med. Radiol. and Radiation Safety. 2012. V. 57. № 5. P. 5.
9. Бузулуков Ю.П., Гмошинский И.В., Распопов Р.В. и др. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2012. Т. 57. № 3. С. 5.
10. Бузулуков Ю.П., Арианова Е.А., Демин В.Ф. и др. // Изв. АН. Сер. биологическая. 2014. № 3. С. 1.
11. Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Попов В.О. и др. // Успехи химии. 2013. Т. 82. № 1. С. 48.
12. Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S. // Inhal. Toxicol. 2008. V. 20. P. № 6. P. 575–583.
13. Meike van der Zande, Vandebriel R.J., van Doren E., et al. // ACS Nano. 2012. V. 6. № 8. P. 7427–7442.
14. Loechner K., Hadrup N., Ovortrup K., et al. // Particle and Fibre Toxicology. 2011. V. 8. P. 18.
15. Bergen J.M., von Recum H.A., Goodman T.T., Massey A.P., Pun S.H. // Macromol. Biosci. 2006. V. 6. P. 506.
16. Hillyer J.F., Albrecht R.M. // J. Pharm. Sci. 2001. V. 90. P. 1927.
17. Darien B.J., Sims P.A., Kruse-Elliott K.T., Homan T.S., Cashwell R.J., Cooley A.J. // Scanning Microsc. 1995. V. 9. P. 773.
18. Hillyer J.F., Albrecht R.M. // Microsc. Microanal. 1999. V. 4. P. 481.
19. Kreyling W.G., Wenk A., Semmler-Behnke M. // Report-no. (UBA-FB) 001357, Schriftenreihe Umwelt & Gesundheit, 04/2010, <http://www.uba.de/uba-info-medien-e/4022.html>.
20. Санитарные правила НРБ-99/2009. СанПин 2.6.1.2523-09. Москва, 2009.
21. Методика измерений массовой концентрации НЧ, содержащих серебро или цинк, в различных средах и биологической матрице на основе ядерно-физической спектроскопии. // Методика измерений. ФП 1.31.2011.10990. Москва, 2011.
22. Demin V.A., Demin V.F., Buzulukov Yu.P. // Nanotechnologies in Russia. 2013. V. 8. № 5–6. P. 347.
23. Порядок и методы определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных. Методические рекомендации МР 1.2.0048-11 // Методические рекомендации МР 1.2.2566-09, «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2011 г.
24. ISO 11929: 2010. Determination of characteristic limits (decision threshold, detection limit and limits of the confidence interval) for measuring of ionizing radiation. Fundamental and application // ISO standard, 2010.
25. Bowen H.J.M. Trace Elements in Biochemistry. Acad. Press, 1966.