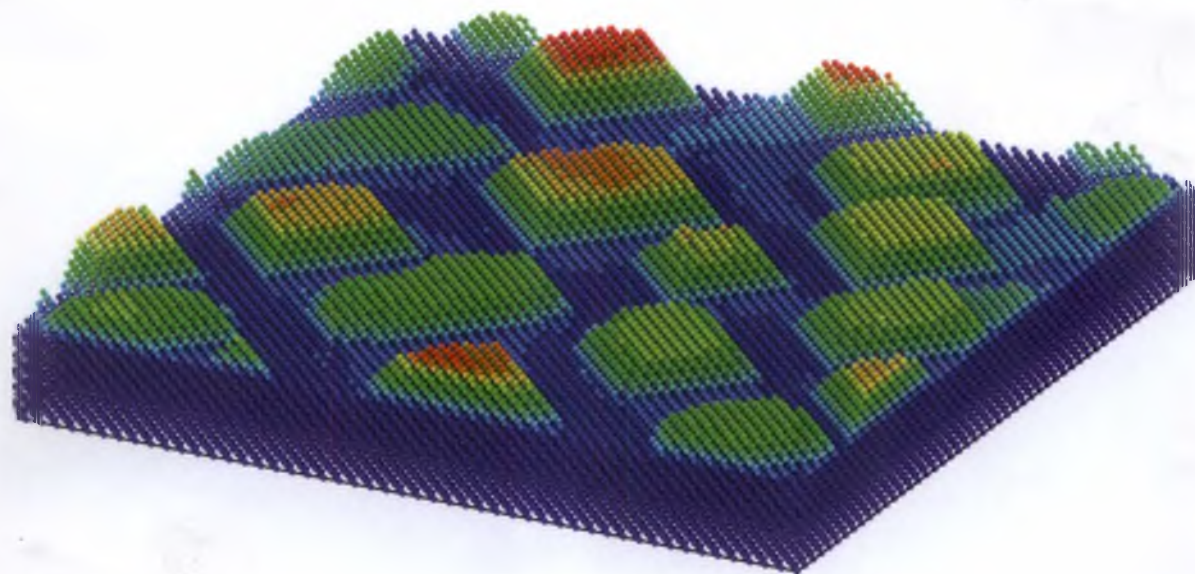


РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ

март–апрель 2015

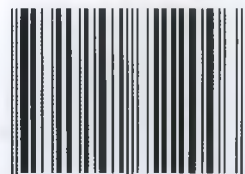
том 10, №3-4

Зарождение и рост квантовых точек Ge на Si – моделирование с использованием высокоэффективных алгоритмов



- Наблюдение рамановских спектров наночастиц серебра в пористом кремнии, сформированных ионной имплантацией
- Терагерцовый отклик полимерного композита с высокой концентрацией микро- и наночастиц кремния
- Исследование калиевых каналов в нервной клетке с помощью комплекса «квантовая точка-блокатор»

ISSN 19927223



9 771992 722003

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ №ФС77-26130 выдано Федеральной службой по надзору
за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций
и охране культурного наследия 03 ноября 2006 г.

Учредители:

Министерство образования и науки Российской Федерации, ООО «Парк-медиа»

Редакционный совет:

Председатель: М.В. Ковальчук
Главный редактор: М.В. Алфимов

Ж.И. Алфёров, А.Л. Асеев,
Е.Н. Каблов, М.П. Кирпичников,
С.Н. Мазуренко, К.Г. Скрябин

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: М.Я. Мельников

М.И. Алымов (Россия), С.П. Громов (Россия),
Э. Дриоли (Италия), А.М. Желтиков (Россия),
С.В. Калинин (США), Л.М. Лиз-Марзан (Испания),
А.В. Лукашин (Россия), А.Н. Озерин (Россия),
А.Н. Петров (Россия), В.О. Попов (Россия),
Б.В. Потапкин (Россия), О.В. Преждо (США),
В.Ф. Разумов (Россия), А.Б. Ярославцев (Россия),
Я.И. Штромбах (Россия), Е.Б. Яцишина (Россия)

Издатель: К.В. Киселев

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Редактор: С.А. Озерин

Корректур: Р.С. Шаймарданова

Подготовка иллюстраций, макет и верстка:
К.К. Опарин

E-mail: nsoboleva@strf.ru, www.nanorf.ru, www.nanoru.ru

Дизайн журнала: С.Ф. Гаркуша

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы, Научный парк МГУ,
владение 1, строение 75Г. Телефон/факс: (495) 930-87-07.

Для писем: 119311, Москва-311, а/я 136

Подписка: (495) 930-87-07.

E-mail: nsoboleva@strf.ru, www.nanorf.ru, www.nanoru.ru

ISSN 1992-7223

При перепечатке материалов ссылка на журнал «Российские нанотехнологии» обязательна. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного согласия редакции не допускается. Редакция не несет ответственность за достоверность информации, опубликованной в рекламных материалах.

© РОССИЙСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ, 2015

Номер подписан в печать 15 апреля 2015 г.

Тираж 1000 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

В этом номере

стр.
16

В обзоре А.В. Елецкого и др. рассмотрены текущее состояние и результаты исследований, направленных на использование графена и основанных на нем материалов в различных видах солнечных элементов. Комплекс замечательных свойств (прозрачность, высокая подвижность носителей, прочность и химическая инертность) делают графен перспективным кандидатом в качестве электродного материала.

Приведены и проанализированы данные по использованию графена в различных фотовольтаических устройствах, включая органическую фотовольтаику на базе полимеров и солнечные элементы на красителях.

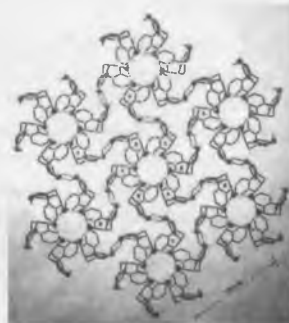


Конфигурации солнечных элементов на основе полимеров: (a) конфигурация двойного слоя; (b) конфигурация с донорно-акцепторной смесью; (c) конфигурация сопряженных гетеропереходов

стр.
58

В статье С.В. Стомбуна и др. сделана теоретическая оценка сорбционной емкости водородных губок, а именно материалов, состоящих из нанотрубок, в отсутствие специальных центров сорбции на внутренней поверхности трубок. Оценка основана на учете относительно дальнего действующего Ван-дер-Ваальсова взаимодействия водорода и сорбирующего материала в форме потенциала Леннарда-Джонса.

Показано, что трубки с радиусом $R = 2.1-2.3 \text{ \AA}$ и меньше выталкивают молекулы водорода, и при $R < 2.0-2.2 \text{ \AA}$ этот барьер существенно превышает кТ, так что водород в трубки практически не попадает. Трубки с большим радиусом, как показывает расчет, втягивают водород. Однако даже при максимальном втягивании молекул водорода (при радиусе трубок $2.5-2.8 \text{ \AA}$), в отсутствие специальных центров сорбции на их внутренней поверхности, сорбционная способность губок в пересчете на массу сорбента не превышает процента. Наличие периодического супрамолекулярного рельефа (гофра) в трубках, как правило, ведет к уменьшению сорбционной способности. Таким образом, поиск и создание водородных губок в классе таких супрамолекулярных конструкций не актуальны.



Супрамолекулярная структура матрицы исследуемого трубчатого наноматериала

стр.
115

В работе Т.И. Терпинской и др. исследованы биологические свойства водного раствора наночастиц CdSe/ZnS, стабилизированных цистеином. Показано, что наночастицы поглощаются клетками карциномы Эрлиха в условиях *in vitro*, не оказывая цитотоксического эффекта. Наночастицы адсорбируются на клеточной мембране, постепенно проникая внутрь клеток, и наблюдаются в виде крупных гранул или скоплений в течение 30 мин. Через 60 мин регистрируется более равномерное распределение флуоресцентных частиц в клетках.

Мягкая трипсинизация клеток изменяет свойства клеточной мембраны, увеличивая ее адгезивность, оцененную методом атомно-силовой микроскопии, и способствуя интернализации наночастиц.



Клетки АКЭ, окрашивание наночастицами CdSe/ZnS/цистеин и Hoechst 33342

СОДЕРЖАНИЕ

Слово редактора..... 1

НАНО обзоры

Нanomатериалы функционального назначения

А.А. Бессонов, М.Н. Кирикова
Гибкие и печатаемые сенсоры4

Нанofотоника

А.В. Елецкий, В.Ю. Зицерман, Г.А. Кобзев
Графен в солнечной энергетике16

НАНО статьи

Метрология, стандартизация и контроль нанотехнологий

П.Л. Новиков, А.В. Ненашев, С.А. Рудин, А.С. Поляков,
А.В. Двуреченский
Зарождение и рост квантовых точек Ge на Si –
моделирование с использованием
высокоэффективных алгоритмов26

Наноструктуры, включая нанотрубки

Р.А. Буянов, В.Н. Пармон
Дисперсные никелевые частицы как полифункциональные
наноразмерные структуры – химические нанороботы,
синтезирующие углеродные наноматериалы35

В.И. Авиллов, О.А. Агеев, В.А. Смирнов, М.С. Солодовник, О.Г. Цуканова
Исследование режимов наноразмерного профилирования
поверхности эпитаксиальных структур арсенида галлия
методом локального анодного окисления42

Т.Ю. Киселева, А.И. Лещко, Т.Л. Талако, С.А. Ковалева, Т.Ф. Григорьева,
А.А. Новакова, Н.З. Ляхов
Влияние локальной структуры механохимически
полученных порошковых прекурсоров на микроструктуру
СВС-композитов $Fe_2O_3/Fe/Zr/ZrO_2$ 47

Н.В. Курбатова, М.Ф. Галютдинов, В.И. Нуждин, В.Ф. Валеев,
Ю.Н. Осин, А.Л. Степанов
Наблюдение рамановских спектров наночастиц
серебра в пористом кремнии, сформированных
ионной имплантацией54

С.В. Стовбун, А.А. Скоблин, Р.Г. Костяновский, О.М. Крутиус,
В.П. Мельников, А.А. Берлин
Оценка сорбционной способности
супрамолекулярных водородных губок58

В.В. Томаев, Ю.С. Тверьянович, М.Д. Бальмаков
Управление фазовым составом
наноструктурированного йодида серебра64

Нanomатериалы функционального назначения

М.М. Назаров, Е.В. Хайдуков, А.Г. Савельев, В.И. Соколов,
А.С. Ахмапов, А.П. Шкуринов, В.Я. Панченко
Терагерцовый отклик полимерного композита с высокой
концентрацией микро- и наночастиц кремния. 68

Н.Л. Овчинников, В.В. Арбузников, А.П. Капинос, А.Г. Белозеров,
М.Ф. Бутман

Влияние механоактивации монтмориллонита
на эффективность интеркаляции полигидроксикомплексов
алюминия при формировании
слоисто-столбчатой структуры74

Нanomатериалы конструкционного назначения

М. Токита
Настоящее и будущее технологий спекания
керамики в связи с разработкой метода
электроимпульсного плазменного спекания (ЭИПС) 80

Нанобиология

В.Б. Бородулин, И.А. Горошинская, П.С. Качесова, И.В. Бабушкина,
О.Е. Положенцев, Н.А. Дурнова, Р.А. Василиадис, О.Э. Лосев,
Ю.С. Чесовских, Е.Г. Чеботарева
Изучение биологического действия наночастиц железа .86

А.А. Анисимова, В.В. Чайка, В.Л. Кузнецов, К.С. Голохваст
Изучение влияния многослойных углеродных
нанотрубок (12–14 нм) на основные тканевые
мишени двусторчатого моллюска *Modiolus modiolus* . .94

В.А. Демин, И.В. Гмошинский, В.Ф. Демин, А.А. Аниферова,
Ю.П. Бузулуков, С.А. Хотимченко, В.А. Тутельян
Моделирование межорганного распределения
и бионакопления искусственных наночастиц
(на примере наночастиц серебра).....103

Т.А. Казакова, М.Г. Карлова, О.С. Соколова, Г.В. Максимов
Исследование калиевых каналов в нервной клетке
с помощью комплекса «квантовая точка–блокатор»...110

Т.И. Терпинская, Г.К. Жавнерко, К.Д. Яшин, В.С. Осипович,
Е.А. Петрова, М.В. Артемьев, В.С. Улащик
Взаимодействие флуоресцентных полупроводниковых
наночастиц с опухолевыми клетками115

Л.П. Сычева, Р.И. Михайлова, Н.Н. Беляева, В.С. Журков,
В.В. Юрченко, О.Н. Савостикова, А.В. Алексеева, Е.К. Кривцова,
М.А. Коваленко, Л.В. Ахальцева, С.М. Шереметьева, Н.А. Юрцева,
Л.В. Муравьева
Изучение мутагенного и цитотоксического действия
многослойных углеродных нанотрубок и активного
угля в шести органах мышей *in vivo*120

В.Ф. Федоренко, Д.С. Буклагин, И.Г. Голубев, Л.А. Неменушая
Обзор российских нанопрепаратов для обработки
сельскохозяйственных культур126

А.В. Бычкова, А.Л. Иорданский, А.Л. Коварский, О.Н. Сорокина,
Р.Ю. Косенко, В.С. Маркин, А.Г. Филатова, К.З. Гумаргалиева,
С.З. Роговина, А.А. Берлин
Магнитоанизотропные нанокомпозиты
для контролируемого высвобождения
лекарственных веществ: магнитные
и транспортные характеристики132

Правила для авторов.....140

УДК 535-1

Терагерцовый отклик полимерного композита с высокой концентрацией микро- и наночастиц кремния

М.М. Назаров, Е.В. Хайдуков, А.Г. Савельев, В.И. Соколов, А.С. Ахманов, А.П. Шкуринов, В.Я. Панченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий Российской академии наук (ИПЛИТ РАН), 140700, Московская обл., Шатура, ул. Святоозерская, 1
E-mail: nazarovmax@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.05.2014

Принята в печать: 18.12.2014

Рассмотрены методы формирования композитных материалов с заданным высоким показателем преломления в терагерцовом (ТГц) диапазоне частот за счет введения в матрицу полимера – термопласта нано- или микрочастиц кремния. Исследованы диэлектрические свойства созданных композитов в зависимости от концентрации кремниевых частиц и частоты ТГц-излучения. Определены предельно достижимые величины преломления, поглощения и рассеяния. Продемонстрирована возможность применения композитного материала на основе полиэтилена с импрегнированными наночастицами Si для изготовления элементов ТГц-оптики.

TERAHERTZ RESPONSE OF THE POLYMERIC COMPOSITE WITH HIGH CONCENTRATION OF SILICA MICRO- AND NANO-PARTICLES

Methods of composite materials formation with high refractive index in terahertz (THz) frequency range due to incorporation into a polymer-thermoplast matrix of nano- or micro-particles of silicon are discussed. Dielectric responses of created composites depending on Si particles concentration and on THz radiation frequency are studied. Limiting achievable values of refraction, absorption and scattering are determined. The possibility of applying the composite material based on polyethylene impregnated with Si nano-particles for manufacturing THz optical elements is demonstrated.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач интенсивно развивающихся в последние годы терагерцовых (ТГц) технологий является создание новых функциональных материалов с заданными диэлектрическими свойствами. Такие материалы востребованы при изготовлении оптических элементов, фильтров, просветляющих или отражающих покрытий, а также при разработке оптических устройств, управляемых внешним воздействием. Усилия исследователей направлены, в частности, на создание новых композитных материалов на основе полимерной матрицы с введенными в нее полупроводниковыми частицами различных размеров [1, 2]. Хорошей прозрачностью в ТГц-области частот обладают полупроводники Si, GaAs, Ge. Показатель преломления n этих веществ находится в диапазоне от 3.4 до 4.0 [1, 3, 4], причем их диэлектрическим откликом можно управлять путем лазерной подсветки. Однако полупроводниковые материалы не технологичны при создании световодов и неудобны для передачи ТГц-излучения на расстояния до нескольких метров. С другой стороны, полимеры-термопласты обладают гибкостью, малым весом, хорошей прочностью и технологичностью (способны к вытягиванию, штамповке и т.п.), но они имеют низкий показатель преломления, типично от 1.4 до 1.5 [3–5]. Объединение достоинств полимеров и полупроводников открывает возможности создания новых конструкционных и функциональных материалов для ТГц-диапазона частот.

Идея создания композитного материала для передачи ТГц-излучения, обладающего заданным высоким показателем преломления и требуемыми механическими свойствами, хорошо известна (см., например, [6]). Она состоит в том, что в пластичную матрицу, имеющую низкий показатель преломления n_1 , вводится армирующий наполнитель, обладающий высоким показателем преломления n_2 . При этом главными требованиями к матрице и наполнителю являются низкий коэффициент поглощения и возможность образования оптически однородного композита. Сочетание различных веществ позволяет создавать новые композитные материалы,

свойства которых количественно и качественно отличаются от свойств каждой из составляющих его компонент, особенно в случае проводящих частиц. В перспективе композиты будут превосходить по своим функциональным свойствам традиционные материалы. В данной работе в качестве армирующих наполнителей применялись частицы кремния. При этом, как оказалось, принципиальное значение имеет оксидный слой на поверхности этих частиц, который обладает большим поглощением в ТГц-диапазоне частот, чем кристаллический кремний и полимерная матрица. Наличие оксидного слоя определяет оптимальный размер кремниевых частиц, которые используются в качестве наполнителя. Действительно, с уменьшением размера частиц возрастает относительный вклад поверхностного оксидного слоя в поглощение, что накладывает ограничение на их минимальный размер. С другой стороны, необходимость уменьшения потерь, обусловленных светорассеянием в композитном материале, ограничивает максимальный размер кремниевых частиц.

Для создания композитных материалов использовались матрицы из полиэтилена и парафина. Продемонстрирована возможность создания полимерно-кремниевого композита с низкими потерями, имеющего показатель преломления $n = 2.2$ в диапазоне 0.1–3 ТГц. С использованием этого материала, методом штамповки изготовлена собирающая линза, которая использовалась в комплекте с фотопроводящей ТГц-антенной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кремний в ТГц-диапазоне частот обладает высоким показателем преломления n и низким (при отсутствии легирующих примесей) коэффициентом поглощения α , например на частоте 1 ТГц $n = 3.41$ и $\alpha < 0.01 \text{ см}^{-1}$ [3]. Для создания композитных материалов были использованы наночастицы (НЧ) кремния с диаметром 20–30 нм производства Nanostructured & Amorphous Photonics (США), а также микрочастицы (МКЧ) Si с диаметром 40–50 мкм, изготовленные в лаборатории. Микрочастицы формировались перемалыванием

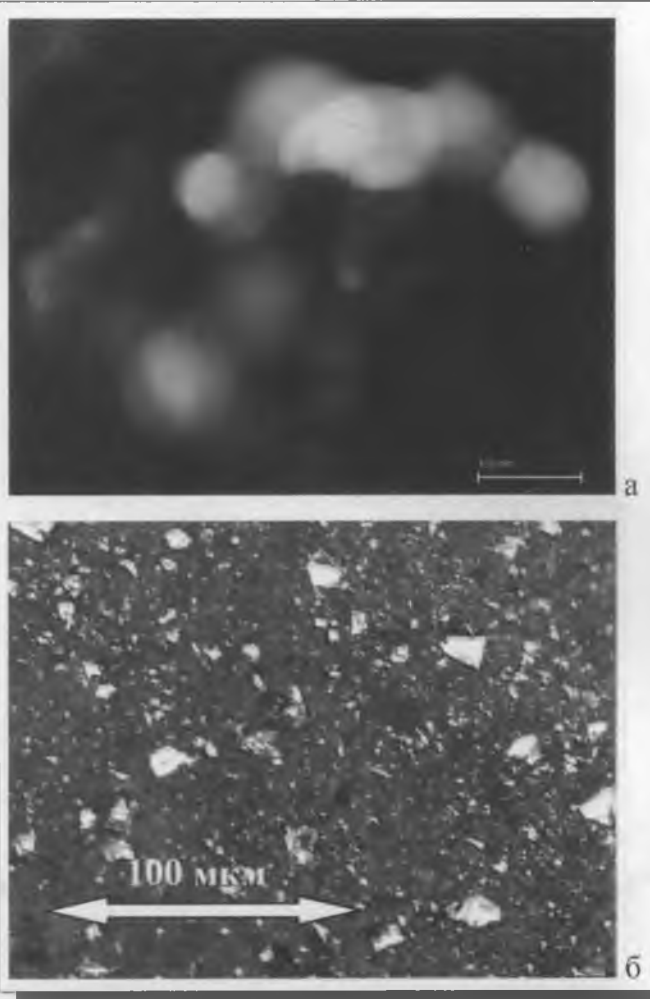


РИСУНОК 1 | (а) ПЭМ-фотография кремниевых наночастиц производства Nanostructured & Amorphous Photonics. (б) Фотография микрочастиц Si в парафиновой матрице, полученная на оптическом микроскопе

кремниевого вейфера марки КБД 12 с удельным сопротивлением $R = 12 \text{ Ом} \cdot \text{см}$ в агатовой ступке. Полученный порошок просеивался через сита с размерами ячейки 50 и 40 мкм. Фотографии нано- и микрочастиц Si приведены на рис. 1.

В качестве матрицы применялся полиэтилен (ПЭ), наиболее прозрачный в ТГц-диапазоне частот полимер-термопласт [5]. После взвешивания компонент порошок ПЭ перемешивали с микро- или наночастицами Si лабораторным миксером. Прессованием смеси при температуре $170 \text{ }^\circ\text{C}$ изготавливались цилиндрические образцы диаметром 13 мм. Исследования, проведенные на оптическом и электронном микроскопах, показали, что частицы Si равномерно распределены в полимерной матрице и не агломерированы.

Помимо полиэтилена, в качестве пластической матрицы был использован парафин. Это обусловлено тем, что МКЧ кремния в парафине образуют более однородный композит, чем при использовании полиэтилена. Формирование парафинкремниевого композитного материала осуществлялось следующим образом. В предварительно разогретый до температуры $80 \text{ }^\circ\text{C}$ парафин добавлялись частицы Si, после чего смесь перемешивалась в магнитной мешалке. Образец остужался до комнатной температуры и формовался с использованием лабораторного пресса. Концентрация частиц кремния в композите варьировалась от 0.2 до 50 % по объему.

Диэлектрические характеристики композитных материалов исследовались с помощью импульсного ТГц-спектрометра [3, 7]. Из амплитуды измеренного комплексного спектра пропускания, с учетом толщины образца, определялся коэффициент потерь, включающий ослабление ТГц-излучения за счет поглощения и рассеяния. Показатель преломления находился из фазы спектра пропускания [5].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 треугольными символами представлены измеренные зависимости коэффициента потерь α и показателя преломления n композитного материала на частоте 1 ТГц в зависимости от объемной доли f_v наночастиц Si в полиэтиленовой матрице. Видно, что с увеличением f_v наблюдается рост коэффициента потерь и показателя преломления композита.

Экспериментальные результаты сопоставлялись с теоретическими зависимостями $\alpha(f_v)$ и $n(f_v)$, полученными при использовании модели эффективной среды Бруггемана (ЕМА), Рэля и квазикристаллического приближения (QCA).

А. Модель эффективной среды Бруггемана. Для частиц с размерами много меньшими длины волны ТГц-излучения параметры $\alpha(f_v)$ и $n(f_v)$ композитного материала можно рассчитать в модели Бруггемана [4, 8, 9]. Согласно этой модели, диэлектрическая проницаемость композита $\epsilon_{eff}(f, f_v)$ определяется через диэлектрические проницаемости кремниевых частиц $\epsilon_{Si}(f)$ и матрицы $\epsilon_{matrix}(f)$ по формуле

$$f_v \frac{\epsilon_{Si}(f) - \epsilon_{eff}(f)}{2\epsilon_{eff}(f, f_v) + \epsilon_{Si}(f)} + (1 - f_v) \frac{\epsilon_{matrix}(f) - \epsilon_{eff}(f, f_v)}{2\epsilon_{eff}(f, f_v) + \epsilon_{matrix}(f)} = 0, (1)$$

где f_v – объемная доля частиц, f – частота ТГц-излучения.

Б. Метод Рэля. Метод Рэля позволяет описать коэффициент потерь в композитном материале в случае малых концентраций введенных частиц. Согласно этому методу, коэффициент потерь α , обусловленный светорассеянием на частицах с размером много меньшим длины волны, описывается формулой [4]

$$\alpha(f, f_v) =$$

$$= \left(\frac{4\pi a^3}{6} \frac{1 + f_v}{f_v} \right)^{-1} \left(\frac{8\pi}{3} k(f)^4 a^6 \left| \frac{\epsilon_{Si}(f) - \epsilon_{matrix}(f)}{\epsilon_{Si}(f) + 2\epsilon_{matrix}(f)} \right|^2 \right), (2)$$

где $k(f) = \frac{2\pi f \sqrt{\epsilon_{matrix}(f)}}{c}$ – волновое число в матрице,

a – радиус частицы, c – скорость света.

В. Квазикристаллическое приближение. Для описания коэффициента потерь и показателя преломления композитной среды с высокой концентрацией частиц можно воспользоваться квазикристаллическим приближением [4]

$$k_{eff}(f, f_v)^2 = k(f)^2 + \frac{3f_v k(f)^2 y(f)}{1 - f_v y(f)} \left(1 + ik(f)^3 a^3 y(f) \frac{(1 - f_v)^4}{(1 - f_v y)(1 + 2f_v)} \right), (3)$$

где $k_{eff}(f, f_v)$ – комплексное волновое число в композите,

$$y(f) = \frac{\epsilon_{Si}(f) - \epsilon_{matrix}(f)}{\epsilon_{Si}(f) + 2\epsilon_{matrix}(f)}$$

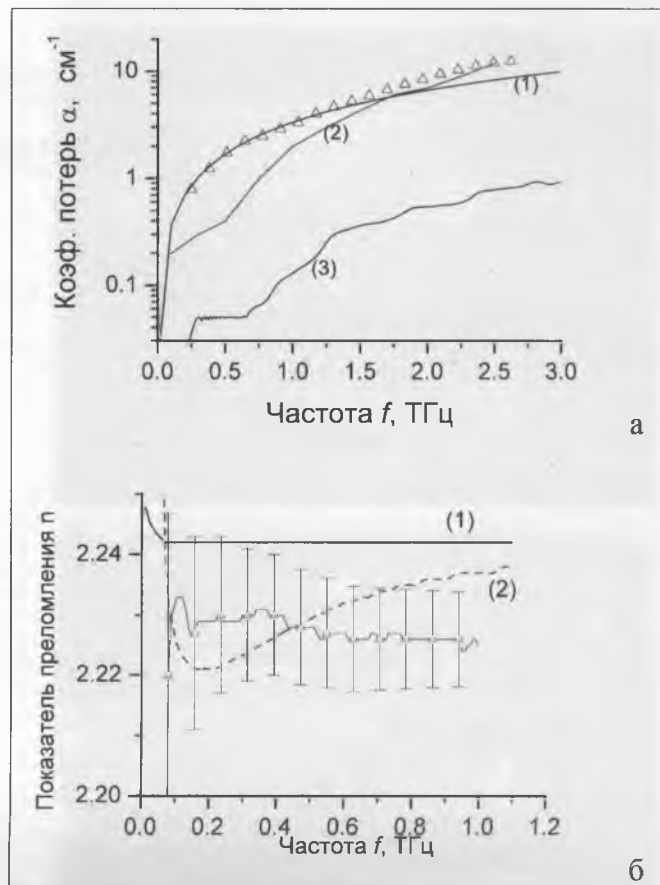
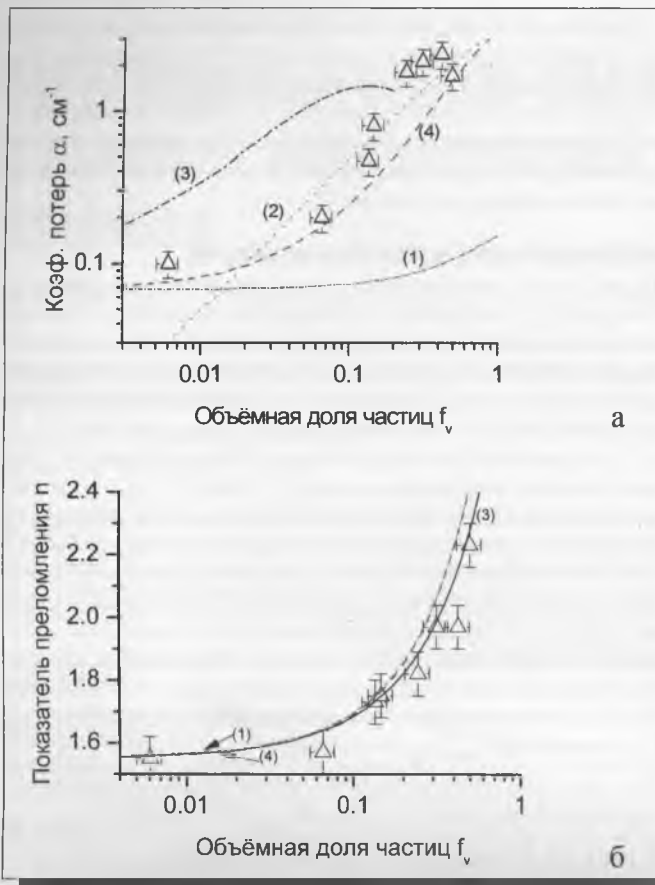


РИСУНОК 2 | Коэффициент потерь $\alpha(f_v)$ (а) и показатель преломления $n(f_v)$ (б) полиэтиленкремниевое композита на частоте $f = 1$ ТГц в зависимости от объемной доли НЧ кремния f_v . Треугольные символы – эксперимент. Сплошные линии – расчет в моделях Бруггемана (1), Рэлея для частиц диаметром 5 мкм (2), QCA для агломератов частиц размером 20 мкм (3), Бруггемана с дополнительным поглощением (4)

РИСУНОК 3 | (а) Треугольные символы – измеренный коэффициент потерь для объемного образца из НЧ кремния, спрессованных на воздухе. Расчет в модели ЕМА с дополнительным поглощением при $f_v = 0.66$ (1). Для сравнения приведены измеренные значения α для диоксида кремния (2) и высокоомного ($R > 100 \text{ Ом} \cdot \text{см}$, $N < 10^{12} \text{ см}^{-3}$) монокристаллического кремния (3). (б) Треугольные символы – измеренный показатель преломления для объемного образца из НЧ кремния, спрессованных на воздухе. Расчет в модели ЕМА при $f_v = 0.66$ для концентрации носителей в кремнии $N = 10^{12}$ (1) и 10^{13} см^{-3} (2)

Отметим, что, если размер частиц много меньше длины волны излучения, модель QCA практически совпадает с моделью ЕМА.

В моделях (1)–(3) коэффициент потерь α и показатель преломления n композитного материала определяются через его диэлектрическую проницаемость ϵ_{eff} или соответствующее волновое число k_{eff} согласно известным формулам [4, 10]

$$\alpha(f, f_v) = \text{Im}(\sqrt{\epsilon_{\text{eff}}(f, f_v)}) \frac{2\pi f}{c} = \text{Im}(k_{\text{eff}}(f, f_v)),$$

$$n(f, f_v) = \text{Re}(\sqrt{\epsilon_{\text{eff}}(f, f_v)}) = \text{Re}(k_{\text{eff}}(f, f_v)) \frac{c}{2\pi f}. \quad (4)$$

Расчетные зависимости $\alpha(f_v)$ и $n(f_v)$, полученные в моделях Бруггемана, Рэлея и квазикристаллическом приближении на основе измеренных значений ϵ_{Si} , ϵ_{matrix} и f_v , показаны на рис. 2 сплошными линиями 1, 2 и 3. Коэффициент потерь α , рассчитанный в этих моделях, включает затухание света за счет поглощения и рассеяния в композитном материале. Принимая во внимание возможность агломерации кремниевых частиц в матрице, их размер выбирался из условия наилучшего совпадения измеренного коэффициента потерь с расчетными значениями. Дисперсия частиц по размерам не учитывалась.

Из рис. 2б видно, что рассчитанные по всем моделям кривые $n(f_v)$ хорошо согласуются с экспериментальными данными

ми. В то же время из сравнения представленных на рис. 2а теоретических кривых 1–3 с экспериментальными данными следует, что ни одна из моделей не соответствует измеренной зависимости $\alpha(f_v)$. На наш взгляд, это связано с тем, что наночастицы Si представляют собой кремниевое ядро, покрытое оболочкой из оксида кремния, обладающего значительным поглощением. Действительно, если увеличить мнимую часть диэлектрической проницаемости кремниевых частиц на 0.1, то кривая 4 на рис. 2а, рассчитанная в модели Бруггемана (1), удовлетворительно соответствует экспериментальной кривой $\alpha(f_v)$.

Для исследования роли оксидной оболочки был изготовлен объемный образец из НЧ кремния, спрессованных на воздухе, в котором отсутствовали воздушные поры, приводящие к рассеянию. Плотность образца составила $\rho_{\text{НЧ}} = 1.54 \text{ гр/см}^3$, что меньше плотности кремния $\rho_{\text{Si}} = 2.33 \text{ гр/см}^3$. Из отношения этих плотностей следует, что объемная доля кремния в образце составляет $f_v = 0.66$. Измеренная зависимость коэффициента потерь изготовленного объемного образца от частоты представлена на рис. 3а, где для сравнения приведены также спектры $\alpha(f)$ диоксида кремния и высокоомного монокристаллического кремния. Видно, что коэффициент потерь в объемном образце существенно превышает таковой в монокристаллическом кремнии, это подтверждает наличие

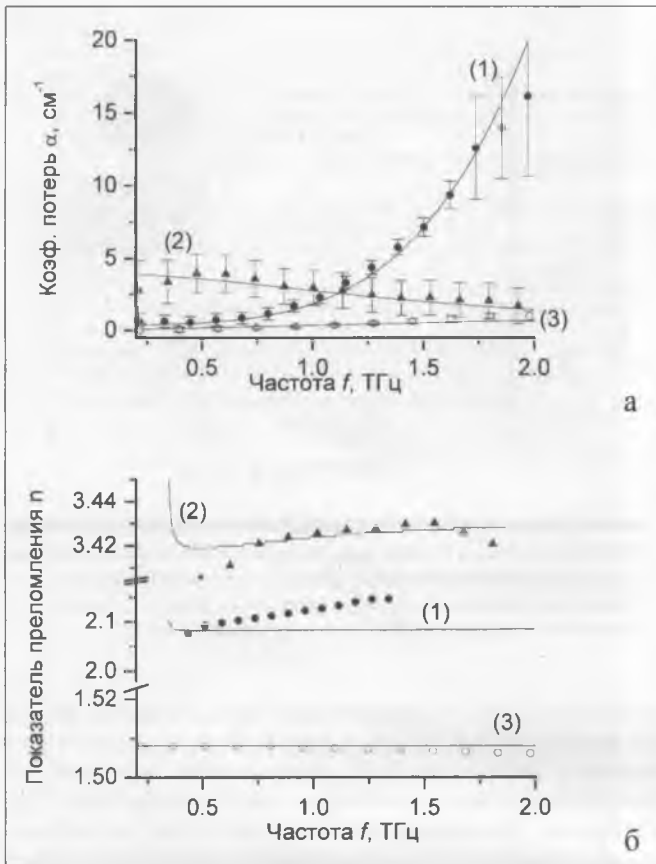


РИСУНОК 4 | Зависимость коэффициента потерь $\alpha(f)$ (а) и показателя преломления $n(f)$ (б) парафинкремниевое композита и составляющих его компонент от частоты f при объемной доле $f_v = 0.2$. В матрицу парафина внедрены частицы кремния диаметром 40 мкм. Сплошные линии: расчет в модели QSA для композита (1), в модели Друде для кремния (2), линейная аппроксимация для матрицы $\epsilon_{\text{матрица}} = 2.25 + i0.003$ (3). Закрытые ромбы, треугольники и открытые ромбы – экспериментальные данные для композита, кремния и парафина соответственно

у НЧ поглощающего оксидного слоя [6]. Определим значение коэффициента потерь НЧ, при котором достигается наилучшее согласие между измеренной и рассчитанной кривыми $\alpha(f)$. С использованием модели Бруггемана (1) при $f_v = 0.66$ получим $\text{Im}(\epsilon_{Si}) \approx 0.1$, что соответствует $\alpha(f = 1 \text{ ТГц}) = 3.7 \text{ см}^{-1}$, см. кривую 1 на рис. 3а.

Полученная оценка коэффициента потерь относится к НЧ кремния «в целом», т.е. включает поглощение и в кремниевом ядре, и в оксидной оболочке. Оценим вклад кремниевого ядра в общий коэффициент потерь. Для этого сравним представленную на рис. 3б экспериментальную зависимость $n(f)$ для объемного образца с зависимостью, рассчитанной в модели Бруггемана (1). Полагая $f_v = 0.66$ и учитывая, что диэлектрическая проницаемость кремниевого ядра описывается моделью Друде [11]

$$\epsilon(f, N) = \epsilon_{\infty} - \frac{f_p(N)^2}{f^2 + i\gamma f}, \quad (5)$$

где $\epsilon_{\infty} = 11.7$ – диэлектрическая проницаемость при $f \rightarrow \infty$,

$$f_p^2 = \frac{Nq^2}{(2\pi)^2 \epsilon_0 m^*} - \text{плазменная частота,}$$

N – концентрация свободных зарядов, $\gamma = 0.4 \text{ ТГц}$ – частота релаксации носителей, m^* – эффективная масса носителей

заряда, ϵ_0 – диэлектрическая постоянная, для $N = 10^{12} \text{ см}^{-3}$ и $N = 10^{13} \text{ см}^{-3}$ получим зависимости $n(f)$, представленные на рис. 3б кривыми 1 и 2 соответственно. Отметим широкий провал в расчетной зависимости $n(f)$ вблизи плазменной частоты $f_p = 0.2 \text{ ТГц}$ для $N = 10^{13} \text{ см}^{-3}$, который отсутствует в экспериментальной кривой $n(f)$. Это позволяет заключить, что концентрация свободных носителей заряда в кремниевом ядре НЧ не превышает $N = 10^{12} \text{ см}^{-3}$, следовательно, коэффициент потерь для ядра частицы $\alpha < 0.1 \text{ см}^{-1}$.

Отметим, что концентрацию N можно увеличить на порядки при лазерной подсветке кремния, однако для используемых образцов облучение со средней интенсивностью 10 Вт/см^2 ($\lambda = 0.8 \text{ мкм}$) привело к слишком малому (1–2 %) изменению ТГц-пропускания [10]. Такое малое изменение пропускания, как для случая НЧ, так и для случая МКЧ требует дальнейшего исследования.

При концентрации свободных носителей $N < 10^{13} \text{ см}^{-3}$ диэлектрическая проницаемость ядра НЧ в ТГц-диапазоне практически совпадает с таковой для объемного кремния [12, 13]. Поэтому отличие между полученной из рис. 3б оценкой коэффициента поглощения ядра $\alpha \approx 0.1 \text{ см}^{-1}$ и значением $\alpha = 3.7 \text{ см}^{-1}$, рассчитанным из рис. 3а, позволяет оценить параметры оксидной оболочки НЧ. Действительно, если предположить, что толщина оксидной пленки равна 3 нм, а радиус кремниевого ядра составляет 20 нм, используя модель Бруггемана, можно оценить коэффициент поглощения оксидной пленки, как $\alpha \approx 20 \text{ см}^{-1}$, что несущественно превышает значения для коэффициента поглощения аморфного SiO_2 (см. рис. 3а). Превышение может быть обусловлено тем, что на поверхности НЧ сорбируются дополнительные поглощающие примеси, в частности вода [14]. Рассчитанный из модели Бруггемана показатель преломления оксидной пленки $n \approx 2$ согласуется с данными по преломлению SiO_2 в ТГц-диапазоне частот. Таким образом, предположение, что объемная доля оксидной пленки в кремниевой наночастице составляет 34 %, приводит к согласию между полученными экспериментальными данными.

Рассмотрим теперь случай МКЧ кремния с такой же толщиной оксидного слоя. Вклад этого слоя в результирующие потери пренебрежимо мал, поскольку мала объемная доля самого оксидного слоя. На рис. 4 представлены спектры коэффициента потерь и показателя преломления композитного материала на основе парафина с внедренными МКЧ (размер частиц 40 мкм, объемная доля $f_v = 0.2$). Для изготовления МКЧ использовался кремниевый вейфер с концентрацией носителей $N \approx 10^{13} \text{ см}^{-3}$, спектр поглощения которого представлен кривой 2 на рис. 4а.

Как видно из рис. 4а, измеренный коэффициент потерь $\alpha(f)$ в парафинкремниевом композите близок к теоретическому расчету с использованием модели QSA, что подтверждает малый вклад оксидного слоя МКЧ в коэффициент потерь. Модель QSA принимает во внимание поглощение и рассеяние ТГц-излучения, при этом спектр $\alpha(f)$ описывается квадратичной функцией от частоты. Обратим внимание на особенность спектра $n(f)$ композита, представленного на рис. 4б сплошными кружками. В частотной области $f > 0.3 \text{ ТГц}$, где основной вклад в потери обусловлен рассеянием, измеренный показатель преломления возрастает с частотой быстрее, чем следует из моделей Бруггемана или QSA. Это позволяет по виду кривой $n(f)$ судить о вкладе светорассеяния в коэффициент потерь.

На рис. 5 показаны зависимости коэффициента потерь в парафинкремниевом композите от частоты и от радиуса МКЧ Si. Видно, что потери, связанные со светорассеянием на частицах диаметром менее 40 мкм, становятся мень-

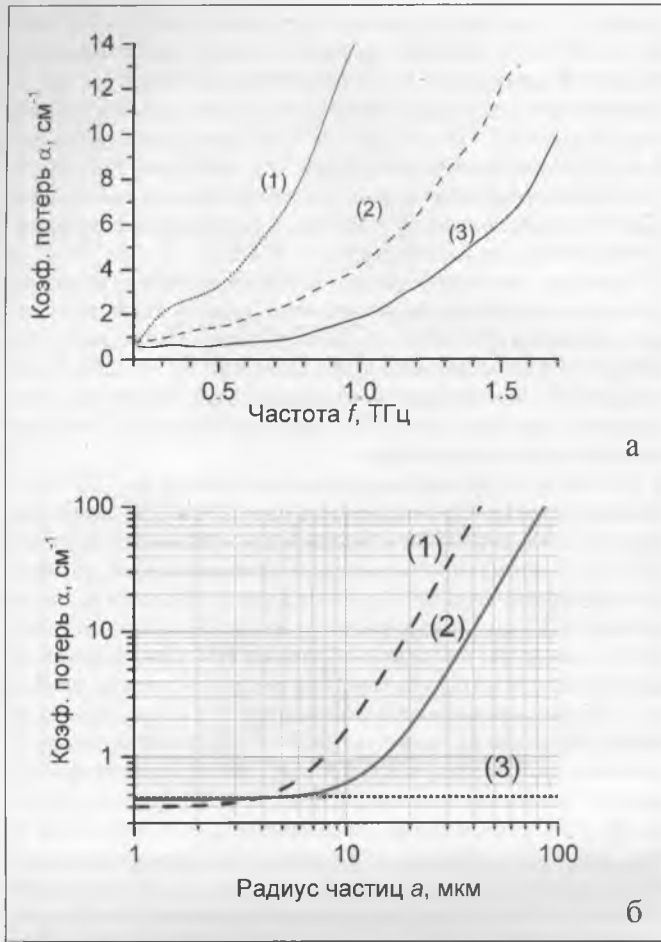


РИСУНОК 5 | (а) Измеренные спектры коэффициента потерь $\alpha(f)$ в парафинкремниевом композите при объемной доле $f_v = 0.1$. Диаметр частиц Si составляет более 50 мкм (1), 40–50 мкм (2), менее 40 мкм (3). (б) Зависимости коэффициента потерь в композите от радиуса a кремниевых частиц при $f_v = 0.1$ и $f = 1$ ТГц, рассчитанные в моделях Рэлея (1), QCA (2), Бруггемана (3)

ше потерь, обусловленных поглощением, при частотах менее 0.7 ТГц.

Сравнение экспериментальных и теоретических данных, представленных на рис. 5а, б соответственно, показывает, что рассеяние излучения с частотой 1 ТГц в композите несущественно, когда диаметр частиц меньше 10 мкм, т.е. когда длина волны λ (частота 1 ТГц соответствует длине волны $\lambda = 300$ мкм) в 30 раз больше диаметра кремниевых частиц. Из представленных на рис. 4а и 5а экспериментальных данных также следует, что для частот ниже 0.3 ТГц рассеяние на частицах диаметром 40 мкм становится пренебрежимо малым при выполнении условия $a/\lambda < 0.04$. Это неравенство ограничивает размер частиц сверху, а наличие поглощающего оксидного слоя у НЧ ограничивает размер частиц снизу. В результате получаем оценку для оптимального диаметра частиц Si $2a = 1 - 3$ мкм. Максимальная объемная доля кремниевых частиц в матрице ограничивается величиной $f_v = 0.7$, что соответствует $n = 2.3$ и ожидаемому коэффициенту потерь $\alpha < 0.02$ см⁻¹ для композита из полиэтилена и микрочастиц высокоомного кремния ($R > 100$ Ом · см).

Из полиэтиленкремниевого композитного материала с показателем преломления $n = 2.2$ методом штамповки

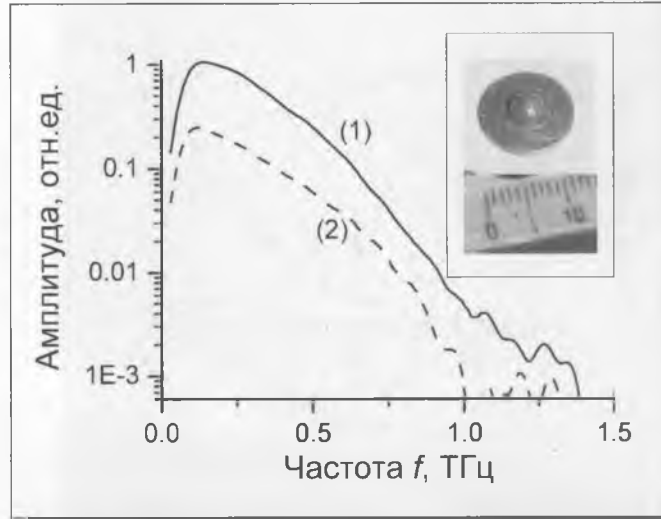


РИСУНОК 6 | Спектр ТГц-излучения, собранного детектором при использовании полиэтиленкремниевой линзы (1) и в отсутствие линзы (2). На вставке приведена фотография изготовленной линзы. Диаметр полусферы линзы равен 4.8 мм, толщина подставки 0.8 мм

была изготовлена полусферическая линза диаметром 4.8 мм, см. вставку на рис. 6. Линза прижималась на оптический контакт к пластине из GaAs, содержащей на обратной стороне фотопроводящую антенну – точечный источник ТГц-излучения. Выходящее из линзы излучение собиралось дополнительной широкоапертурной линзой (диаметр 50 мм, фокусное расстояние 50 мм) в ТГц-детектор. Использование линзы из композитного материала позволило повысить амплитуду собранного детектором ТГц-излучения в 5 раз [15], см. рис. 6. Из подобия кривых 1 и 2, которые получены при использовании полиэтиленкремниевой линзы и в отсутствие линзы соответственно, видно, что потери, обусловленные поглощением в композитном материале и линейно растущие с частотой, несущественны для малых размеров линзы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены методы создания композитных материалов с управляемым показателем преломления для ТГц-диапазона частот за счет введения в полимер-термопласт микро- или наночастиц кремния. Показано, что для изготовления композитного материала с высоким показателем преломления оптимально использовать микрочастицы Si диаметром 1–3 мкм, поскольку в таких частицах влияние поверхностного оксидного слоя на поглощение невелико. Продемонстрирован полиэтиленкремниевый композит, обладающий высоким показателем преломления $n = 2.2$ и относительно низким коэффициентом потерь $\alpha < 2$ см⁻¹. Обоснована возможность уменьшения коэффициента потерь в композитном материале до величины 0.02 см⁻¹. Показана применимость созданного композита для изготовления специализированных линз для ТГц-диапазона частот. ■

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 14-02-00846), президентским молодежным грантом МК-6798.2013.9, а также грантом Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых (контракт 14.B25.31.0019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ung B., Dupuis A.B., Stoeffler K.A., Dubois C.K., Skorobogatiy M.C. // *J. Opt. Soc. Am. B.* 2011. V. 28. P. 917.
2. Wichmann M., Mondol A.S., Kocic N., Lippert S., Probst T., Schwerdtfeger M., Schumann S., Hochrein T., Heidemeyer P., Bastian M., Bastian G., Koch M. // *Applied Optics.* 2013. V. 52. № 18. P. 4186.
3. Lee Y.-S. *Principles of Terahertz Science and Technology.* New York: Springer, 2009. 164 p.
4. Peiponen K.-E., Zeitler J.A., Kuwata-Gonokami M. *Terahertz Spectroscopy and imaging.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. 106 p.
5. Fedulova E.V., Nazarov M.M., Angeluts A.A., Kitai M.S., Sokolov V.I., Shkurinov A.P. // *Proc. of SPIE.* 2012. V. 8337. P. 833701.
6. Ищенко А.А., Фетисов Г.В., Асланов Л.А. *Нанокремний: свойства, получение, применение, методы исследования и контроля.* М.: Физматлит, 2011. С. 83.
7. Назаров М.М., Шкуринов А.П., Кулешов Е.А., Тучин В.В. // *Квантовая электроника.* 2008. Т. 38. № 7. С. 647.
8. Scheller M., Wietzke S., Jansen C., Koch M. // *J. Phys. D Appl. Phys.* 2009. V. 42. P. 065415.
9. Головань Л.А., Тимошенко В.Ю., Кашкаров П.К. // *УФН.* 2007. Т. 177. С. 619.
10. Nazarov M., Khaydukov E., Sokolov V., Panchenko V., Shkurinov A. // *Proc. of IRMMW-THz.* 2013. P. 1-2.
11. Lloyd-Hughes J., Jeon T.-I. // *J. Infrared Milli Terahz Waves.* 2012. V. 2. № 33. P. 871–925.
12. Nienhuys H.-K., Sundström V. // *Appl. Phys. Lett.* 2005. V. 87. P. 012101.
13. Жукова Е.С., Прохоров А.С., Спекор И.Е., Караванский В.А., Мельник Н.Н., Заварицкая Т.Н., Горшунов Б.П. // *Физика твердого тела.* 2007. Т. 49. С. 2137.
14. Мухин В.И., Ходан А.Н., Назаров М.М., Шкуринов А.П. // *Изв. вузов. Радиофизика.* 2011. Т. 54. № 8–9. С. 656.
15. Саркисов С.Ю., Сафулин Р.Д., Скакунов М.С., Толбанов О.П., Тяжев А.В., Назаров М.М., Шкуринов А.П. // *Изв. вузов. Физика.* 2012. Т. 55. № 8. С. 31.

УДК 615.281[6:539] – 022.532

Изучение биологического действия наночастиц железа

В.Б. Бородулин¹, И.А. Горошинская², П.С. Качесова², И.В. Бабушкина³, О.Е. Положенцев⁴,
Н.А. Дурнова¹, Р.А. Василиадис¹, О.Э. Лосев¹, Ю.С. Чесовских¹, Е.Г. Чеботарева¹

¹ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112

²ФГУ «РНИОИ Росмедтехнологий», 344037, Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

³ФГУ «СарНИИТО» Минздрава России, 410002, Саратов, ул. Чернышевского, 148

⁴Южный федеральный университет, Исследовательский центр наноразмерных структур, 344090, Ростов-на-Дону, ул. Зорге, 5
E-mail: borodulinvb@mail.ru

Поступила в редакцию: 31.12.2013

Принята в печать: 18.12.2014

Изучалось биологическое действие наночастиц железа размером частиц 20–40 нм, полученных плазмохимическим методом. Выявлено антимикробное действие наночастиц железа в диапазоне 0.1–10 мг/мл на антибиотикорезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Stafilococcus aureus*. Установлено токсическое действие наночастиц на организм животных при введении им наночастиц железа per os, проявляющееся в изменении показателей углеводного, липидного и белкового обмена.

STUDY OF BIOLOGICAL ACTION OF IRON NANOPARTICLES

The biological action of iron nanoparticles sized 20–40 nm, obtaining plasmochemical method, was studied. Antibacterial action on polyantibiotic resistant strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Stafilococcus aureus* occurred at concentrations in the range of iron nanoparticles of 0.1–10 mg/ml. Also revealed toxic action of iron nanoparticles on male mice, exceeded them per os, displaying change in biochemical parameters of carbohydrates, lipids and proteins.

ВВЕДЕНИЕ

Медицинские приложения использования нанотехнологий привели к созданию отрасли науки — наномедицине, которая эффективно развивается в последние десятилетия [1]. В области медицины возможности нанотехнологий направлены на управление с помощью наноматериалов и наночастиц физическими, химическими и биологическими процессами, протекающими в живых организмах на молекулярном уровне [2].

Одной из главных причин изменения физических и химических свойств малых частиц по мере уменьшения их размеров является рост относительной доли «поверхностных» атомов. С энергетической точки зрения уменьшение размеров частицы приводит к возрастанию роли поверхностной энергии. Уменьшение частиц до нанометровых размеров приводит к проявлению в них так называемых «квантовых размерных эффектов». В настоящее время уникальные физические свойства наночастиц, возникающие за счет поверхностных или квантово-размерных эффектов, являются объектом интенсивных исследований [3, 4].

В настоящее время на основе нанотехнологий проектируются и внедряются в практику наностройства, позволяющие выполнять все необходимые операции от диагностики и мониторинга до уничтожения патогенных микроорганизмов, восстановления поврежденных органов, снабжения организма необходимыми веществами [5, 6].

Наночастицы могут использоваться как стимулирующие препараты, так как проявляют ярко выраженную биологическую активность. Обнаружена высокая антимикробная активность наночастиц металлов; на основе таких материалов разработаны элементы фильтрующих устройств для очистки питьевой воды [7]. Применение наночастиц может оказаться полезным при лечении таких заболеваний, как трофические язвы — время заживания раны сокращается в несколько раз [8], гнойный остеомиелит, различного вида ожоговые раны, лор-заболевания в детском возрасте [8–12].

Следует учитывать, что при использовании наночастиц необходимо тщательно изучить влияние наночастиц на здоровые клетки организма, контролировать отсутствие токсического действия наночастиц, что само по себе является непростой задачей [1]. Для некоторых наноматериалов выявлены не только полезные свойства, но и обнаружены токсические эффекты [13, 14].

Представленные данные по токсическим свойствам некоторых наноматериалов свидетельствуют, что токсичность зависит не только от физической природы, способа получения, размеров, структуры нанокластеров и наночастиц, но и от биологической модели, на которой проводятся испытания. Органы-мишени и механизмы развития токсического эффекта разнообразны. Свойства некоторых наноразмерных материалов проявляются в способности индуцировать активные формы кислорода [15, 16], другие же наночастицы могут проникать через тканевые барьеры внутрь клеток и взаимодействовать с внутриклеточными компонентами [17]. Это создает предпосылки для моделирования экологического прессинга металлов на организм [13].

В данной работе рассмотрены некоторые аспекты биологического действия наночастиц железа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались высокодисперсные нанопорошки железа, синтезированные на плазмохимическом комплексе филиала Федерального государственного управления РФ «Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений» (ФГУП РФ ГНЦ ГНИИХТЭОС г. Москва, лаборатория № 33). Нанопорошки железа получены из крупнодисперсных порошков с помощью плазменной технологии, основанной на испарении сырья (крупнодисперсного порошка или прутка) в плазменном потоке с температурой 5000–6000 К и конденсации пара до ультрадисперсных частиц требуемого размера (дисперсность частиц 30 нм). Основным

элементом плазмохимической установки является реактор — электродуговой испаритель-конденсатор с вихревой стабилизацией плазменной струи большого удлинения, кроме него в состав установки входят: дозатор дисперсного сырья — аппарат поршневого типа с ожижением подаваемого сырья; холодильник дисперсного сырья — типа «труба в трубе» с высокими скоростями аэрозольного потока; классификаторы порошков — циклон инерционного типа и вихревой соотношением $d_{\text{вых}}/D \leq 0.33$; фильтр улавливания нанопорошков рукавного типа. Применяется стандартное оборудование: компрессоры технологического газа; ресиверы газового контура; дозаторы газовые и водяные; водяной насос; вакуумный насос. Чистота нанопорошков составила не менее 99.8 %. Средний размер наночастиц колебался в пределах 20–40 нм.

СТРУКТУРА НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА

Исследование структуры наночастиц и растворов на их основе проводилось с помощью метода спектроскопии рентгеновского поглощения на основе анализа тонкой структуры спектров рентгеновского поглощения в области края поглощения (XANES — X-ray absorption near edge spectroscopy). Спектры рентгеновского поглощения (XANES) за К-краями железа в наночастицах и эталонных образцах железной фольги и оксидов железа были измерены на лабораторном спектрометре рентгеновского поглощения R-XAS Looper (Rigaku, Япония), установленном в ЦКП «Наноразмерная структура вещества» Южного федерального университета.

Измерение К-края железа в наночастицах проводилось с использованием кристалла-монокроматора Ge(311) во флуоресцентном режиме с использованием детектора 10 Ag-300 и полупроводникового детектора I SSD с усилителем. Напряжение на рентгеновской трубке составляло $U = 25$ кВ и ток $I = 70$ мА. Исследуемые образцы наночастиц были измерены в сухой фазе и в 0.9 % водном растворе хлорида натрия.

Спектры поглощения исследуемых наночастиц сопоставлялись с эталонными образцами, по форме и энергетическому положению особенностей спектров поглощения делался вывод о структуре наночастиц.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ И СРЕДЫ

Исследования проводили на 20 штаммах *Pseudomonas aeruginosa* и 20 штаммах *Stafilococcus aureus*, обладающих резистентностью к пяти- и более профильным антибиотикам, которые были выделены от больных с гнойными осложнениями, находившихся на лечении в травматолого-ортопедическом стационаре Саратовского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (СарНИИТО). В пробирки с разведениями нанопорошков в физиологическом растворе в различных концентрациях (0.1, 1, 10 мг/мл) добавляли по 100 мкл конечной суспензии (50000 КОЕ/мл) микроорганизмов и оставляли инкубироваться в течение 30, 60, 120 и 180 мин при комнатной температуре. В качестве контроля использовали бактериальную взвесь, разведенную в аналогичных пропорциях с физиологическим раствором и инкубированную в течение того же времени. После этого с каждого из разведений производили высеивание на мясоептонный агар, по 100 мкл на каждую чашку Петри. Все чашки помещали в термостат на 24 ч при 37 °С. Подсчет колоний производили на следующий день.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были выполнены на белых беспородных мышах. Контрольные и экспериментальные группы форми-

ровали из двухмесячных самцов весом 20 ± 3 г. Мыши находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения с соблюдением общеживотного рациона. У всех животных был свободный доступ к пище и воде.

Мышей распределяли в одну контрольную группу (10 мышей), которой вводили растительное масло в количестве 10 мкл без нанопорошков металлов — группа сравнения; и семь экспериментальных групп (70 мышей).

Экспериментальная часть работы выполнена в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009) [18–20].

Экспериментальные группы формировали в зависимости от суточной концентрации вводимого исследуемого нанопорошка. Первой группе вводили 50 мкг/кг, второй — 100 мкг/кг; третьей — 1 мг/кг, четвертой — 1.25 мг/кг, пятой — 2.5 мг/кг, шестой — 5 мг/кг, седьмой — 12.5 мг/кг нанопорошка железа.

Выбранные концентрации наночастиц не превышают максимальных переносимых доз для данного металла. Все концентрации нанопорошка вводились в течение 6 дней в виде свежеприготовленных суспензий в растительном масле (рафинированное растительное масло «Милора») в количестве 10 мкл однократно в сутки перорально с использованием зонда. Суспензии готовились путем соединения навески наночастиц (в размере тысячи доз) с растительным маслом в объеме 10 мл и размешивались на магнитной мешалке в течение 30 мин для предотвращения оседания частиц и образований конгломератов.

Умерщвление животных в эксперименте не проводилось. Кровь для биохимических исследований собиралась из венозных вен. Работа проведена с соблюдением принципов гуманного отношения к животным соответственно руководствам Н.Н. Каркищенко и практическому руководству по биологической безопасности в лабораторных условиях [18, 19].

Определение биохимических показателей крови проводилось с помощью полуавтоматического анализатора Hospitex Screen master plus (Швейцария), оборудованного термостатом, фотометром и микропроцессором. Для работы на анализаторе использовались стандартные наборы реактивов производства ЗАО «Диакон-ДС». В сыворотке крови определяли концентрации метаболитов, характеризующих:

- обмен углеводов: глюкозу (глюкозооксидазным методом), лактат (лактатоксидазным методом), ПВК (методом Умбрайт);
- обмен белков: общий белок (биуретовым методом), альбумин (по реакции с бромкрезоловым зеленым), мочевины (уреазным глутаматдегидрогеназным методом), креатинин (по реакции Яффе);
- обмен липидов: общий холестерин (холестероксидазным методом);
- пигментный обмен: общий билирубин (по реакции с дихлоранилином), прямой билирубин (по реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой);
- активность индикаторных ферментов: АсАТ, АлАТ, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), КФК, ГГТ (колориметрическим методом по Зейц/Персин) унифицированными методами, разработанными в соответствии с рекомендациями Международной Федерации клинической химии.

Согласно руководству по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях, с помощью животных моделей можно изучать изменения биохимических показателей, интерпретировать и применять их относительно показателей здоровья человека [19].

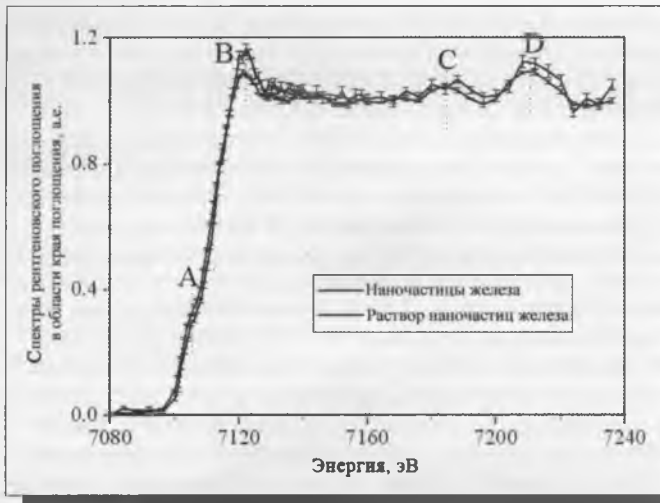


РИСУНОК 1 | Сопоставление экспериментальных Fe K-XANES-спектров порошка наночастиц железа и их раствора



РИСУНОК 2 | Сопоставление кривых первых производных экспериментальных Fe K-XANES-спектров наночастиц железа порошка и их раствора

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

• СТРУКТУРА НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА

Для исследования структуры наноматериалов с характерными размерами 10–100 нм невозможно использовать традиционные рентгеновские методы. Для определения структуры таких материалов и фазового состава, входящих в них компонент, используется метод рентгеновской спектроскопии поглощения. XANES — метод, в отличие от других рентгеновских методик, может дать наиболее полную информацию о геометрии исследуемых объектов. К тонкой структуре рентгеновского поглощения относят осциллирующий характер коэффициента поглощения рентгеновского излучения с энергией выше края поглощения. Тонкая структура рентгеновского поглощения является отличительной чертой данного материала и зависит от его атомного строения, а также от его электронных и колебательных свойств. По этой причине данная методика содержит важные данные о материале, например о его локальном атомном строении (виды атомов, их координаты). Изучая структуру края рентгеновского поглощения, можно получать сведения о зарядовом состоянии атомов в исследуемых веществах, особенностях химической связи между атомами, геометрических параметрах вещества. На основе сопоставления спектров со спектрами эталонных образцов можно судить о присутствии в соединении той или иной фазы.

На рис. 1 показаны Fe K-XANES-спектры порошка наночастиц железа и его раствора.

Рис. 1 показывает, что структура наночастиц в растворе не изменилась и представляет собой частицы металлического железа. Увеличение интенсивностей особенностей спектра раствора означает, что в растворе присутствуют частицы более мелкого размера, чем в порошке, так как более крупные частицы осели на дно кюветы, в которой находился раствор при измерении спектров поглощения. Изменение формы спектра и смещение предкрая спектра наночастиц железа в растворе относительно спектра порошка не наблюдаются, что говорит о том, что наночастицы железа в растворе не окислились.

Смещение края поглощения спектров хорошо видно по кривым первым производным в области предкрая (рис. 2). Так как размер частиц с одной и той же степенью окисления оказывает значительное влияние на интенсивности особенностей спектров, при этом спектры будут иметь незначи-

тельные смещения края поглощения, однако позиции точки перегиба края поглощения должны оставаться одинаковыми. Таким образом, чтобы показать, что частицы имеют одну и ту же степень окисления или отличаются, нужно проверить положение точек перегиба спектров на краю поглощения. Позиция точки перегиба края поглощения определяется по максимуму первой производной в области этой точки.

Все экстремумы кривых первых производных на рис. 2 двух спектров лежат друг под другом, незначительное смещение положений особенностей А и В безусловно связано с ошибкой измерения. Синей пунктирной линией отмечена форма максимумов для нахождения энергетического положения максимумов. Интенсивности особенностей спектров могут незначительно отличаться, но положения максимумов остаются практически одинаковыми. Следовательно, в растворе наночастицы металлического железа не окислились.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА

Установлено, что антибактериальная активность наночастиц железа колеблется в широком диапазоне концентраций от 0.1 до 10 мг/мл. Использование концентрации 0.1 мг/мл вызывает снижение количества выживших клеток на 52 % ($p < 0.001$) при максимальной экспозиции. Использование максимальной концентрации 10 мг/мл в течение 180 мин приводило к уменьшению числа колоний на 65 %. Результаты подсчета колоний *P. aeruginosa*, выросших на твердых питательных средах, после воздействия различных концентраций наночастиц железа, а также результаты подсчета в контрольной группе, не подвергавшейся влиянию ультрадисперсных порошков, представлены в табл. 1.

Результаты подсчета количества колоний *St. aureus*, выросших на твердых питательных средах, после воздействия различных концентраций наночастиц железа в течение 30–180 мин, а также результаты подсчета в контрольной группе, не подвергавшейся влиянию ультрадисперсных порошков, представлены в табл. 2.

После воздействия наночастиц железа в концентрациях — 0.1, 1 и 10 мг/мл происходило статистически достоверное снижение количества выживших бактериальных клеток — от 54 до 46 % по мере увеличения экспозиции и концентрации препарата ($p < 0.001$). В более низких концентрациях антибактериальный эффект наночастиц железа не обнаруживается.

ТАБЛИЦА 1 | Количество колоний *P. aeruginosa*, выросших на твердых питательных средах после воздействия наночастиц железа

Время воздействия, мин	Опытные группы			
	1-я 0.1 мг/мл, n = 20 (M ± m)	2-я 1 мг/мл, n = 20 (M ± m)	3-я 10 мг/мл, n = 20 (M ± m)	Контроль n = 20 (M ± m)
30	618±25.3*	584±26.2**	503±28.7**	686±25.8
60	508±21.8**	486±29.7**	415±33.9**	694±27.3
120	355±20.4**	326±28.4**	296±27.8**	722±23.8
180	358±31.3**	303±24.8**	266±39.1**	759±29.2

Примечание: * p < 0.01; ** p < 0.001.

ТАБЛИЦА 2 | Количество колоний *St. aureus*, выросших на твердых питательных средах после воздействия наночастиц железа

Время воздействия, мин	Опытные группы			
	1-я 0.1 мг/мл, n = 20 (M ± m)	2-я 1 мг/мл, n = 20 (M ± m)	3-я 10 мг/мл, n = 20 (M ± m)	Контроль n = 20 (M ± m)
30	1107.5±73.7**	1098.7±72.5**	1056.3±89.5**	1234.2±46.7
60	1186.8±44.7*	1159.2±60.1**	968.4±64.2**	1380.7±31.3
120	849.1±38.8**	629.6±58.5**	596.4±41.3**	1454.1±23.5
180	824.3±41.7**	728.6±48.1**	685.7±47.8**	1556.0±68.0

Примечание: * p < 0.01; ** p < 0.001.

Таким образом, наночастицы железа в концентрациях 0.1–10 мг/мл обладают антимикробным действием в отношении клинических штаммов золотистого стафилококка.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ МЫШЕЙ

Главный акцент в изучении активности нанопорошков железа ставится на разработке и тестировании пищевых добавок и биологически активных препаратов для решения проблем дефицита железа в организме. Для решения задач, связанных с введением порошков железа внутрь организма, необходимо, прежде всего, иметь четкое представление о биотрансформации порошка железа и его влиянии на организм в целом.

Проведенные исследования метаболизма у мышей при пероральном введении нанопорошков железа выявили значительные изменения показателей, характеризующих обмен углеводов, липидов, белков и активности ферментов (табл. 3–6).

Анализ биохимических показателей выявил, что введение животным нанопорошка железа приводит к достоверному повышению уровня глюкозы в сыворотке крови.

Глюкоза — основной показатель углеводного обмена; присутствует в большинстве органов и тканей. Концентрация глюкозы в крови является производной активности процессов гликогенолиза, глюконеогенеза и гликолиза. Поддержание постоянной концентрации глюкозы в крови — необходимое условие для нормальной жизнедеятельности организма, поскольку она является главным, а для некоторых тканей — единственным источником энергии в клетке.

При введении железных наночастиц наблюдалось достоверное (p < 0.001) увеличение содержания глюкозы в сыворотке крови по сравнению с контролем (7.41 ± 0.36 ммоль/л).

Увеличение концентрации глюкозы под влиянием наночастиц железа имеет линейный характер с выходом на насыщение: максимальные концентрации глюкозы отмечены в сыворотке крови при введении наночастиц в концентрации 1.25–12.5 мг/кг (увеличение концентрации в 1.5–1.6 раза) по сравнению с контролем.

Лактат (молочная кислота) — продукт анаэробного метаболизма глюкозы (гликолиза), образующийся из пировиноградной кислоты (ПВК) под действием ЛДГ. Основное количество молочной кислоты поступает в кровь из скелетных мышц, мозга и эритроцитов. Клиренс лактата связан, главным образом, с метаболизмом его в печени и почках.

Введение нанопорошков железа в выбранных концентрациях вызвало достоверное снижение (p < 0.001) содержания лактата в крови по сравнению с контролем (20.37 ± 1.54 ммоль/л). При этом самые низкие концентрации лактата наблюдаются в экспериментах с дозировками наночастиц 50 мкг/кг (уровень лактата снижен в 3.5 раза) и 100 мкг/кг (содержание лактата снижено в 2.5 раза).

Под влиянием наночастиц железа в сыворотке крови увеличивается содержание ПВК, при этом возрастание уровня ПВК носит дозозависимый характер. Для высоких концентраций наночастиц — 1.25–12.5 мг/кг отмечается десятикратное увеличение уровня ПВК в крови.

Суммируя полученные результаты по влиянию наночастиц железа в диапазоне концентраций 50 мкг/кг–12.5 мг/кг на основные показатели углеводного обмена, можно прийти к следующим выводам.

Возможной причиной увеличения уровня глюкозы в крови может являться снижение активности инсулина вследствие взаимодействия наночастиц металлов с сульфгидрильными группами в молекуле инсулина. Нарушение поступления

ТАБЛИЦА 3 | Изменение концентрации метаболитов сыворотки крови под влиянием наночастиц железа

Биохимический показатель	Контроль	Концентрация наночастиц железа		
		50 мкг/кг	100 мкг/кг	1 мг/кг
	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m
Глюкоза, ммоль/л	7.41±0.36	9.09±0.67**	9.27±0.37**	10.24±0.29**
Лактат, ммоль/л	20.37±1.54	6.20±0.63**	8.40±0.33**	12.3±0.31**
ПВК, ммоль/л	0.12±0.02	0.71±0.01**	0.76±0.11**	0.79±0.21**
Общий белок, г/л	121.44±11.00	143.80±0.66**	147.0±6.86**	150.50±9.31**
Альбумин, г/л	65.05±2.37	67.20±0.59	84.0±0.69**	115.00±5.45**
Мочевина, ммоль/л	3.73±0.16	9.14±0.14**	10.3±1.24**	8.7±0.72**
Креатинин, мкмоль/л	155.20±11.8	292.20±5.74**	305.20±11.7**	317.0±9.44**
Холестерин, ммоль/л	5.05±0.45	4.20±0.21*	4.10±0.31*	3.89±0.19**
Общий билирубин, мг/дл	1.4±0.12	3.93±0.06**	4.01±0.08**	4.40±0.09**
Прямой билирубин, мг/дл	1.13±0.06	1.85±0.01**	1.94±0.03**	1.73±0.05**
Непрямой билирубин, мг/дл	0.56±0.03	2.09±0.05**	2.17±0.06**	2.44±0.08**

Примечание: * p < 0.01; ** p < 0.001.

ТАБЛИЦА 4 | Изменение концентрации метаболитов сыворотки крови под влиянием наночастиц железа (продолжение)

Биохимический показатель	Контроль	Концентрация наночастиц железа			
		1.25 мг/кг	2.5 мг/кг	5 мг/кг	12.5 мг/кг
	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m	М ± m
Глюкоза, ммоль/л	7.41±0.36	11.74±0.69**	11.84±1.03**	11.34±0.18**	12.14±0.25**
Лактат, ммоль/л	20.37±1.54	15.20±0.29*	14.84±0.69*	13.73±0.29*	14.34±0.19*
ПВК, ммоль/л	0.12±0.02	0.84±0.01**	0.99±0.01**	1.39±0.08**	1.33±0.23**
Общий белок, г/л	121.44±11.00	153.80±8.11**	157.00±5.38**	167.00±7.38**	195.50±8.60**
Альбумин, г/л	65.05±2.37	144.00±2.65**	70.70±1.40*	74.70±1.50*	83.2±6.13*
Мочевина, ммоль/л	3.73±0.16	6.07±0.32**	5.81±0.29**	5.90±0.39**	7.01±0.16**
Креатинин, мкмоль/л	155.20±11.8	338.00±9.98**	274.50±10.66**	284.50±11.6**	240.60±8.78**
Холестерин, ммоль/л	5.05±0.45	3.34±0.09*	5.49±0.36	5.58±0.56	4.70±0.24
Общий билирубин, мг/дл	1.54±0.12	4.20±0.07**	3.94±0.07**	3.89±0.17**	4.09±0.13**
Прямой билирубин, мг/дл	1.13±0.06	1.66±0.01*	1.19±0.01*	1.59±0.08*	1.61±0.03*
Непрямой билирубин, мг/дл	0.56±0.03	2.54±0.06**	2.75±0.06**	2.65±0.09**	2.36±0.04**

Примечание: * p < 0.01; ** p < 0.001.

глюкозы в клетку и дальнейшее ее вовлечение в обменные процессы с целью получения энергии приводит к активации компенсаторных механизмов, в частности к активации процесса глюконеогенеза, в котором источником для синтеза глюкозы в клетке может служить лактат, при этом лактат под действием фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) превращается в ПВК – основной источник для синтеза глюкозы, содержание которого увеличивалось в крови экспериментальных животных.

Для выявления биологического действия наночастиц на белковый обмен было определено содержание общего белка, альбумина, мочевины и креатинина в сыворотке крови.

Белки плазмы крови выполняют множество функций в организме, и уровень белка является одним из важнейших лабораторных показателей. Функции белков плазмы крови заключаются в поддержании коллоидно-осмотического давления; свертывании крови; поддержании постоянства pH крови; транспорте различных веществ; участии в иммунных

ТАБЛИЦА 5 | Изменение активности ферментов сыворотки крови под влиянием наночастиц железа

Биохимический показатель	Контроль	Концентрация наночастиц железа		
		50 мкг/кг	100 мкг/кг	1 мг/кг
	M ± m	M ± m	M ± m	M ± m
АсАТ, МЕ	124.00±9.25	327.00±12.81**	330.00±11.8**	338.30±51.9**
АлАТ, МЕ	56.00±2.06	82.40±3.62*	73.30±5.52*	75.10±4.9*
ЛДГ, МЕ	2125.00±53.28	5312.50±72.88**	6700.60±82.8**	8900.00±286.00**
ГГТ, МЕ	112.22±16.66	115.70±2.95	121.80±5.95	127.60±6.5
КФК, МЕ	1390.00±60.88	4636.00±181.00**	4900.00±281.00**	3500.00±219.0**

Примечание: * p < 0.01; ** p < 0.001.

ТАБЛИЦА 6 | Изменение активности ферментов сыворотки крови под влиянием наночастиц железа (продолжение)

Биохимический показатель	Контроль	Концентрация наночастиц железа			
		1.25 мг/кг	2.5 мг/кг	5 мг/кг	12.5 мг/кг
	M ± m	M ± m	M ± m	M ± m	M ± m
АсАТ, МЕ	124.00±9.25	342.50±11.91**	372.50±15.33**	362.50±14.3**	620.60±16.3**
АлАТ, МЕ	56.00±2.06	68.20±3.39*	77.90±2.77*	79.90±3.7*	75.20±2.6*
ЛДГ, МЕ	2125.00±53.28	12887.5±280.10**	13786.5±303.6**	14786.50±312.6**	15100.0±152.8**
ГГТ, МЕ	112.22±16.6	131.40±2.99*	140.50±1.17*	150.50±11.7*	147.00±12.9*
КФК, МЕ	1390.00±60.8	2981.00±139.07**	3474.00±46.05**	3574.00±86.5**	3300.00±77.1**

Примечание: * p < 0.01; ** p < 0.001.

реакциях; создании «белкового резерва» (при голодании белки распадаются до аминокислот); поддержании уровня катионов в крови и в других метаболических процессах.

Концентрация общего белка в сыворотке крови зависит, главным образом, от синтеза и распада двух основных фракций – альбумина и глобулинов. Определение общего белка позволяет оценить тяжесть нарушения белкового обмена.

В ходе исследования было выявлено, что введение нанопорошка железа приводит к изменению содержания общего белка по сравнению с контролем (121.44 ± 11.00 г/л) в прямо пропорциональной зависимости и с увеличением воздействия прослеживается закономерность «доза–эффект».

При введении малых доз частиц наблюдается незначительное (p = 0.05) увеличение концентрации общего белка и его альбуминовой фракции.

Увеличение концентрации до 1.25 и 2.5 мг/кг приводит к дозозависимому увеличению концентрации общего белка на 30 % по сравнению с контролем. Введение больших концентраций (100 мкг/кг–12.5 мг/кг) способствует увеличению уровня белка в крови на 70 %.

Содержание альбумина при введении нанопорошка железа в диапазоне концентраций 12.5 мг/кг увеличилось в среднем на 30–35 %, при воздействии концентрации 100 мкг/кг–1.25 мг/кг достоверно изменилось в 2–2.4 раза.

Так как белки крови выполняют транспортную функцию, осуществляя перенос различных соединений, в том числе и металлов, полученные результаты могут быть свя-

заны с реакцией адаптации организма на введение избытка металла.

Основным продуктом распада белков является мочеви́на, биосинтез которой осуществляется в печени из аммиака (орнитиновый цикл). Мочевина как конечный продукт катаболизма белков фильтруется в клубочках и выводится с мочой, поэтому концентрация мочевины в крови отражает соотношение процессов ее образования и выведения, т.е. функционирование печени и почек.

Введение разных доз наночастиц железа вызвало повышение уровня мочевины в крови по сравнению с контролем (3.73 ± 0.16 ммоль/л).

При этом самые значительные изменения вызвало введение самой малой дозы частиц – 50–100 мкг/кг (увеличение концентрации мочевины в 2.5–3 раза), и самой большой дозы – 12.5 мг/кг (увеличение уровня мочевины в 2 раза). Дозировки наночастиц железа 1–2.5 мг/кг вызывают двукратное увеличение уровня мочевины.

Другим продуктом обмена белков является креатин, который, поступая из печени в мышечную ткань, превращается в креатинфосфат (источник энергии). В процессе катаболизма креатинфосфата освобождается энергия и образуется креатинин. Концентрация его в сыворотке крови относительно постоянна и зависит от равновесия процессов синтеза и выведения.

Исследования показали, что введение нанопорошка железа вызывает увеличение содержания креатинина в 1.5–2 раза,

что, вероятно, также связано с нарушением выделительной функции почек.

Увеличение концентрации в крови показателей белкового обмена может быть связано с повреждением мембран под воздействием нанопорошков металлов, которые способны адсорбироваться на мембранах клеток.

Для оценки состояния биологических мембран было определено содержание холестерина в сыворотке крови.

Исследования выявили, что достоверное уменьшение уровня холестерина под влиянием наночастиц железа отмечается при введении нанопорошка в концентрации 50 мкг/кг—1 мг/кг, остальные дозировки оказывают незначительные сдвиги в концентрации холестерина.

Апоптоз эритроцитов способствует высвобождению гемоглобина, который переносится в клетки ретикуло-эндотелиальной системы селезенки, где происходит образование биливердина. Биливердин ферментативным путем восстанавливается в билирубин — основной желчный пигмент красно-желтого цвета. При распаде гемоглобина первоначально образуется токсичный непрямой билирубин, который в комплексе с альбумином с током крови транспортируется в печень, где под влиянием глюкуронилтрансферазы связывается с глюкуроновой кислотой, образуя билирубинмоно- и билирубиндиглюкониды (прямой билирубин). При этом присущая билирубину токсичность в значительной мере теряется. Связанный билирубин активно против градиента концентрации экскретируется в желчные протоки, откуда в тонкую кишку.

Изучение пигментного обмена показало, что воздействие нанопорошком железа во всех исследуемых дозах вызывает повышение уровня общего билирубина в 2.5—3 раза по сравнению с контролем (1.4 ± 0.12 мг/дл), при этом увеличение уровня билирубина происходит преимущественно из-за увеличения фракции непрямого билирубина.

Концентрация прямого билирубина под влиянием наночастиц железа возрастала с введения малых концентраций частиц и сохранялась на устойчиво высоком уровне при введении больших доз частиц.

При введении наночастиц железа в дозировке 50 мкг/кг концентрация прямого билирубина увеличилась на 70 %, при введении нанопорошка в дозе 1.25 мг/кг — на 60 %, при введении наночастиц в дозе 12.5 мг/кг — на 55 %.

Под воздействием наночастиц железа происходит увеличение концентрации непрямого билирубина в 3—4.5 раза.

Совокупность показателей пигментного обмена указывает на негативное воздействие нанопорошков железа на устойчивость эритроцитов, вызывая гемолиз. Увеличение концентрации билирубина за счет фракции непрямого билирубина может свидетельствовать о нарушении функции печени — неспособности связывать токсичный билирубин с образованием билирубинглюконидов.

Такие изменения пигментного обмена схожи с проявлениями гемолитической желтухи. Увеличение прямого билирубина может свидетельствовать о понижении способности гепатоцитов к метаболизму и транспорту билирубина против градиента концентрации в желчь. Возможно, такое явление может быть связано с механическим затруднением желчевыделения из-за патологий желчевыводящих протоков, вследствие закупорки наночастицами.

В процессе работы была изучена активность ключевых индикаторных ферментов в сыворотке крови под влиянием нанопорошка железа в диапазоне концентраций 50 мкг/кг—12.5 мг/кг.

Активность трансаминаз: аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) широко используется

в биохимической практике как тест на изменение проницаемости мембран гепатоцитов и выраженность цитолитического синдрома, так как наибольшая удельная активность данных ферментов отмечена в печени и АсАТ — в сердечной мышце.

Активность АсАТ увеличивалась прямо пропорционально увеличению концентрации нанопорошка. В контрольной группе активность АсАТ составила 124.00 ± 9.25 МЕ. Введение частиц железа в концентрации 50 мкг/кг — активность АсАТ по отношению к контролю увеличилась в 2.7 раза, при введении 1, 1.25 и 2.5 мг/кг — в 3 раза, увеличение дозы до 5 мг/кг — в 4 раза.

В контрольной группе животных активность АлАТ составила 56.00 ± 2.06 МЕ. Все исследуемые концентрации нанопорошка железа вызывают увеличение активности данного фермента ($p < 0.05$), при этом ферментативная активность возрастает обратно пропорционально концентрации нанопорошка: на 13—15 % — при введении 12.5 мг/кг и 2.5 мг/кг нанопорошка соответственно, на 36 % — при введении 1.25 мг/кг и на 64 % — при введении 50 мкг/кг.

В процессе исследований было проанализировано действие нанопорошка железа на активность гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ), высокая активность которой наблюдается в тканях почек, печени и поджелудочной железы. ГГТ содержится, в основном, в мембране клеток, обладающих высокой секреторной и адсорбционной активностью: эпителиальные клетки, выстилающие желчные пути, печеночные канальцы, панкреатическая экзокринная ткань и выводные протоки.

В контрольной группе активность данного фермента составила 112.22 ± 16.66 МЕ. Под воздействием железных наночастиц наблюдается некоторое увеличение активности данного фермента, но достоверное увеличение активности данного фермента ($p < 0.05$) наблюдается под влиянием наночастиц, начиная с концентрации 2.5 мг/кг (увеличение активности фермента на 40 % по сравнению с контролем).

Необходимо отметить, что активность другого индикаторного печеночного фермента — ЛДГ — также значительно возрастает пропорционально с увеличением концентрации нанопорошка: в 2 раза при введении 50 мкг/кг нанопорошка и в 6—7 раз — при введении доз 2.5—12.5 мг/кг. Такое значимое увеличение активности фермента может быть связано с усилением процессов глюконеогенеза (ЛДГ катализирует превращение лактата в пируват) и следственно высоким лирилизмом фермента, а также может являться следствием развития деструктивных процессов в печени и клетках миокарда.

Креатинфосфокиназа (КФК) является ферментом, который функционирует в клетках многих тканей. Наибольшее содержание и активность КФК отмечаются в миокарде и скелетных мышцах, более низкая концентрация наблюдается в почках, легких и печени.

В контрольной группе активность КФК составила 1390.00 ± 60.88 МЕ. Все исследуемые концентрации наночастиц вызывают гиперферментемию КФК, при этом устойчивое увеличение активности данного фермента отмечается даже при введении низких концентраций частиц — 50 мкг/кг (увеличение активности фермента в 4.3 раза) — и сохраняется при введении частиц в больших дозировках: 1.25—12.5 мг/кг (увеличение активности фермента в 2.5—3 раза).

Проведенные исследования активности индикаторных ферментов сыворотки крови у мышей под влиянием наночастиц железа позволяют прийти к заключению, что данные частицы оказывают гепатотоксическое действие при пероральном способе введения, вследствие чего разрушаются мембраны клеток и ферменты поступают в кровяное русло, при этом максимальное повреждающее действие оказывают наночастицы в концентрациях 50 мкг/кг—1.25 мг/кг.

Общий анализ выявленных изменений биохимических показателей сыворотки крови под влиянием наночастиц, введенных *per os*, позволяет сформулировать вывод о биологическом действии наночастиц железа. Введение нанопорошков железа вызывает повышение уровня глюкозы, общего белка, мочевины, креатинина, общего и непрямого билирубина, способствует повышению активности в крови ряда индикаторных ферментов (АсАТ, АлАТ, ЛДГ, ГГТ, КФК), при этом выраженные изменения отмечаются при введении даже самых малых концентраций частиц – 50 мкг/кг и сохраняются при увеличении концентрации частиц.

Суммируя вышеизложенное, можно прийти к заключению о том, что сферические наночастицы железа, полученные

плазмохимическим методом, с диаметром частиц 20–40 нм обладают выраженным биологическим действием, которое проявляется в антибактериальном действии в отношении *P. aeruginosa* и *St. aureus*, а также проявляют токсическое действие на организм лабораторных животных. Выявлены дозозависимые эффекты воздействия наночастиц железа, которые дают возможность определять меры предосторожности при работе с данными частицами. Полученные данные представляют интерес для оценки развития возможных патологий при применении наночастиц металлов, в частности, железа в качестве пищевых добавок и лекарственных средств, а также позволят разработать методы профилактики при отравлении данными наночастицами. ■

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каплун А.П., Безруков Д.А., Родина А.В., Попенко В.И., Швеи В.И. Современная наномедицина // Нанотехника. 2007. № 2. С. 3–8.
2. Yu C.-H., Oduro W., Kin Tam, Edman S.C. Tsang Chapter 10 Some Applications of Nanoparticles // Handbook of Metal Physics. 2008. V. 5. P. 365–380.
3. Арсентьева И.П., Зотова Е.С., Фолманис Г.Э. и др. Аттестация наночастиц металлов, используемых в качестве биологически активных препаратов // Нанотехника. 2007. № 2. С. 72–77.
4. Baraton M.I. Synthesis, Functionalization, and Surface Treatment of Nanoparticles // Am. Sci. Los-Angeles. 2002. P. 234–236.
5. Robert A. Freitas Nanotechnology, Nanomedicine and Nanosurgery (Invited Editorial) // Intl. J. Surgery 2005. № 3. P. 1–4.
6. Robert A. Freitas Phamacytes: An Ideal Vehicle for Targeted Drug Delivery // J. Nanosci. Nanotechnol. 2006. № 6. P. 2769–2775.
7. Баранова Е.К., Ревина А.А., Войно Л.И., Горбатюк В.И. Сравнение действия ионов и наночастиц серебра на клетки дрожжей и кишечной палочки (*E. coli*) // Материалы 1-го Российского научно-методологического семинара «Наночастицы в природе. Нанотехнологии их создания в приложениях к биологическим системам». Москва, 2003. С. 53–60.
8. Блажитко Е.М. О целесообразности введения нанопрепаратов серебра как антибактериальных и противовирусных средств в медицинскую практику в Российской Федерации. Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. 2007. Новосибирск. Ч. 2. С. 36–39.
9. Ангельский А.А., Лаврикова Т.В., Родионов П.П., Одегова Г.В., Бурмистров В.А. Лечение больных с остеомиелитами и гнойными ранами с использованием микрохирургической техники и нанопрепаратов серебра. Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. 2007. Новосибирск. Ч. 2. С. 7–13.
10. Беспалов В.С., Вуличная Д.В. Наноструктурированные хитозановые гели васна/арговасна с серебром в процессе заживления ран и ожогов. Опыт применения. Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. 2007. Новосибирск. Ч. 2. С. 20–23.
11. Воронцова Н.А., Родионов П.П., Одегова Г.В., Бурмистров В.А., Симонова О.Г. Использование кластерного серебра в лечении лор-заболеваний у детей. Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. 2007. Новосибирск. Ч. 2. С. 70–76.
12. Глушенко Н.Н., Байтукалов Т.А., Богословская О.А., Ольховская И.П. Раноэжвивляющие свойства лекарственных средств на основе наночастиц металлов. Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. Новосибирск, 2007. Ч. 2. С. 76–80.
13. Колесниченко А.В., Тимофеев М.А., Протопопова М.В. Токсичность наноматериалов – 15 лет исследований // Российские нанотехнологии. 2008. Т. 3. № 3–4. С. 54–61.
14. Постановление Г.Г. Онищенко от 31.10.2007. № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» в соответствии с Федеральным законом от 30.03.1999 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (Собрание законодательства Российской Федерации, 1999, 14, ст. 1650; 2002, 1 (ч. 1), ст. 1; 2003, 2, ст. 167; 27 (ч. 1), ст. 2700; 2004, 35, ст. 3607; 2005, 19, ст. 1752; 2006, 1, ст. 10; 2006, 52 (ч. 1), ст. 5498; 2007, 1 (ч. 1), ст. 21; 2007, 1 (1 ч.), ст. 29; 2007, 27, ст. 3213, 2007, 46, ст. 554).
15. Kang H., Wang L., O'Donoghue M., Cao Y. C., Tan W. Nanoparticles for biosensors // Optical Biosensors. 2008. № 2. P. 583–621.
16. Long T.C., Tajuba J., Sama P., Saleh N., Swartz C., et al. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro // Environmental Health Perspectives. 2007. V. 115. № 11. P. 1631–1637.
17. Kaura I.P., Bhanarib R., Bhanarib S., Kakkara V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting // J. Controlled Release. 2008. V. 127. № 2. P. 97–109.
18. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. ВОЗ. Женева, 2007, (2004). 188 с.
19. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010. 358 с.
20. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник. СПб.: Интермедика, 1999. 656 с.

УДК 504.054; 615.9

Изучение влияния многослойных углеродных нанотрубок (12–14 нм) на основные тканевые мишени двустворчатого моллюска *Modiolus modiolus*

А.А. Анисимова¹, В.В. Чайка^{1,2}, В.Л. Кузнецов³, К.С. Голохваст¹

¹Дальневосточный федеральный университет, 690950, Владивосток, ул. Суханова, 8

²Морской государственный университет им. Адм. Г.И. Нефелеского, 690059, Владивосток, ул. Верхнепортовая, 50а

³Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 5

E-mail: droopy@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.06.2014

Принята в печать: 18.12.2014

Реакция двустворчатых моллюсков *Modiolus modiolus* на импульсную (24 и 48 ч) экспозицию с многослойными углеродными нанотрубками (МУНТ) (12–14 нм, концентрация МУНТ в морской воде 100 мг/л) проявилась в захвате формирующихся в морской воде агрегатов МУНТ, несмотря на их быстрое осаждение из толщи воды на дно аквариумов. Спустя 24 ч агрегаты МУНТ наблюдались в полости кишечника (размер агрегатов от 10 до 150 мкм) и в трубках пищеварительной железы (размер агрегатов от 10 до 50 мкм). Спустя 48 ч в просвете кишки обнаруживались только крупные агрегаты в контакте со слизью и фрагментами слущенного эпителия. Самые мелкие агрегаты, по-видимому, проникали внутрь эпителиоцитов. В кишечнике, пищеварительной железе и жабрах агрегаты МУНТ вызывали гистопатологические изменения в эпителиях (эрозии, некрозы, тенденцию к повышению уровня вакуолизации клеток) и отек соединительной ткани. В жаберном эпителии спустя 48 ч были отмечены картины, морфологически соответствующие апоптозу. Несмотря на значительные повреждения органов, никаких изменений в клеточном составе гемолимфы у животных, подвергшихся экспозиции с МУНТ, обнаружено не было.

STUDY OF THE INFLUENCE OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES (12–14 NM) ON THE MAIN TARGET TISSUES OF THE BIVALVE *MODIOLUS MODIOLUS*

The response of the bivalves *Modiolus modiolus* to pulse (for 24 and 48 h) exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) (12–14 nm, concentration of MWCNT in seawater of 100 mg/l) was manifested in ingestion of the MWCNT aggregates formed in seawater despite of their rapid sedimentation from the water column to the bottom. After 24 h the MWCNT aggregates were located in the intestinal cavity (size of 10–150 mkm) and in the tubes of the digestive gland (size of 10–50 mkm). After 48 h only the largest aggregates were detected in the intestinal cavity being in contact with mucus and epithelial fragments desquamated. The smallest ones seem to be inside of epithelial cells. In the intestines, digestive gland, and gills the histopathological changes caused by MWCNT aggregates were observed in epithelium (erosion, necrosis, a tendency to increasing of the cell vacuolation level) as well as a swelling of the connective tissue. After 48 h in the gill epithelium the patterns morphologically corresponding to apoptosis were detected. Despite of significant damage of the organs no changes in cell composition of hemolymph were found in mussels affected by the MWCNT exposure.

ВВЕДЕНИЕ

В результате нарастающего антропогенного влияния на прибрежные морские акватории в океаны и моря поступает огромное количество загрязняющих веществ, включая водонерастворимые ксенобиотики. Одним из новых и потенциально опасных видов загрязнений, попадающих в прибрежные воды с промышленными стоками, являются наноматериалы [1, 2], их накопление может представлять токсическую угрозу для морской биоты [3–6].

Оценка реальной токсичности наночастиц в отношении водных экосистем до сих пор неоднозначна, так как экотоксикологические свойства наноматериалов, их поведение в воде и биодоступность малоизучены [6, 7]. За последнее десятилетие появилось довольно много работ, подчеркивающих потенциальный риск воздействия наноматериалов на водные организмы [3, 4, 6, 8–19], однако результаты исследований *in vivo* зачастую весьма противоречивы [6], поэтому анализ биологических эффектов различных видов наночастиц с использованием модельных биоиндикаторов остается актуальной научно-практической задачей. При этом важно учитывать и максимально полно описывать физико-химические свойства тестируемых наноматериалов и поведение частиц в той среде, в которой осуществляется экспозиция [6, 20–22].

Удобным тест-объектом в водной нанотоксикологии выступают двустворчатые моллюски. Благодаря способу питания путем фильтрации взвешенных в морской воде частиц эти животные традиционно используются в биоиндикации

и экологическом мониторинге [3, 6, 23–26] и, в том числе, рассматриваются в качестве уникальной модели для изучения эффектов и механизмов действия наноматериалов [3, 6, 27]. Основными органами-мишенями моллюсков, непосредственно контактирующими с инородными веществами, являются жабры и органы пищеварительного тракта [6, 27, 28]: пищевые частицы захватываются жабрами и направляются к ротовым лопастям, далее через ротовое отверстие попадают в кишку и достигают пищеварительной железы, где захватываются пищеварительными клетками путем эндоцитоза и перевариваются с участием лизосомальной системы. Этот стандартный путь утилизации моллюски, по-видимому, используют и для наноматериалов [3, 10, 12]. Дальнейший путь наночастиц в организме моллюска, как полагают, связан с их переносом из пищеварительной системы в гемолимфу и в циркулирующие гемоциты [6, 9, 29], которые в норме участвуют в переносе и переваривании питательных веществ, а также обеспечивают клеточный иммунитет через фагоцитоз и цитотоксические реакции [30, 31]. Между прочим, поведение клеточной популяции гемоцитов *Bivalvia* отражает не только прямые (направленные на сами гемоциты), но и опосредованные (направленные на другие мишени) эффекты повреждающих факторов: при этом может наблюдаться изменение общего числа циркулирующих клеток, пропорции гемоцитов разных морфотипов и их функциональных свойств [26, 32]. Таким образом, реакция со стороны гемолимфы как системы, вовлеченной в развитие адаптаций и поддержание организменного гомеостаза, должна учиты-

ваться при оценке влияния наночастиц на физиологический статус исследуемых гидробионтов.

В настоящей работе произведено экспериментальное исследование влияния многослойных углеродных нанотрубок (МУНТ) на гистологическую структуру органов-мишеней (жабры и органы пищеварительного тракта) и состояние клеточной популяции гемоцитов двустворчатых моллюсков вида *Modiolus modiolus* (Bernard, 1983) в условиях кратковременной экспозиции *in vivo*. МУНТ активно используются в современной промышленности и могут попадать в окружающую среду в значительных количествах, представляя потенциальную угрозу, в том числе и для водных организмов. На акватории Японского моря *Modiolus modiolus* является массовым представителем макробентоса, важным экологическим звеном в составе прибрежных экосистем и удобным индикатором для проведения токсикологических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

• ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ И АНАЛИЗ ИХ ПОВЕДЕНИЯ В МОРСКОЙ ВОДЕ

Синтез МУНТ был выполнен методом химического осаждения из газовой фазы на поверхность катализатора (активный компонент Fe-Co сплав) в трубчатом реакторе при 680 °С в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН [33, 34]. Основные физико-химические характеристики полученных МУНТ: диаметр – 12–14 нм, удельная поверхность ($S_{БЭТ}$) – 300 м²/г, тип обработки – кипячение в концентрированной HCl в течение 8 ч, основные примеси (масс. % × 10²) – Fe (16), Co (7), Mg (5), Cl (1).

Для изучения динамики агрегации нанотрубок в морской воде проводили кинетические исследования методом спектрофотометрии с использованием двухканального спектрофотометра Shimadzu UV 2550. Суспензию МУНТ готовили в морской воде, взятой из района сбора моллюсков, с концентрацией 100 мг/л, после чего с помощью ультразвукового дезинтегратора Bandelin Sonopulse HD 3100 производили диспергирование суспензии в течение 3 мин (энергия 6384 ± 120 кДж). Затем суспензию переливали в кювету объемом 4 мл и помещали в спектрофотометре. Максимальное светопоглощение исследуемых образцов наблюдалось при длине волны 195 нм. Поглощение света регистрировалось в течение недели с минутным интервалом (всего 10080 измерений). Агрегаты нанотрубок фотографировали с использованием растрового электронного микроскопа Hitachi S-3400N.

• СБОР БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ИНКУБАЦИЯ С НАНОЧАСТИЦАМИ

Взрослые моллюски вида *Modiolus modiolus* (Bernard, 1983) (= *M. kurilensis*) были отобраны в июле (температура воды 20 °С) в чистом районе (б. Витязь, зал. Петра Великого, Японское море) и помещены в аэрируемые аквариумы объемом 50 л с морской водой из среды обитания. После 3-дневной акклиматизации моллюски были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой: две контрольные (1К и 2К) и две экспериментальные (1Э и 2Э). В аквариумы с экспериментальными животными были добавлены свежеприготовленные суспензии МУНТ из расчета 100 мг/л морской воды. В группе 1Э моллюски содержались в присутствии МУНТ в течение 24 ч, в группе 2Э – в течение 48 ч. Животные из контрольных групп (1К и 2К) с момента начала эксперимента содержались в обычных условиях в течение 24 и 48 ч соответственно. После окончания инкубации моллюски из контрольных и экспериментальных групп изымались из эксперимента в одно и то же время с интервалом 30 мин между особями внутри каждой группы.

• ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОРГАНОВ

Для гистологического исследования у моллюсков препарировали жабры, кишечник и пищеварительную железу. Органы фиксировали в 10 % растворе забуференного нейтрального формалина Histoline («Элемент», Россия), обезживали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заливали в парафин Histomix Extra («БиоВитрум», Россия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином и изучали под световым микроскопом AxioObserver A1 (Zeiss). Для фотосъемки использовали камеру AxioCam 3 (Zeiss), для обработки полученных изображений – программу компьютерной морфометрии AxioVision 4.2. Наличие гистопатологических изменений в органах регистрировали визуально, степень вакуолизации клеток в эпителиях выражали в виде процентной доли вакуолизованных эпителиоцитов в клеточной популяции. Морфометрический анализ включал измерение длины, ширины и площади клеток и их ядер. Статистический анализ данных включал определение средних значений исследуемых показателей, их стандартных ошибок и достоверности различий при уровне значимости $P < 0.05$ с использованием *t*-теста Стьюдента.

• ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ГЕМОЛИМФЫ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Для анализа методом проточной цитометрии образцы гемолимфы брали из заднего аддуктора в 0.3 М раствор натриевой соли ЭДТА для предотвращения агрегации гемоцитов и фиксировали в виде клеточной суспензии 4 % раствором параформальдегида в течение 1 ч. Клеточные суспензии отмывали от фиксатора с помощью фосфатно-буферной солевой среды (ФБС), помещали в 1 % раствор пермеабилзирующего агента Triton X-100 и окрашивали йодидом пропидия (50 мкг на 1 млн клеток) в присутствии рибонуклеазы А (100 мкг на 1 млн клеток) для количественного выявления ДНК в ядрах гемоцитов. Затем образцы анализировали с помощью проточного цитофлуориметра BD Accuri C6 в каналах FSC (переднее светорассеяние), SSC (боковое светорассеяние) и FL2 (флуоресценция йодида пропидия). Дифференциацию одиночных клеток от клеточных агрегатов и дегресса производили на двухпараметрических гистограммах распределения событий по FL2-A (площадь сигнала) и FL2-H (высота сигнала), идентификацию клеточных морфотипов – на двухпараметрических гистограммах распределения одиночных клеток по FSC и SSC. Определяли процентное соотношение клеток разных морфотипов и средние значения переднего и бокового светорассеяния для гранулоцитов в пределах каждой особи. Статистический анализ данных включал определение средних значений исследуемых показателей в пределах каждой группы, их стандартных ошибок и достоверности различий при уровне значимости $P < 0.05$ с использованием *t*-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

• АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ МУНТ В МОРСКОЙ ВОДЕ

Результаты спектрофотометрического анализа суспензии нанотрубок показали, что МУНТ, взвешенные в морской воде в концентрации 100 мг/л, начинают интенсивно оседать на дно уже в первые часы, а спустя 24 ч они практически полностью находятся на дне кюветы и отсутствуют во взвешенном состоянии (рис. 1).

Это связано с быстрой агрегацией наночастиц и формированием агломератов разного размера – от 10 до 200 мкм (рис. 2), которые оседают на дно под тяжестью собственного веса.

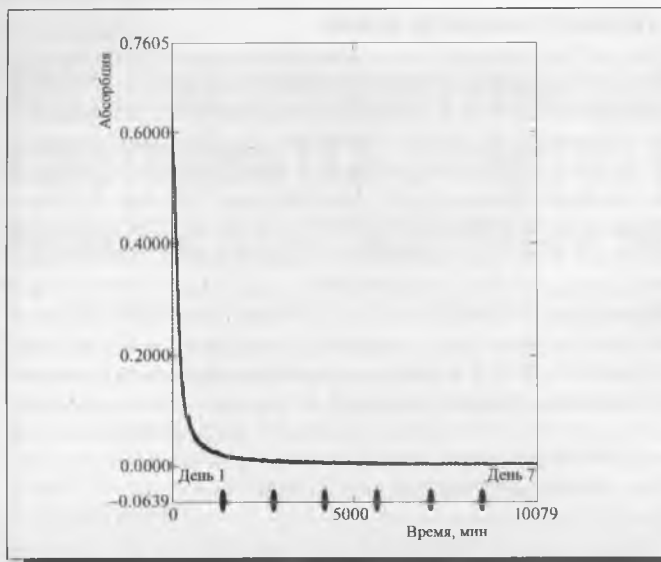


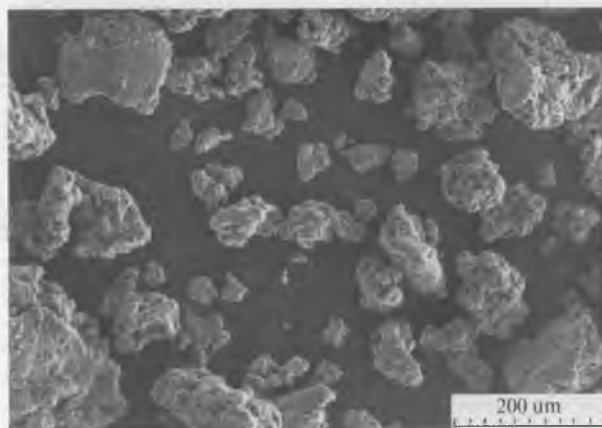
РИСУНОК 1 | Изменение светопоглощения суспензии МУНТ во времени, отражающее динамику агрегации наночастиц и осаждения агрегатов в морской воде (концентрация суспензии 100 мг/л). По оси ординат – коэффициент абсорбции, по оси абсцисс – время в днях

•ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

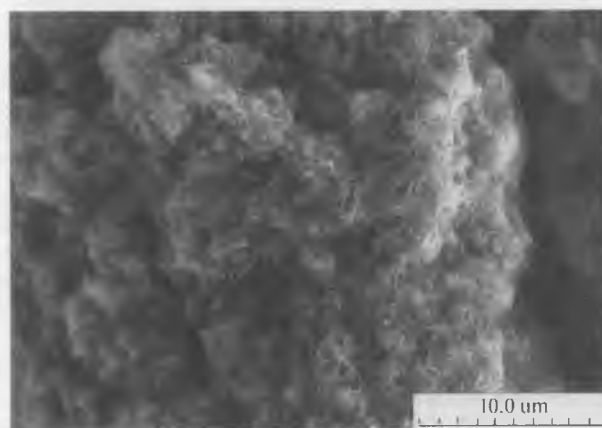
Гистологический анализ показал, что МУНТ проникают в органы пищеварительного тракта у моллюсков, подвергшихся экспозиции. В обеих экспериментальных группах (1Э и 2Э) у всех особей (N = 20) в просвете кишечника наблюдались свободно лежащие агрегаты диаметром от 10 до 150 мкм (рис. 3). Отсутствие этих структур у контрольных животных (рис. 3а и б) и их наличие у всех животных, получавших нанотрубки (рис. 3в–е), а также цвет, размер и консистенция агрегатов прямо свидетельствуют о том, что на гистологических препаратах идентифицируются МУНТ.

В группе 1Э агрегаты МУНТ не проникали сквозь эпителий, но вызывали в нем эрозивные процессы и отслоение базальной мембраны, а также отечность соединительной ткани (рис. 3в). Доля вакуолизированных эпителиоцитов составила $47.5 \pm 3.8 \%$, что статистически не отличается от контроля ($36.3 \pm 3.3 \%$) при заданном уровне значимости $P < 0.05$ (табл. 1).

В группе 2Э агрегаты МУНТ в просвете кишки находились в контакте со слизью и фрагментами слущенного эпителия (рис. 3г–е). В кишечном эпителии также были отмечены деструктивные процессы и некротические явления (рис. 3г), а доля вакуолизированных клеток достоверно возросла в 1.55



а



б

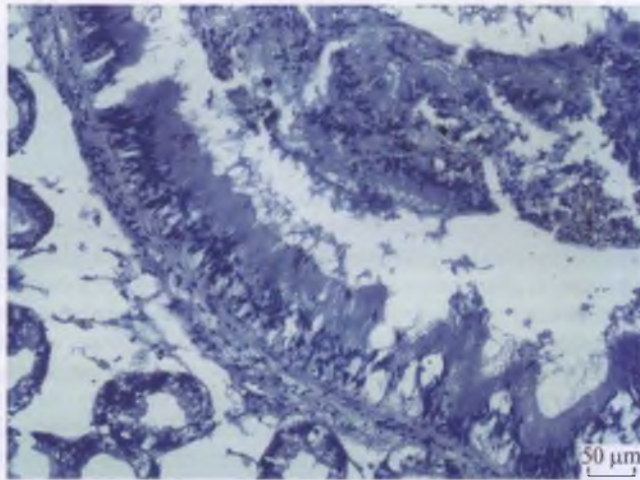
РИСУНОК 2 | Агрегаты МУНТ, формирующиеся в морской воде. Растровая электронная микроскопия во вторичных электронах; а – обзорный вид; б – поверхность одного из агрегатов. Увеличение: а – $\times 200$; б – $\times 5000$

раза по сравнению с контролем (табл. 1). Внутри эпителиальных клеток иногда наблюдались небольшие темные включения, предположительно соответствующие наиболее мелким агрегатам (рис. 3е).

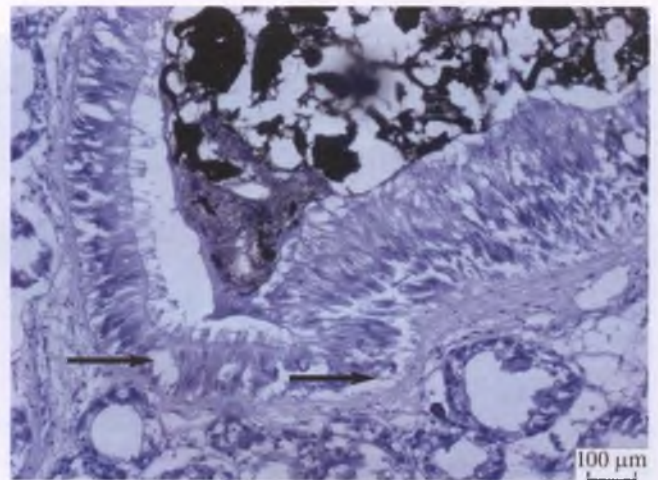
Следует отметить, что на вторые сутки (группа 2Э) в просвете кишки были видны только крупные агрегаты МУНТ (рис. 3г–е) и значительно меньше мелких агрегатов и свободной взвеси, которая сутками раньше (группа 1Э) визуализи-

ТАБЛИЦА 1 | Морфометрические параметры эпителиоцитов кишечника *Modiolus modiolus* в контрольных и экспериментальных группах

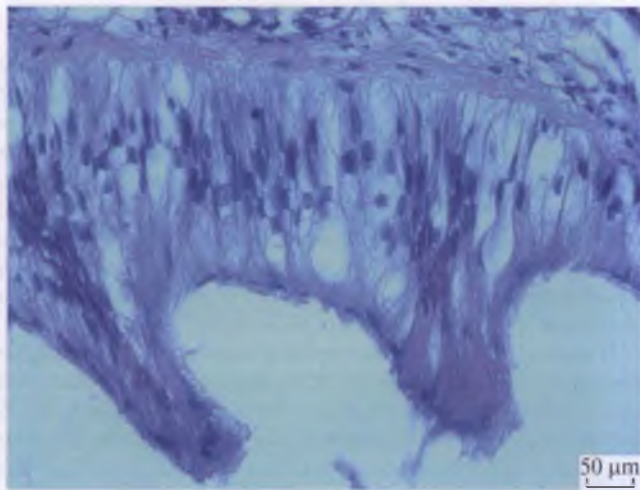
Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²	Доля вакуолизированных клеток, %
1К	5.72±0.90	4.7±0.81	19.75±6.27	12.69±2.09	10.46±1.88	84.23±22.29	36.3±3.3
1Э	8.3±2.23	5.21±0.72	30.96±7.13	21.91±6.51	9.85±2.53	131.23±41.2	47.5±3.8
2К	7.75±1.56	4.93±0.87	24.84±6.07	18.79±2.32	10.44±3.11	99.64±23.44	38.2±3.9
2Э	7.13±1.19	5.03±1.07	21.23±6.68	16.31±2.31	11.26±2.15	91.42±13.87	59.4±5.7



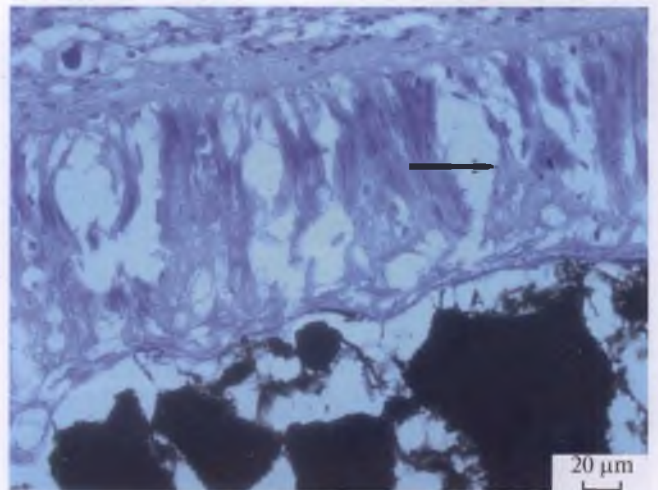
а



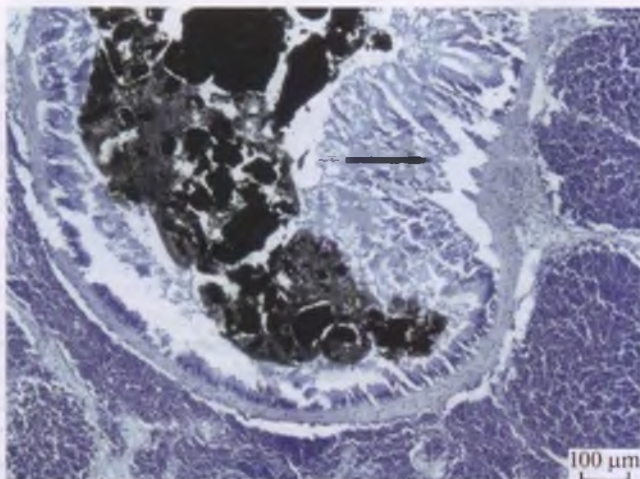
г



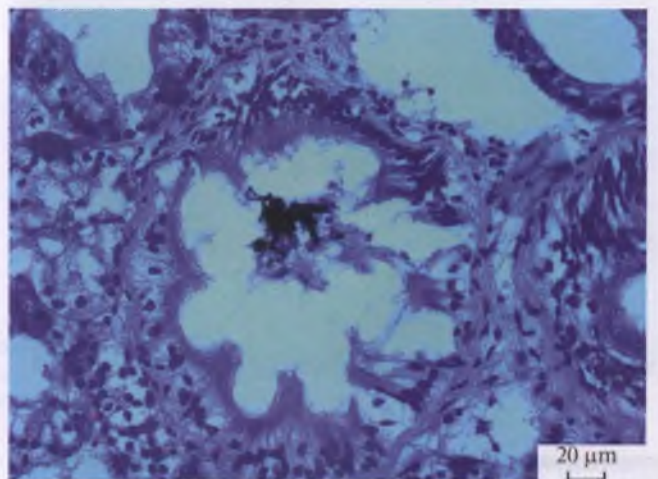
б



д

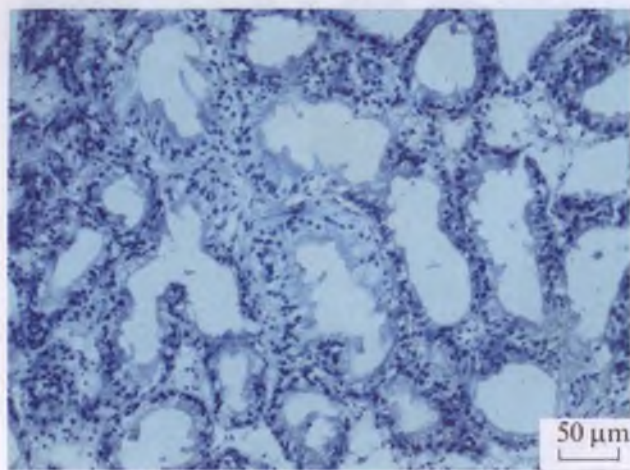


в

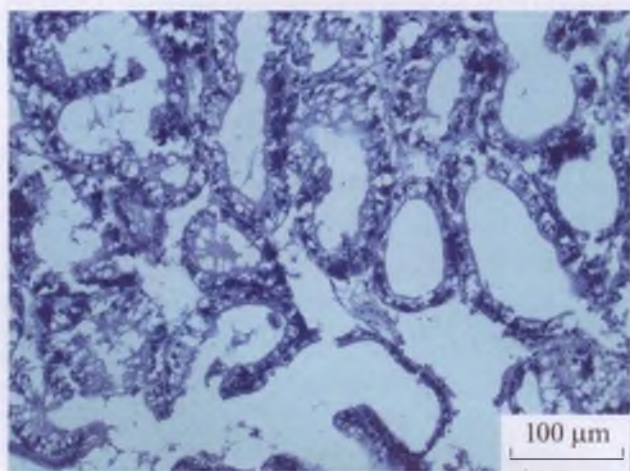


е

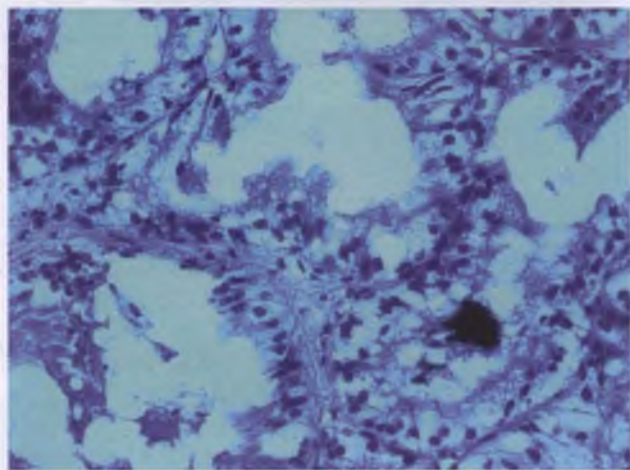
РИСУНОК 3 | Гистологическое строение кишечника и его содержимое (МУНТ) у моллюсков *Modiolus modiolus* в контрольных и экспериментальных группах; а и б – контрольные группы (1К и 2К); в – группа 1Э; г-е – группа 2Э. Стрелками указаны деструктивные изменения в тканях. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: а, в, г – $\times 200$; б, д, е – $\times 400$



а



б



в

РИСУНОК 4 | Гистологическое строение пищеварительной железы и содержимое пищеварительных трубочек у моллюсков *Modiolus modiolus* в контрольных и экспериментальных группах; а – общая морфология пищеварительной железы в контроле (группа 1К); б – гистопатологические изменения в пищеварительной железе у экспериментальных животных (группа 2Э); в – агрегат МУНТ в просвете пищеварительной трубочки (группа 1Э). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: а и б – $\times 100$, в – $\times 400$

ровалась в кишечнике как серая мелкодисперсная субстанция (рис. 3в). У животных из группы 2Э в просвете кишки наблюдалась картина, свидетельствующая об участии клеток кишечного эпителия в агрегации МУНТ (рис. 3д).

Средние значения всех морфометрических параметров эпителиоцитов кишечника у моллюсков из экспериментальных групп не отличались друг от друга и от контрольных значений (табл. 1).

Агрегаты МУНТ и связанные с ними гистопатологические изменения также наблюдались в трубочках пищеварительной железы моллюсков, подвергшихся экспозиции с нанотрубками (рис. 4). По сравнению с контролем (рис. 4а) у животных из обеих экспериментальных групп (1Э и 2Э) были отмечены повреждения в структуре пищеварительных трубочек, а также тенденция к возрастанию уровня вакуолизации пищеварительных клеток (рис. 4б), хотя эти различия не могут считаться достоверными при уровне значимости $P < 0.05$ (табл. 2). Средние значения морфометрических параметров клеток пищеварительной железы у моллюсков из всех исследованных групп достоверно не различались (табл. 2).

Следует отметить, что размеры агрегатов в пищеварительных трубочках были значительно меньше, чем в кишечнике – от 10 до 50 мкм (рис. 4в).

В жабрах моллюсков, инкубированных с нанотрубками в течение 24 и 48 ч, агрегаты МУНТ не обнаруживались (рис. 5), тем не менее, в жаберном эпителии у животных из обеих экспериментальных групп (1Э и 2Э) были выявлены эрозии и некрозы (рис. 5б и в). Кроме того, в группе 2Э были отмечены картины, морфологически соответствующие апоптозу (рис. 5в и г, указано стрелками). Выраженной вакуолизации клеток в жаберном эпителии не наблюдалось, средние значения морфометрических параметров клеток у моллюсков из всех исследованных групп достоверно не различались (табл. 3).

В целом, исследованные органы-мишени (жабры, кишечник и пищеварительная железа) у всех животных, взятых в эксперимент, отреагировали на экспозицию с МУНТ типичными гистопатологическими процессами – эрозиями и некрозами, носившими локальный характер, а также тенденцией к возрастанию степени вакуолизации клеток в эпителиях. Особенных индивидуальных откликов у моллюсков в пределах каждой группы нами отмечено не было.

•АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ГЕМОЛИМФЫ

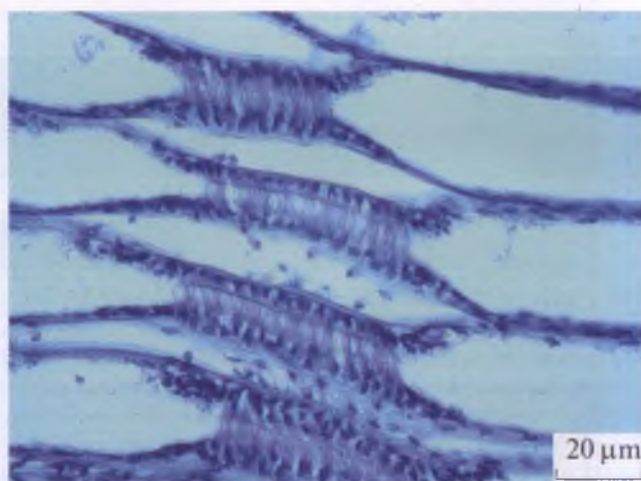
Как было показано нами ранее (Anisimova, 2012), в гемолимфе моллюска *Modiolus modiolus* присутствуют три морфотипа клеток – гиалиноциты, полугранулоциты и гранулоциты. Эти клетки достаточно четко идентифицируются методом проточной цитометрии (по переднему и боковому светорассеянию) после предварительного отделения популяции гемоцитов от дебриса и клеточных агрегатов, присутствующих в образцах (по одинаковому соотношению высоты и площади сигнала йодида пропидия у одиночных клеток с разным содержанием ДНК) (рис. 6). Пропорции клеток разных морфотипов внутри каждой группы (1К, 1Э, 2К и 2Э) варьировали в одном и том же диапазоне, сравнение средних значений относительного числа гиалиноцитов, полугранулоцитов и гранулоцитов у животных из разных групп не показало достоверных различий (табл. 4). Также не было обнаружено различий в размерах (переднее светорассеяние, FSC) и степени зернистости (боковое светорассеяние, SSC) гранулоцитов (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

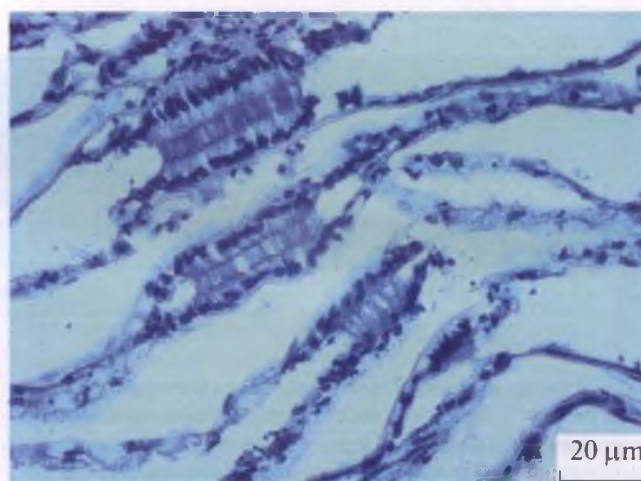
В настоящей работе мы попытались выявить эффекты кратковременного (24 и 48 ч) воздействия многослойных карбоновых нанотрубок (МУНТ) на состояние ключевых систем,

ТАБЛИЦА 2 | Морфометрические параметры клеток пищеварительной железы *Modiolus modiolus* в контрольных и экспериментальных группах

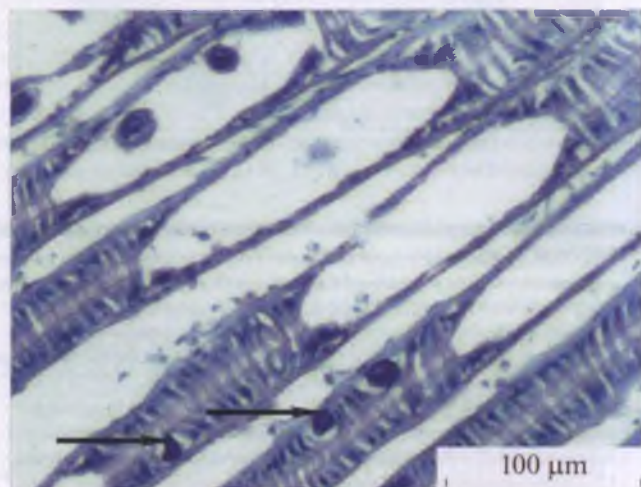
Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²	Доля вакуолизованных клеток, %
1К	8.76±2.15	5.01±1.21	23.98±6.91	15.68±3.14	9.24±2	78.36±21.69	54.1±4.7
1Э	5.84±0.76	4.98±0.7	21.16±4.63	13.88±2.34	10.57±1.9	88.53±16.07	71.3±7.2
2К	4.97±0.6	4.20±0.58	15.17±3.35	12.88±2.78	9.40±1.61	73.97±19.97	56.7±4.2
2Э	5.30±0.66	4.27±0.56	15.77±3.05	12.23±1.62	9.57±1.19	76.23±14.02	78.2±7.3



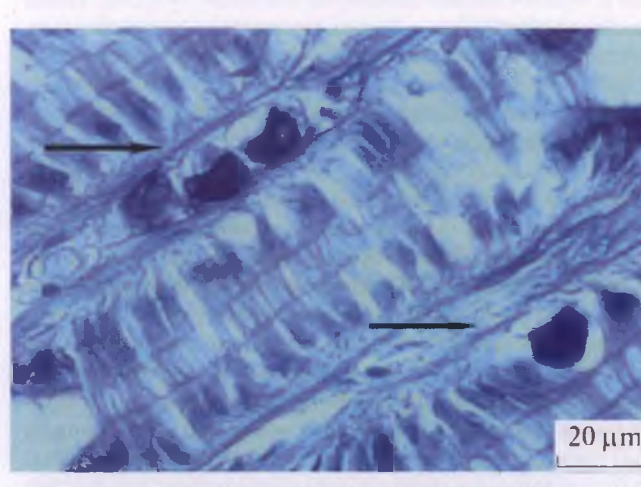
а



б



в



г

РИСУНОК 5 | Гистологическое строение жабр у моллюсков *Modiolus modiolus* в контрольных и экспериментальных группах; а – контроль (группа 1К); б – группа 1Э; в и г – группа 2Э. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: а, б и в – ×400; г – ×630

взаимодействующих с инородными частицами, у двусторчатого моллюска *Modiolus modiolus*. Для оценки влияния МУНТ на организм *Modiolus modiolus* была исследована гистологическая картина жабр, кишечника, пищеварительной железы и гемолимфы как основных тканевых мишеней двусторчатых моллюсков при повышенной нагрузке на среду обитания, включая нерастворимые ксенобиотики, к числу которых относятся наночастицы.

Известно, что наночастицы, попадая в воду, формируют более или менее крупные агрегаты, что облегчает их захват жабрами моллюсков по сравнению со свободно суспензированными частицами [7]. Результаты кинетических исследований, проведенных нами, показали, что МУНТ, взвешенные в морской воде в концентрации 100 мг/л, интенсивно агрегируют и оседают на дно уже в первые часы, а после 24 ч они практически полностью отсутствуют во взвешенном состо-

ТАБЛИЦА 3 | Морфометрические параметры клеток жаберного эпителия *Modiolus modiolus* в контрольных и экспериментальных группах

Группа	Длина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Площадь ядра, мкм ²	Длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм	Площадь клетки, мкм ²
1К	7.07±1.13	5.47±0.96	25.03±6.46	12.44±1.69	10.8±1.26	86.7±16.61
1Э	5.90±0.85	4.41±0.69	18.22±3.67	10.26±0.9	8.08±0.95	57.61±8.95
2К	5.49±0.94	4.16±0.64	15.03±2.88	12.86±1.63	8.82±1.58	74.85±16.09
2Э	5.28±0.79	3.74±0.74	13.39±3.55	13.37±1.36	8.02±1.96	63.94±9.33

ТАБЛИЦА 4 | Пропорция клеточных морфотипов и морфологические параметры гранулоцитов в гемолимфе *Modiolus modiolus* в контрольных и экспериментальных группах

Группа	Доля гиалиноцитов, %	Доля полугранулоцитов, %	Доля гранулоцитов, %	Размер гранулоцитов (FSC, усл. ед.)	Зернистость гранулоцитов (SSC, усл. ед.)
1К	8.6 ± 1.6	52.4 ± 2.5	37.2 ± 2.5	4322.4 ± 70.6	2455.7 ± 78.4
1Э	7.0 ± 0.8	49.2 ± 1.7	43.8 ± 2.1	4329.5 ± 64.9	2408.1 ± 71.8
2К	11.7 ± 3.1	45.6 ± 2.1	42.4 ± 2.0	4635.8 ± 91.8	2618.7 ± 112.1
2Э	6.8 ± 0.5	46.2 ± 1.6	45.8 ± 1.6	4402.5 ± 116.4	2513.5 ± 119.4

янии. Согласно литературным данным, различные наночастицы (NCB, C₆₀ fullerene, TiO₂ и SiO₂), суспензированные в искусственной морской воде, образуют агрегаты нано- и микро размеров [35, 36], а в присутствии моллюсков агрегаты ассоциируют со слизью, откладываются вдоль биоссузных нитей и оседают на дно аквариума в течение 24 ч [36]. Таким образом, количество наночастиц, поглощаемых моллюсками, существенно меньше, чем предполагается исходя из начальной концентрации суспензии, и оценка реальной внутренней концентрации наночастиц в исследованиях *in vivo* крайне затруднительна [6, 7].

Активный захват агрегатов наночастиц иллюстрируется результатами гистологического анализа: спустя 24 ч инкубации, свободно лежащие агрегаты размером до 150 мкм в изоляции наблюдались в просвете кишечника модиолуса. Через двое суток агрегаты МУНТ в кишечнике были окружены слизью и фрагментами слущенного эпителия, что, по-видимому, является защитным механизмом, позволяющим быстро эвакуировать агрегаты из организма. Для ряда других морских беспозвоночных (пресноводного рачка *Daphnia magna*, морской полихеты *Arenicola marina*, морского ежа *Paracentrotus lividus*) также было показано поступление различных наночастиц (однослойных и многослойных нанотрубок, наночастиц C₆₀, TiO₂, SnO₂, CeO₂ и Fe₃O₄) из водной суспензии в пищеварительный тракт с последующей элиминацией их агрегатов [4, 13–15, 37].

В результате взаимодействия агрегатов МУНТ с поверхностью кишки уже спустя сутки в кишечном эпителии модиолуса были отмечены эрозивные процессы, сопровождавшиеся отечностью соединительной ткани, и тенденция к повышению уровня вакуолизации клеток, что, скорее всего, обусловлено развитием травмы вследствие физико-химического раздражения и механического повреждения стенки кишечника. Небольшие агрегаты, по-видимому, способны проникать внутрь эпителиальных клеток — на вторые сутки эксперимента в эпителиоцитах кишечника наблюдались плотные включения, однако однозначно утверждать, что это действительно

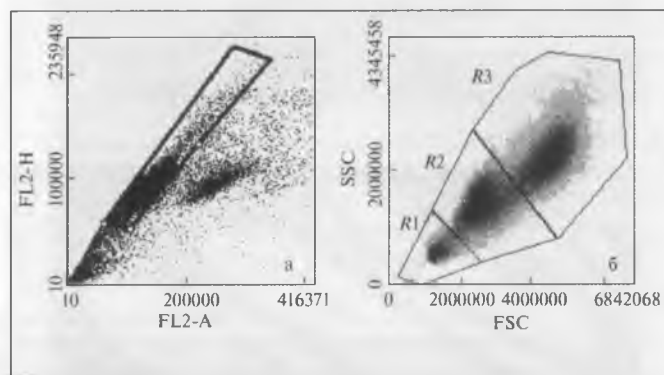


РИСУНОК 6 | Идентификация клеточной популяции гемоцитов и разных морфотипов клеток в гемолимфе моллюска *Modiolus modiolus* методом проточной цитометрии; а – дифференциация одиночных клеток, дебриса и клеточных агрегатов на гистограмме распределения всех событий по площади (FL2-A) и высоте (FL2-H) флуоресцентного сигнала йодиды пропидия; одиночные гемоциты с содержанием ДНК 2с и 4с выделены рамкой; б – идентификация трех морфотипов гемоцитов на гистограмме распределения одиночных клеток по параметрам переднего (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния: R1 – гиалиноциты, R2 – полугранулоциты, R3 – гранулоциты

наночастицы, мы не беремся. Заметим, что у *Arenicola marina* не было обнаружено проникновения наночастиц из просвета кишки внутрь эпителиальных клеток [13].

Через 24 ч инкубации небольшие (до 50 мкм) агрегаты МУНТ наблюдались в просветах трубочек пищеварительной железы, а в гистологической структуре пищеварительного эпителия были отмечены патологические изменения, сходные с повреждениями, наблюдаемыми в эпителии кишечника. Показано, что в трубочки пищеварительной железы действительно проникают только самые мелкие агрегаты [7, 10]. Мы не наблюдали агрегатов наночастиц внутри пищеварительных клеток, хотя существует множество свидетельств их проникновения в эндосомальный и лизосомальный ком-

партмент [10, 12]. Известно, что контакт наночастиц с пищеварительными клетками провоцирует перекисное окисление липидов [9–11] и снижение стабильности лизосомальных мембран [10, 12].

Захват агрегатов наночастиц, сопровождающийся окислительным стрессом, описывается некоторыми авторами и для клеток жаберного эпителия [9–11]. Проведенное нами исследование демонстрирует наличие гистопатологических изменений в жабрах у модиолусов, подвергшихся экспозиции с МУНТ. Кроме того, в жаберном эпителии были отмечены явления, морфологически соответствующие апоптозу. Следует заметить, что у двустворчатого моллюска *Elliptio complanata* эффект наночастиц проявлялся, в том числе в повреждении молекул ДНК в клетках жабр и пищеварительной железы [9]. Наличие генотоксического эффекта, таким образом, подразумевает стимуляцию апоптоза в качестве защитного механизма, предохраняющего ткани от негативного воздействия наночастиц.

Что касается реакции со стороны гемолимфы у животных, подвергшихся экспериментальной экспозиции с МУНТ, мы не отметили каких-либо сдвигов в общем морфологическом паттерне этой ткани. Как известно, гемоциты двустворчатых моллюсков представляют гетерогенную клеточную популяцию, включающую две основные клеточные формы – агранулоциты (гиалиноциты) и гранулоциты [26, 30–32], между которыми у некоторых видов выделяют клетки с промежуточными морфологическими характеристиками [38–41]. У *Modiolus modiolus* (= *M. kurilensis*) методом проточной цитометрии в гемолимфе достаточно четко дифференцируются три «субпопуляции» гемоцитов – гиалиноциты (агранулоциты), полугранулоциты и гранулоциты [41], что позволяет рассматривать все три морфотипа как последовательные стадии созревания в пределах одной клеточной линии, где гранулоциты представляют стадию терминальной дифференцировки. В отличие от агранулоцитов, гранулярные гемоциты двустворчатых моллюсков характеризуются низкими ядерно-цитоплазматическими отношениями, содержат большое количество лизосом и секреторных гранул, обладают высоким уровнем фагоцитарной активности и продукции свободных радикалов [30, 32, 40]. При оценке стрессовых воздей-

ствий, в том числе токсикологического характера, как правило, отмечается изменение пропорции клеток разных морфотипов. В частности, содержание двустворчатых моллюсков в присутствии токсичных микроводорослей сопровождалось появлением в гемолимфе большого количества молодых клеток и соответственно снижением доли высокодифференцированных крупных гранулоцитов [42–44]. Авторы связывают эти эффекты либо с активацией пролиферативных процессов в ответ на токсическое воздействие [42, 43], либо с миграцией гранулоцитов из циркуляторного русла во внутренние органы для вовлечения в процесс фагоцитоза поврежденных клеток [44]. Мы ожидали, что влияние наночастиц на гемолимфу *Modiolus modiolus* будет проявляться сходными эффектами, поскольку, как и в случае с токсинами микроводорослей, прямой мишенью для токсического действия наночастиц являются жабры и пищеварительный тракт. Однако ни пропорции клеток разных морфотипов, ни размеры и степень зернистости гранулоцитов у контрольных и экспериментальных животных не отличались, несмотря на очевидные повреждения в структуре внутренних органов. В работе Galimany et al. (2008) указывается, что очаги инфильтрации гемоцитов в соединительной ткани, окружающей трубочки пищеварительной железы, наблюдались на 3-й и 6-й дни эксперимента [44]. Таким образом, отсутствие эффекта в нашем случае, возможно, связано с недостаточным длительным временем экспозиции (менее 3 сут) либо с высокой индивидуальной вариабельностью исследованных показателей внутри популяции модиолусов. ■

Авторы выражают признательность Д.А. Анисимову за предоставление лабораторного помещения для проведения исследований в районе взятия биологического материала (б. Витязь) и В.Б. Даркину за проведение водолазных работ.

Работа выполнена при поддержке Научного фонда ДВФУ (проекты № 13-06-0318-м а, 14-08-01-4_у) в части проведения исследований свойств наночастиц и гистологического анализа, а также Российского научного фонда (проект № 14-50-00034) в части выполнения работ по изучению гемолимфы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vianello A., Boldrin A., Guerriero P., et al. Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2013. V. 130. P. 54–61.
- Ivar Do Sul J.A., Costa M.F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment (Review) // *Environmental Pollution*. 2014. V. 185. P. 352–364.
- Moore M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? // *Environment International*. 2006. V. 32. P. 967–976.
- Baun A., Hartmann N.B., Grieger K., Kusk K.O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: A brief review and recommendations for future toxicity testing // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. Issue 5. P. 387–395.
- Tiede K., Hasselov M., Breitbarth E., et al. Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessment for engineered nanoparticles // *J. Chromatography*. 2009. V. 1216(3). P. 503–509.
- Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., et al. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity // *Marine Environmental Research*. 2012. V. 76. P. 16–21.
- Ward J.E., Kach D.J. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension feeding bivalves // *Marine Environmental Research*. 2009. V. 68. P. 137–142.
- Oberdorster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass // *Environmental Health Perspectives*. 2004. V. 112. P. 1058–1062.
- Gagné F., Auclair J., Turcotte P., et al. Ecotoxicity of Cd-Te quantum dots to freshwater mussel: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity // *Aquatic Toxicology*. 2008. V. 86. P. 333–340.
- Koehler A., Marx U., Broeg K., et al. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas – A new threat to marine life? // *Marine Environmental Research*. 2008. V. 66. P. 12–14.

- Tedesco S., Doyle H., Redmond G., Sheehan D. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis* // *Marine Environmental Research*. 2008. V. 66. P. 131–133.
- Ringwood A.H., Levi Polyachenko N., Carroll D.L. Fullerene exposures with oysters: embryonic, adult, and cellular responses // *Environmental Science and Technology*. 2009. V. 43. P. 7136–7141.
- Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., et al. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete // *Environmental Pollution*. 2010. V. 158. P. 1748–1755.
- Petersen E.J., Pinto R.A., Mai D.J., et al. Influence of polyethyleneimine graftings of multi-walled carbon nanotubes on their accumulation and elimination by and toxicity to *Daphnia magna* // *Environmental Science and Technology*. 2011. V. 45. P. 1133–1138.
- Falugi C., Aluigi M.G., Chiantore M.C., et al. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin // *Marine Environmental Research*. 2012. V. 76. P. 114–121.
- Buffet P.-E., Richard M., Caupos F., et al. A mesocosm study of fate and effects of CuO nanoparticles on endobenthic species (*Scrobicularia plana*, *Hediste diversicolor*) // *Environmental Science and Technology*. 2013. V. 47. Issue 3. P. 1620–1628.
- Buffet P.-E., Zalouk-Vergnoux A., Châtel A., et al. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* // *Science of the Total Environment*. 2014. V. 470–471. P. 1151–1159.
- Jacobasch C., Völker C., Giebner S., et al. Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations // *Environmental Pollution*. 2014. V. 186. P. 180–186.

19. Moschino V., Nesto N., Barison S., et al. A preliminary investigation on nanohorn toxicity in marine mussels and polychaetes // *Science of the Total Environment*. 2014. V. 468–469. P. 111–119.
20. Murdock R.C., Braydich-Stolle L., Schrand A.M., et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique // *Toxicological Sciences*. 2008. V. 101. Issue 2. P. 239–253.
21. Warheit D.B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? // *Toxicological Sciences*. 2008. V. 101. Issue 2. P. 183–185.
22. Matraga V., Corsi I. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches // *Marine Environmental Research*. 2012. V. 76. P. 32–40.
23. Oliver L.M., Fisher W.S. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers // *Biomarkers*. 1999. V. 4. Issue 6. P. 510–530.
24. Auffret M. // Bivalves as models for marine immunotoxicology. In: *Investigative Immunotoxicology* / Ed. H. Tryphonas, M. Fournier, B.R. Blakley, J.E.G. Smits and P. Brousseau. 2005. P. 29–48.
25. Dagnino A., Allen J.L., Moore M.N., et al. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index // *Biomarkers*. 2007. V. 12. P. 155–172.
26. Anisimova A.A. Morphofunctional parameters of hemocytes in assessment of the physiological status of bivalves // *Rus. J. Marine Biology*. 2013. V. 39. Issue 6. P. 381–391.
27. Barmo C., Ciacci C., Canonico B., et al. In vivo effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* // *Aquatic Toxicology*. 2013. V. 132–133. P. 9–18.
28. D'Agata A., Fasulo S., Dallas L.J., et al. Enhanced toxicity of 'bulk' titanium dioxide compared to 'fresh' and 'aged' nano-TiO₂ in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) // *Nanotoxicology*. 2014. V. 8. Issue 5. P. 549–558.
29. Browne M.A., Dissanayake A., Galloway T.S., et al. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L) // *Environmental Science and Technology*. 2008. V. 42. P. 5026–5031.
30. Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves // *Microscopy Research and Technique*. 2002. V. 57. P. 469–476.
31. Tiscar P.G., Mosca F. Defense mechanisms in farmed marine mollusks // *Veterinary Research Communications*. 2004. V. 28. P. 57–62.
32. Donaghy L., Lambert C., Choi K.-S., Soudant P. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects // *Aquaculture*. 2009. V. 297. P. 10–24.
33. Kuznetsov V.L., Elumeeva K.V., Ishchenko A.V., et al. Multi-walled carbon nanotubes with ppm level of impurities // *Physica Status Solidi (b)*. 2010. V. 247. Issue 11–12. P. 2695–2699.
34. Kuznetsov V.L., Krasnikov D.V., Schmakov A.N., Elumeeva K.V. In situ and ex situ time resolved study of multi-component Fe-Co oxide catalyst activation during MWNT synthesis // *Physica Status Solidi (b)*. 2012. V. 249. P. 2390–2394.
35. Canesi L., Ciacci C., Vallotto D., et al. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes // *Aquatic Toxicology*. 2010. V. 96. P. 151–158.
36. Canesi L., Fabbri R., Gallo G., et al. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂) // *Aquatic Toxicology*. 2010. V. 100. P. 168–177.
37. Roberts A.P., Mount A.S., Seda B., et al. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna* // *Environmental Science and Technology*. 2007. V. 41. P. 3025–3029.
38. Mix M.C. A general model for leukocytes cell renewal in bivalve mollusks // *Marine Fisheries Review*. 1976. V. 38. Issue 10. P. 37–41.
39. Ottaviani E., Franchini A., Barbieri D., Kletsas D. Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Presence of two aging-related hemocyte stages // *Italian J. Zoology*. 1998. V. 65. Issue 4. P. 349–354.
40. Garcia-Garcia E., Prado-Alvarez M., Novoa B., et al. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families // *Developmental and Comparative Immunology*. 2008. V. 32. P. 637–653.
41. Anisimova A.A. Flow cytometric and light microscopic identification of hemocyte subpopulations in *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) (Bivalvia: Mytilidae) // *Rus. J. Marine Biology*. 2012. V. 38. Issue 5. P. 406–415.
42. Hégaret H., da Silva P.M., Wikfors G.H., et al. Hemocyte responses of manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures // *Aquatic Toxicology*. 2007. V. 84. P. 469–479.
43. Da Silva P.M., Hégaret H., Lambert C., et al. Immunological responses of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions // *Toxicon*. 2008. V. 51. P. 563–573.
44. Galimany E., Place A. R., Ramón M., et al. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis* // *Harmful Algae*. 2008. V. 7. Issue 1. P. 91–98.

УДК 544.773.422:546.57:7.[037+038]:577.31:612.386

Моделирование межорганного распределения и бионакопления искусственных наночастиц (на примере наночастиц серебра)

В.А. Демин¹, И.В. Гмошинский², В.Ф. Демин¹, А.А. Анциферова¹,
Ю.П. Бузулуков¹, С.А. Хотимченко², В.А. Тутельян²

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

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт питания», 109240, Москва, Устьинский пр., 2/14

E-mail: gmosh@ion.ru

Поступила в редакцию: 27.06.2014

Принята в печать: 18.12.2014

В работе продемонстрированы возможности математической «камерной» модели абсорбции, распределения и бионакопления неметаболизированных наночастиц (НЧ) на примере НЧ серебра в организме лабораторной крысы. При построении модели использованы данные эксперимента, в котором изучали бионакопление и биораспределение НЧ серебра средним диаметром 35 ± 15 нм ($M \pm s.d.$), меченных радиоактивным изотопом ^{110m}Ag . В минимально приемлемом виде модель включала все «камеры», в которых содержание НЧ на протяжении всего времени эксперимента составляло не ниже 20–25 % от содержания в крови, а именно желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), собственно кровь, костно-мышечный каркас, печень и селезенку. Биораспределение и бионакопление НЧ в пределах перечисленных «камер» описывается системой 5 независимых линейных дифференциальных уравнений 1-го порядка. Решение данной системы в численном виде с учетом данных о тайминге экскреции НЧ из ЖКТ с калом позволило определить биокинетические константы скоростей межорганного переноса НЧ. С их использованием осуществлен расчет пикового (максимального) и квазистационарного содержания НЧ в критических органах-мишенях соответственно для случая острого (однократного) и подострого (многократного) введения НЧ в ЖКТ в зависимости от их дозы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности метода математического моделирования межканального транспорта и распределения НЧ для оценки их возможного токсического действия на системном уровне с использованием ранее полученных данных *in vitro* и результатов биокинетических исследований.

MODELING OF INTER-ORGAN DISTRIBUTION AND BIOACCUMULATION OF ENGINEERED NANOPARTICLES (ON AN EXAMPLE OF SILVER NANOPARTICLES)

In this paper we demonstrate the possibility of mathematical «chamber» model of absorption, distribution and bioaccumulation of non-metabolizable nanoparticles (NPs) on an example of silver NPs in laboratory rats. When constructing a model data of experimental work was used, which studied the bioaccumulation and biodistribution of silver NP with average diameter of 35 ± 15 nm ($M \pm s.d.$), radiolabeled by ^{110m}Ag . In a minimally acceptable form model included all «chambers» in which the content of the NPs throughout the duration of the experiment was not lower than 20–25 % of the content in the blood, namely the gastrointestinal tract (GIT), blood per se, bone-muscular carcass, liver and spleen. Biodistribution and bioaccumulation of NPs within these «cameras» was described by a system with 5 independent linear differential equations of the 1st order. Solution of this system in numerical form, taking into account the timing of the data on the excretion of NPs from the GIT with the feces made it possible to determine the rate constants of inter-organ transfer of NPs. With use of them the calculation was done of the peak (maximum) and quasi-stationary NPs content in critical organs targets, respectively, for the cases of acute (single) and subchronic (repeated) administration into the GIT depending on the dose of NPs. The results obtained indicate the prospects of the method of mathematical modeling for inter-organ transport and distribution of NPs to assess their possible toxic effects on the system level, using previously obtained *in vitro* results and biokinetic studies.

ВВЕДЕНИЕ

Наноматериалы (НМ), являющиеся продуктами современной наноиндустрии, обладают рядом новых, недостаточно изученных свойств, создающих потенциальные риски для здоровья человека и состояния окружающей среды [1, 2]. В настоящее время преобладающее число работ в области токсикологии НМ выполнено *in vitro* на культурах клеток. Число исследований эффектов наночастиц (НЧ) и НМ при воздействии на организмы млекопитающих при естественных путях поступления (через желудочно-кишечный тракт, кожу, респираторно) относительно невелико [3–9], а для ряда практически важных НМ такие данные, по существу, отсутствуют. При этом прямая экстраполяция данных о действующих концентрациях НЧ и НМ в тестах *in vitro* на ситуацию экспонирования через объекты окружающей среды затруднена [10]. Альтернативный подход к решению проблемы токсичности НМ состоит в изучении абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции НЧ и НМ (ADME-исследования [5, 11–15]). Значительного ускорения накопления количественных данных и построения прогностических сценариев биораспределения и бионакопления НЧ и НМ в естествен-

ных условиях воздействия можно добиться с использованием математического моделирования.

Целью данной работы является рассмотрение возможности математической «камерной» модели абсорбции, распределения и бионакопления неметаболизированного НМ в организме лабораторной крысы на примере НЧ серебра средним диаметром 35 нм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

• ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ДЛЯ РАСЧЕТА

В качестве исходных экспериментальных данных для верификации «камерной» модели использованы материалы работы Ю.П. Бузулукова и др. [12], в которой бионакопление и биораспределение НЧ серебра «Арговит-С», получаемых по ТУ 9310-03-79044259-12, имеющих по данным электронной микроскопии средний диаметр 35 ± 15 нм ($M \pm s.d.$), стабилизированных биосовместимым полимером поливинилпирролидоном и практически свободных от примеси ионов серебра, изучали с использованием метода радиоактивных индикаторов. Мечение НЧ изотопом [^{110m}Ag] осуществля-

ли в потоке тепловых нейтронов в исследовательском ядерном реакторе ИР-8 НИЦ «Курчатовский институт», после чего водную суспензию меченых НЧ вводили взрослым крысам самцам линии Вистар однократно внутрижелудочно через зонд. Доза вводимого НМ составляла 0.81 мг/кг массы тела или, в единицах активности, 54.0 кБк/кг массы тела. Экскрецию НЧ с калом и мочой и их содержание во внутренних органах (печень, почки, селезенка, головной мозг, гонады, поджелудочная железа, сердце, легкие) и в крови изучали через 24, 48 и 72 ч после введения методом низкофоновой гамма-спектрометрии (предел обнаружения 0.01 Бк или 150 пг НМ в одной биологической пробе). Результаты полученных количественных оценок представлены в *табл. 1*.

«КАМЕРНАЯ» МОДЕЛЬ БИОНАКОПЛЕНИЯ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НЧ

При проведении математического моделирования процессов биокинетики НЧ использован подход, состоящий в рассмотрении организма как системы, состоящей из ряда компарментов (камер), между которыми происходит обмен НЧ в соответствии с обыкновенными дифференциальными уравнениями 1-го порядка. Данная модель широко используется в нутрициологии, в частности, при описании процессов бионакопления и биораспределения в организме эссенциальных микроэлементов – цинка [16] и селена [17]. В наиболее практически важном случае поступления НЧ с пищей первой из камер их локализации является просвет ЖКТ. С учетом разумного для НЧ благородных металлов и, в частности, серебра допущения об их сравнительно низкой всасываемости в ЖКТ [12] (менее 10 %) кинетика их выведения из организма (главным образом с калом) удовлетворительно описывается одноэкспоненциальной зависимостью массы от времени. Всасывающиеся в ЖКТ неметаболизируемые НЧ далее поступают в кровь и частично, возможно, в лимфу и распределяются

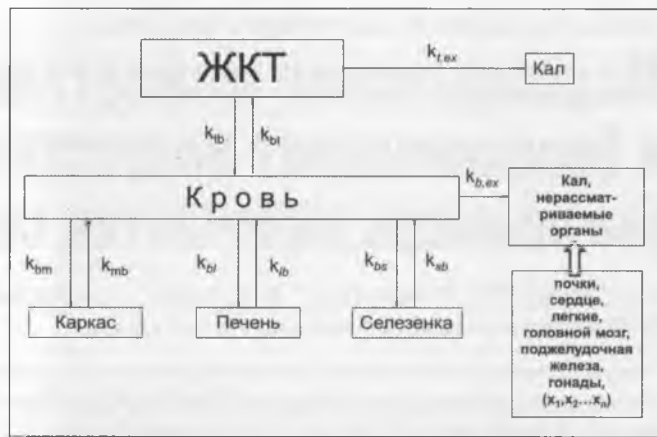


РИСУНОК 1 | Схема применяемой камерной модели

между органами и тканями, рассматриваемыми как отдельные камеры. В минимально приемлемом виде модель биораспределения должна включать все камеры, в которых содержание НЧ на протяжении всего времени эксперимента составляет не ниже 20–25 % от содержания в крови. Как показывают экспериментальные данные (*табл. 1*), для НЧ серебра таких камер 5: ЖКТ, кровь, печень, селезенка и остающаяся после извлечения внутренних органов часть тела животного, условно обозначаемая как «костно-мышечный каркас».

Общий вид используемой при этом «камерной» модели представлен на схеме, *рис. 1*.

Как отмечено выше, предполагается, что обмен НЧ между *i*-й и *j*-й камерой происходит в соответствии с законом действующих масс, что описывается в общем случае следующей системой кинетических уравнений 1-го порядка:

ТАБЛИЦА 1 | Среднее содержание в % от введенной дозы, $M \pm m$, [^{110m}Ag]-меченных НЧ серебра в биосубстратах крыс, получавших этот наноматериал внутрижелудочно (по данным работы [12])

Анализируемый орган/ткань/биосубстрат	Время после введения, ч		
	24	48	72
ЖКТ + кал (в сумме)	>98	>98	>99
ЖКТ (расчетное значение)*	65.3	6.19	0.2
Каркас	0.36±0.17	<0.6	0.23±0.09
Печень	0.60±0.18	0.78±0.26	0.18±0.10
Почки	0.014±0.002	0.029±0.008	0.007±0.003
Кровь	0.126±0.051	0.203±0.046	0.052±0.022
Легкие	0.0094±0.0026	0.0160±0.0025	0.0062±0.0026
Сердце	0.0042±0.0016	0.0060±0.0015	0.0032±0.0007
Поджел. железа	0.0079±0.0015	0.0120±0.0052	0.0039±0.0013
Селезенка	0.054±0.020	0.059±0.029	0.010±0.004
Гонады	0.016±0.003	0.033±0.007	0.010±0.004
Головной мозг	0.0029±0.0010	0.0123±0.0023	0.0053±0.0017
Моча**	0.012±0.002	0.032±0.009	0.048±0.037

*Расчет по данным экскреции с калом кармина у крыс того же пола и возраста [16].

**Данные с нарастающим итогом для всей мочи, выделенной к данному моменту времени.

$$\frac{dM_i}{dt} = \sum_j (-k_{i,j}M_i + k_{j,i}M_j), \quad (1)$$

где M_i – масса (или процентное содержание от общей дозы) НМ в i -й камере, M_j – масса НМ в j -й камере, $k_{i,j}$ – биокинетическая константа скорости «выхода» НМ из i -й в j -ю камеру, а $k_{j,i}$ – соответствующая константа «входа» НМ из j -й в i -ю камеру, t – время. Отметим, что, в общем случае, $k_{i,j} \neq k_{j,i}$.

Для того чтобы анализируемая система стала замкнутой, к пяти вышеобозначенным камерам необходимо добавить еще две: экскременты и остальные органы. Замкнутость системы выражается условием:

$$\sum_i M_i = const. \quad (2)$$

В результате, для 7 камер с дополнительным условием (2) получаем систему 6 независимых линейных дифференциальных уравнений 1-го порядка:

$$\begin{cases} \frac{dM_t}{dt} = -k_{t,b}M_t + k_{b,t}M_b - k_{t,ex}M_t, \\ \frac{dM_m}{dt} = -k_{m,b}M_m + k_{b,m}M_b, \\ \frac{dM_l}{dt} = -k_{l,b}M_l + k_{b,l}M_b, \\ \frac{dM_s}{dt} = -k_{s,b}M_s + k_{b,s}M_b, \\ \frac{dM_{ex}}{dt} = k_{t,b}M_t + k_{m,b}M_m + k_{l,b}M_l + k_{s,b}M_s - \\ - (k_{b,t} + k_{b,m} + k_{b,l} + k_{b,s})M_b + k_{r,b}M_r - k_{b,r}M_b, \\ \frac{dM_r}{dt} = -k_{r,b}M_r + k_{b,r}M_b, \end{cases} \quad (3)$$

где $M_t, M_m, M_l, M_s, M_b, M_r$ – массы НМ соответственно в ЖКТ, скелетно-мышечном каркасе, печени, селезенке,

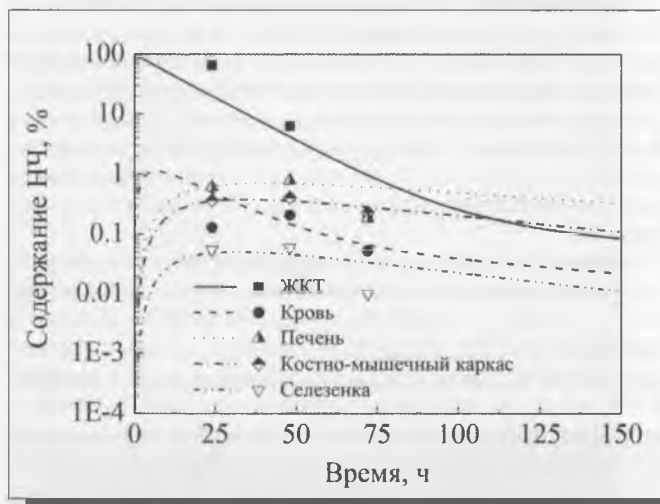


РИСУНОК 2 | Предварительные результаты расчета биокинетики распределения $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ серебра по органам и тканям крысы (без учета тайминга процессов желудочно-кишечного транзита наноматериала). Ось абсцисс – время (ч); ось ординат – содержание НЧ в органе в % от внутрижелудочно введенной дозы

крови и в оставшихся органах. Использование единой постоянной биокинетической константы выхода НЧ в кровь $k_{r,b}$ для всех оставшихся органов в действительности не оправдано, поскольку для каждого из не рассматриваемых органов данный параметр, в общем случае, уникален. В связи с этим, средневзвешенная константа $k_{r,b}$ будет зависеть от текущего распределения НЧ по оставшимся вне рассмотрения органам, которое, в целом, не известно. Решением данной проблемы является предположение $k_{b,r} \approx 0$, т.е. пренебрежимо малое поступление НЧ из крови в не рассматриваемые органы. Это разумное предположение, поскольку в случае перорального введения основным фактором, влияющим на содержание НЧ в крови, является их всасывание из ЖКТ. При $k_{b,r} \approx 0$, $k_{r,b} \approx 0$ и мы можем пренебречь двумя последними слагаемыми в предпоследнем уравнении и целиком последним уравнением системы (3).

С учетом сделанных замечаний, оставшиеся 5 уравнений системы полностью характеризуются 9-ю биокинетическими константами, которые можно представить в виде матрицы размерностью 5×2 :

$$\bar{k} = \begin{pmatrix} k_{t,b} & k_{b,t} \\ k_{m,b} & k_{b,m} \\ k_{l,b} & k_{b,l} \\ k_{s,b} & k_{b,s} \\ k_{t,ex} & 0 \end{pmatrix} \begin{matrix} \text{из ЖКТ в кровь; из крови в ЖКТ} \\ \text{из каркаса в кровь; из крови в каркас} \\ \text{из печени в кровь; из крови в печень} \\ \text{из селезенки в кровь; из крови в селезенку} \\ \text{из ЖКТ в кал; из крови} \\ \text{в не рассматриваемые органы.} \end{matrix} \quad (4)$$

Следует особо указать, что в применяемой модели биораспределения НЧ серебра их экскреция с мочой является пренебрежимо малой по сравнению с экскрецией с калом, что было ранее показано радиоизотопным методом [12], см. *табл. 1*.

Решение системы (4) в аналитической форме при числе уравнений более 4 невозможно (в силу невозможности, в общем случае, аналитического решения характеристического алгебраического уравнения степени выше 4) и может быть осуществлено численными методами. Принцип решения состоит в подборе биокинетических констант, обеспечивающих наилучшее согласование расчетных кривых бионакопления НЧ в органах-мишенях и выведения из них с данными радиоизотопного исследования при фиксированной разовой дозе НМ.

Численное решение с учетом данных, представленных в *табл. 1*, проведено с использованием математического пакета Mathcad 14.0. Исходными данными для расчета в первом приближении были грубые оценочные значения констант (4), полученные из анализа экспериментальных данных (*табл. 1*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного численного моделирования матрица биокинетических констант распределения НЧ серебра получена в следующем виде:

$$\bar{k} = \begin{pmatrix} 1/200 & 1/4,5 \\ 1/60 & 1/45 \\ 1/90 & 1/27 \\ 1/50 & 1/320 \\ 1/15 & 0 \end{pmatrix} \quad (5)$$

Здесь и далее размерность констант выражается в ч^{-1} .

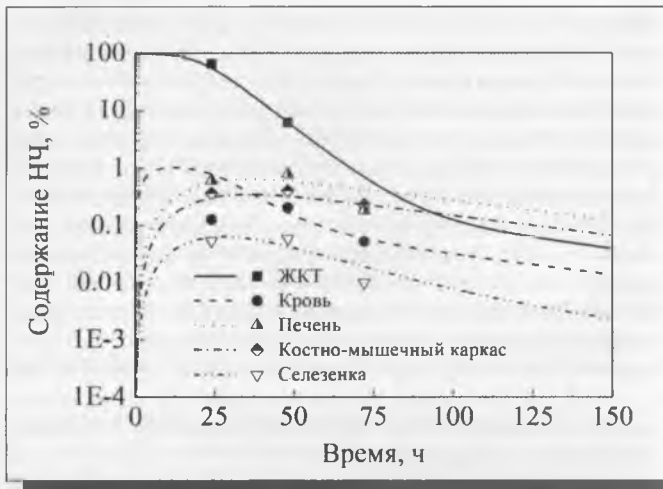


РИСУНОК 3 | БиокINETические кривые распределения $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ серебра по органам и тканям крысы, рассчитанные с учетом тайминга процессов желудочно-кишечного транзита наноматериала. Обозначения по осям – см. рис. 2

На рис. 2 приведены рассчитанные с помощью данного решения системы уравнений биокINETических кривых НЧ серебра в органах крыс. Видно, что использованная модель качественно правильно описывает зависимость содержания НЧ в органе от времени, в частности, быстрое увеличение концентрации в первые сутки после введения изотопно-меченного препарата НЧ, достижение максимума содержания между 1-ми и 2-ми сутками опыта и последующее медленное «вымывание» метки из органов.

Для того чтобы лучше приблизить результаты моделирования к экспериментальным данным, был проведен дополнительный анализ тайминга процессов биоусвоения НЧ. В экспериментах с введением животным неабсорбируемого маркера кармина было ранее показано, что процесс пищеварения от момента введения субстрата в желудок до момента экскреции кала у крысы длится от 15 до 28 ч [18]. Это необходимо учитывать в модельных данных, вводя соответствующие временные множители к кинетическим коэффициентам, которые равны нулю до начала соответствующего процесса и 1 после его инициации.

Частично это демонстрируется на рис. 3, где соответствующий «пусковой» множитель выбран для процесса экскреции кала в виде сигмоидной функции $s(t)$ с инициацией процесса через 20 ч после введения НЧ и разбросом момента инициации в 5 ч.

Видно, что в данном случае наблюдается гораздо лучшее соответствие результатов моделирования экспериментальным данным. Матрица оптимальных биокINETических констант в этом случае изменяется следующим образом:

$$\tilde{k} = \begin{pmatrix} 1/300 & 1/4 \\ 1/50 & 1/55 \\ 1/50 & 1/30 \\ 1/20 & 1/200 \\ (1/10) \cdot \sigma(t) & 0 \end{pmatrix}, \quad (6)$$

$$\sigma(t) = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{t-20}{5}\right)}$$

На основе полученных кинетических констант можно производить оценку накопления исследуемого НМ в определен-

ном органе или ткани в случае многократного (подострого или субхронического) введения НМ в организм животного. Так, если массу НМ, вводимого в ЖКТ животного на протяжении суток, обозначить через m (с размерностью массы, деленной на время, например, мг/сут), то для «стационарного решения» (т.е. при равенстве нулю левых частей уравнений системы (3), которое достигается при $t \rightarrow \infty$ и с дополнительным слагаемым «+ m » в правой части первого уравнения (3) для ЖКТ) можно получить следующее аналитическое выражение для масс НМ (\bar{M}_{stat}), накапливающихся в органах:

$$\bar{M}_{stat} = \frac{m}{k_{i,ex}} \frac{k_{i,b}}{k_{b,i}} \begin{pmatrix} k_{b,t} / k_{t,b} \\ k_{b,m} / k_{m,b} \\ k_{b,l} / k_{l,b} \\ k_{b,s} / k_{s,b} \\ 1 \end{pmatrix} \begin{matrix} \text{ЖКТ} \\ \text{каркас} \\ \text{печень} \\ \text{селезенка} \\ \text{кровь,} \end{matrix} \quad (7)$$

где каждому компоненту полученного векторного решения соответствует стационарное содержание в органе с указанным индексом (t – ЖКТ, m – костно-мышечная ткань, l – печень, s – селезенка). Последнее значение (единица) соответствует стационарному уровню НМ, достигаемому в крови. Таким образом, отношение биокINETических констант поступления в орган из крови и вывода из него в кровь определяет накапливаемое в рассматриваемом органе количество НМ при его многократном введении в ЖКТ животного. Например, для полученных выше значений констант (6) вектор стационарных решений, соответствующий обозначениям (7), примет вид:

$$\bar{M}_{stat} [\text{МКГ}] \approx \frac{m [\text{МКГ/СУТКИ}]}{24} \begin{pmatrix} 10,0 \\ 0,12 \\ 0,22 \\ 0,01 \\ 0,13 \end{pmatrix}, \quad (8)$$

Коэффициент $1/24$ возник из-за пересчета суточной дозы в часовую для согласования размерностей числовых множителей (8). На рис. 4 представлены результаты численного решения системы кинетических уравнений в случае многократного введения коллоидного серебра в ЖКТ крыс в дозе $m = 100$ МКГ/сутки. Начальные значения выбраны нулевыми для всех анализируемых камер. Стационарным значениям соответствуют горизонтальные участки кинетических кривых.

Отметим, что время установления стационарного содержания НМ для каждого органа-камеры составляет приблизительно $1/k_{o,out}$, где $k_{o,out}$ – наибольшая биокINETическая константа выведения данного НМ из органа (в кровь – в случае костно-мышечного каркаса, печени и селезенки и в кал – в случае ЖКТ; индекс «o» должен быть заменен на индекс рассматриваемого органа). Также интересно заметить, что в рассмотренном случае введения коллоидного серебра крысам общее его накопление во всех рассматриваемых органах и биологических жидкостях животного составляет 43.7 МКГ, т.е. менее 50 % от ежесуточно вводимой дозы.

В заключение представляет интерес оценить «пиковые» (максимальные) значения массы НЧ серебра, наблюдаемые в крови и во внутренних органах при разовой дозе, вводи-

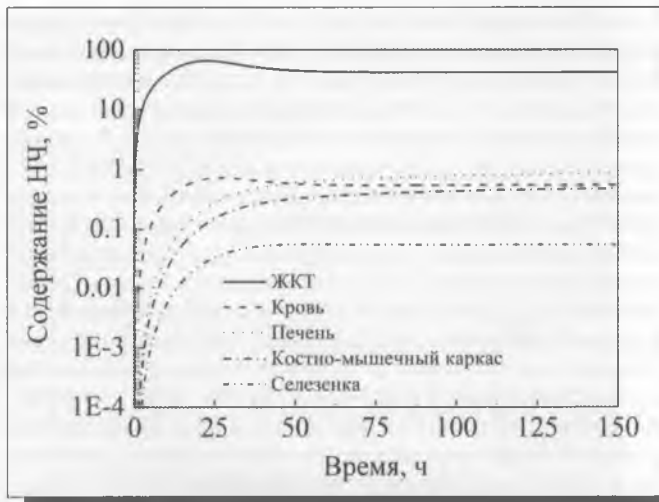


РИСУНОК 4 | Расчетные кривые накопления $[^{110m}\text{Ag}]$ -НЧ серебра по органам и тканям крысы в условиях их ежедневного внутрижелудочного зондового введения. Ось абсцисс – время, ч; ось ординат – накопление, % от ежедневно вводимой дозы.

мой внутрижелудочно: $M_i(0) = M_0$. Для этого будем считать содержание НЧ Ag в ЖКТ постоянным и равным M_0 в течение примерно 15–20 ч, т.е. до начала экскреции кала; при том, что всасывание НЧ в кровь пренебрежимо мало в сравнении с их количеством, присутствующим в течение этого промежутка времени в просвете ЖКТ. По истечении этого времени масса частиц в ЖКТ снижается примерно по моноэкспоненциальному закону $\exp(-k_{i,ex}t)$. В соответствии с вышесказанным, в кровь НЧ всасываются, в основном, из ЖКТ, поэтому в предпоследнем уравнении системы (3) можно пренебречь всеми положительными слагаемыми, кроме первого:

$$\frac{dM_i}{dt} = k_{i,b}M_i - k_{\Sigma b,out}M_b, \quad k_{\Sigma b,out} \approx k_{b,l} + k_{b,m} + k_{b,i} + k_{b,s}, \quad (9)$$

где $k_{\Sigma b,out}$ – суммарный биокинетический коэффициент выхода НЧ Ag из крови во все органы. Выше мы пренебрегли транспортом коллоидного серебра во все не рассматриваемые органы ($k_{br} \approx 0$), чем и обусловлен знак приближенного равенства в (9), хотя в действительности значение константы $k_{\Sigma b,out}$ больше написанного. Решением уравнения (9) при условии постоянства $M_i(t) = M_i(0) \equiv M_0$ является выражение:

$$M_b(t) = \frac{k_{i,b}}{k_{\Sigma b,out}} M_0 (1 - e^{-k_{\Sigma b,out}t}). \quad (10)$$

Видно, что за время порядка $\sim 3 / k_{\Sigma b,out}$ (в численном выражении ~ 3.3 ч, т.е. заведомо меньше 15–20 ч) M_b достигает своего максимального значения:

$$M_{b,max} = \frac{k_{i,b}}{k_{\Sigma b,out}} M_0 \approx 0.011 M_0. \quad (11)$$

Для любого органа, кроме ЖКТ, кинетическое уравнение выглядит как

$$\frac{dM_o}{dt} = -k_{o,b}M_o + k_{b,o}M_b. \quad (12)$$

Следовательно, максимальное содержание НМ в органе (при условии $\dot{M}_o = 0$):

$$M_{o,max} = \frac{k_{b,o}}{k_{o,b}} M_b(t_{o,max}) \leq \frac{k_{b,o}}{k_{o,b}} M_{b,max} \approx 0.011 \frac{k_{b,o}}{k_{o,b}} M_0, \quad (13)$$

где $t_{o,max}$ – время, при котором достигается максимум массы НЧ в органе после их однократного введения в ЖКТ. Очевидное неравенство в (13) ограничивает сверху рассматриваемый максимум наибольшим из теоретически возможных его значений (которое в реальности может и не наблюдаться, поскольку точка максимума содержания НЧ в органе $t_{o,max}$ не обязана совпадать с таковой в крови $t_{b,max}$). Отметим, что при сделанных выше допущениях возможно полное аналитическое решение уравнений (9) и (12), однако это не являлось целью данной работы.

Имеющиеся многочисленные данные литературы о цитотоксическом действии НЧ серебра на клетки млекопитающих в различных системах *in vitro* показывают, что любые эффекты при этом наблюдались в концентрации НЧ, превосходящей во всех случаях 3 мкг/г массы культуральной среды [19–25]. Используя данные по массам органов крыс (табл. 2) и формулы (8) и (13), можно построить зависимости содержания НЧ Ag, достигаемого в органах животных от внутрижелудочно вводимых доз при однократном и многократном (подостром, субхроническом) введении НМ. Как следует из данных, представленных на рис. 5, указанная критическая концентрация в 3 мкг/г достигается, в первую очередь, в печени крыс при внутрижелудочном введении НЧ серебра в дозе 5.3 мг/кг массы тела при однократном способе введения (пиковая концентрация по (13)) и в дозе 10.6 мг/кг массы тела в сутки при многократном (при этом, достигается стационарная концентрация по (8)). Этот результат качественно согласуется с ранее полученными данными о пероральной токсичности НЧ серебра для лабораторных животных. Так, в результате внутрижелудочного введения НЧ серебра крысам в течение 28 дней в дозе 0.1 мг/кг массы тела никаких неблагоприятных изменений по показателю роста животных, интегральных, гематологических, биохимических показателей, состояния систем детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной

ТАБЛИЦА 2 | Экспериментально определенные (по данным [12, 24]) массы органов крыс самцов линии Вистар возрастом около 1.5 месяцев

Печень	Почки	Селезенка	Сердце	Гонады	Легкие	Мозг
3.25±0.05	0.72±0.01	0.64±0.03	0.37±0.01	1.08±0.03	0.63±0.03	0.55±0.01
8.93±0.14	1.98±0.03	1.76±0.08	1.02±0.03	2.97±0.08	1.73±0.08	1.51±0.04

Верхняя строка – % от массы тела; нижняя строка – абсолютные массы в граммах (на крысу массой 275 г).

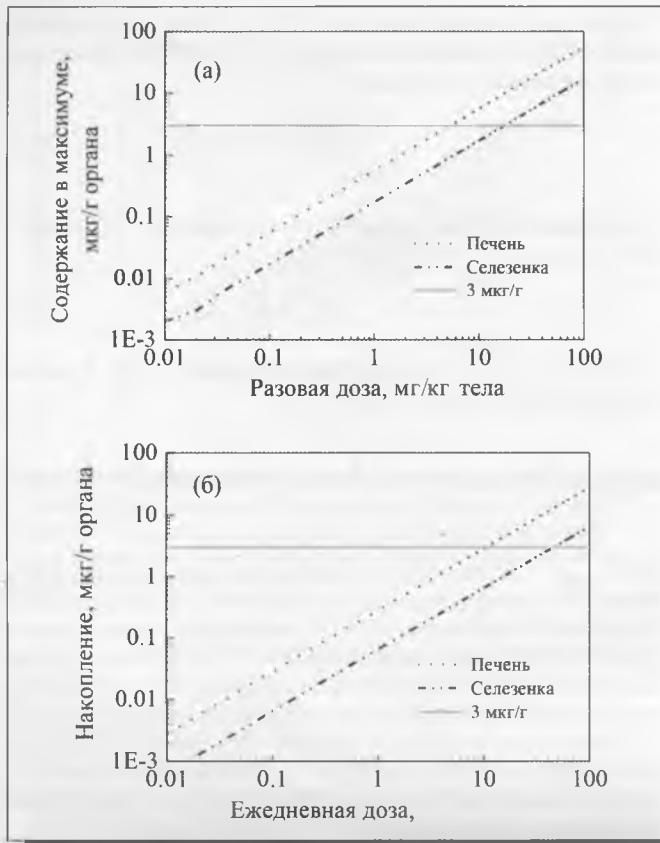


РИСУНОК 5 | Расчетная зависимость наибольшего/пикового (а) и стационарного (б) содержания НЧ Ag в печени и селезенке при однократном (а) и многократном (б) введении коллоидного серебра в желудочно-кишечный тракт. Горизонтальной сплошной линией обозначено критическое значение концентрации НЧ Ag в 3 мкг/г, отвечающее известным цитотоксическим эффектам. Ось абсцисс – вводимая доза НЧ, мг/кг массы тела; ось ординат – удельное содержание НЧ в органе, мкг/г ткани (органа) – максимальное (а) или стационарное (накопление) (б)

защиты, уровня основных популяций нормальной и транзитной микрофлоры толстого кишечника выявлено не было [26]. В дозе 1 мг/кг выявлены сдвиги в отдельных биохимических и физиологических параметрах (всасывание макромолекул в кишке, уровень глюкозы сыворотки крови) и отмечено повышение активности в крови печеночной аспартаминотрансферазы, имевшее маргинальный характер. С другой стороны, в работе [27], где НЧ серебра вводили мышам в дозах до 125 мг/кг массы тела в день, выявлено незначительное по абсолютной величине снижение массы тела, дозозависимые изменения активности щелочной фосфатазы и уровня холестерина плазмы крови после четырех недель экспозиции. Основным органом-мишенью НЧ серебра являлась печень. В ряде других работ [28, 29] подострая перерывальная токсичность серебра не была выявлена в дозах 25–40 мг/кг массы тела в день, однако оценку состояния и функции печени подопытных животных в этих работах не проводили.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования метода математического моделирования межтканевого транспорта и распределения НЧ для оценки их возможного токсического действия на системном уровне с использованием ранее полученных данных *in vitro* и результатов ADME-исследований.

В работе в работах, выполненных совместно НИЦ «Курчатовский институт» и НИИ питания РАМН, был разработан подход к изучению всасывания, биораспределения и бионакопления ряда искусственных НЧ (серебра, золота,

диоксида титана, селена и др.) при их поступлении в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) с помощью метода радиоактивных индикаторов (МРИ) [12–14] и нейтронно-активационного анализа [15]. Однако изучение биораспределения НЧ и НМ с помощью указанных методов выполнено, к настоящему времени, на ограниченном числе НМ и в узком интервале их доз, что не позволяет перейти к однозначному сопоставлению экспозиционных доз НМ с действующими на тканевом уровне дозами (концентрациями) и соответственно вывести зависимости «доза–эффект» («доза–ответ»), необходимые для характеристики опасности. Как показывают результаты настоящего исследования, применение биокинетической модели позволяет установить соответствие между дозами, вводимыми в организм, и возникающими эффектами, которые обусловлены накоплением НЧ и НМ в органах и тканях как для случая однократного (острого) введения, так и длительного многократного (подострого или хронического) воздействия.

Примененная математическая модель исходит из предположения о стабильности НЧ в биологическом окружении, т.е. об отсутствии в значимых количествах их биотрансформации (сопровождаемой изменением диаметра, заряда и химизма поверхности) и растворения. Для НЧ серебра это положение обосновывается рядом работ, в которых независимыми методами была установлена персистенция наночастиц серебра во внутренних органах животных после введения через желудочно-кишечный тракт дисперсии этих НЧ [30–32], а также и солевой (ионной) формы серебра [32]. Перенос камерной биокинетической модели на трансформируемые *in vivo* НЧ связан с труднопреодолимыми проблемами теоретического и вычислительного характера, тогда как для полностью биодеградируемых НМ само понятие биораспределения и бионакопления утрачивает смысл. Необходимо отметить, что указанному критерию отсутствия значимой биотрансформации и растворения в биологических средах удовлетворяет достаточно представительный ряд НМ, включая, по-видимому, такие практически важные из них, как НЧ благородных металлов (золото, серебро, платина, палладий, иридий) [33, 34], квантовые точки, НЧ оксидов и карбидов титана, кремния, алюминия, церия, лантана, циркония и др.

Необходимо также заметить, что представленное в данной работе решение исходило из ряда принципиальных упрощений, главное из которых состояло в пренебрежении транспортом НЧ в некоторые «минорные» (с точки зрения общего количества поступающего НМ) камеры, в том числе в головной мозг. Оценки кинетики переноса НМ через гематоэнцефалический барьер, сопровождающегося, как можно предполагать на основании данных эксперимента [15], выраженной кумуляцией в этом органе, являются предметом дальнейшего развития предлагаемой модели. Другим ограничением применяемой модели является наличие «не рассматриваемых органов», накопление в которых НЧ принимается пренебрежимо малым. Учет этих камер потребовал бы введения в систему дополнительных уравнений, при том, что вычислительный ресурс для получения численного решения возрастает не пропорционально их числу, а значительно быстрее. В то же время это практически не привело бы к увеличению точности оценки биокинетических параметров из-за изначально не слишком точных данных биологического эксперимента и относительно малого содержания метки в рассматриваемых органах. Еще один важный вопрос состоит в органотропности НЧ как функций диаметра частиц, их заряда и химизма поверхности. Однако для построения таких зависимостей в настоящее время недостаточно экспериментальных данных, поскольку данные ADME-исследований ни для одного

практически важного НМ в достаточно широком интервале указанных свойств его частиц в настоящее время в литературе не доступны. ■

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEFI57514X0072).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Тутельян В.А. О концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов // Вопросы питания. 2007. Т. 76. № 6. С. 4–8.
2. Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В., Бокитыко Б.Г., Гиндбург А.Л., Гмошинский И.В., Григорьев А.И., Измеров Н.Ф., Кирпичников М.П., Народицкий Б.С., Покровский В.И., Потапов А.И., Рахманин Ю.А., Тутельян В.А., Хотимченко С.А., Шайтан К.В., Шевелева С.А. Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов // Гигиена и санитария. 2007. № 6. С. 3–10.
3. Гмошинский И.В., Смирнова В.В., Хотимченко С.А. Современное состояние проблемы оценки безопасности наноматериалов // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. № 9–10. С. 6–10.
4. Borm P.J., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC // Part. and Fibre Toxicol. 2006. V. 3. № 11. P. 135.
5. Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy // Part. and Fibre Toxicol. 2005. V. 2. № 1. P. 843.
6. Maynard A.D., Aitken R.J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdorster G., Philbert M.A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S.S., Tran L., Walker N.J., Warheit D.B. Safe handling of nanotechnology // Nature. 2006. V. 444, № 7117. P. 267–269.
7. Хотимченко С.А., Гмошинский И.В., Тутельян В.А. Проблема обеспечения безопасности наноразмерных объектов для здоровья человека // Гигиена и санитария. 2009. № 5. С. 7–11.
8. Верников В.М., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Наночастицы серебра в природе, промышленности, упаковочных материалах, предназначенных для пищевых продуктов: характеристика возможных рисков // Вопросы питания. 2009. Т. 78. № 6. С. 13–20.
9. Плотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. СПб., 2006. 336 с.
10. Balbus J.M., Maynard A.D., Colvin V.L., Castranova V., Daston G.P., Denison R.A., Dreher K.L., Goering P.L., Goldberg A.M., Kulinski K.M., Monteiro-Riviere N.A., Oberdorster G., Omenn G.S., Pinkerton K.E., Ramos K.S., Rest K.M., Sass J.B., Silbergeld E.K., Wong B.A. Meeting report: hazard assessment for nanoparticles – report from an interdisciplinary workshop // Environ. Health Perspect. 2007. V. 115. № 11. P. 1654–1659.
11. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // Environ. Health Perspect. 2005. V. 113. P. 823–839.
12. Бузулуков Ю.П., Гмошинский И.В., Распопов Р.В., Демин В.Ф., Соловьев В.Ю., Кузьмин П.Г., Шафеев Г.А., Хотимченко С.А. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2012. Т. 57. № 3. С. 5–12.
13. Распопов Р.В., Бузулуков Ю.П., Марченков Н.С., Соловьев В.Ю., Демин В.Ф., Калистратова В.С., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Биодоступность наночастиц оксида цинка. Изучение методом радиоактивных индикаторов // Вопросы питания. 2010. Т. 79. № 6. С. 14–18.
14. Melnik E.A., Buzulukov Yu.P., Demin V.F., Demin V.A., Gmshinski I.V., Tyshko N.V., Tutelyan V.A. Transfer of silver nanoparticles through the placenta and breast milk during in vivo experiments on rats // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 3(18). P. 48–56.
15. Buzulukov Yu.P., Arianova E.A., Demin V.F., Safenkova I.V., Gmshinski I.V., Tutelyan V.A. Bioaccumulation of silver and gold nanoparticles in organs and tissues of rats studied by neutron activation analysis // Biology Bulletin. 2014. V. 41. № 3. P. 255–263.
16. Pinna K., Woodhouse L.R., Sutherland B., Shames D.M., King J.C. Exchangeable zinc pool masses and turnover are maintained in healthy man with low zinc intakes // J. Nutr. 2001. V. 131. № 9. P. 2288–2294.
17. Janghorbani M., Martin R.F., Kasper L.J., Sun X.F., Young V.R. The selenite-exchangeable pool in humans: a new concept for the assessment of selenium status // Am. J. Clin. Nutr. 1990. V. 51. № 4. P. 670–677.
18. Гмошинский И.В., Верина Т.Ю., Мазо В.К., Морозов И.А. Проницаемость барьера желудочно-кишечного тракта для макромолекул полистиролгликоля-4000: оценка механизма и воспроизводимости // Бюл. экп. биологии и медицины. 1992. Т. 114. № 11. С. 532–534.
19. Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells // Toxicol. In vitro. 2005. V. 9. № 7. P. 975–983.
20. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M.C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells // Toxicol. Sci. 2005. V. 88. № 2. P. 412–419.
21. Arora S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. V. 236. № 3. P. 310–318.
22. Liu Z., Ren G., Zhang T., Yang Z. Action potential changes associated with the inhibitory effects on voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons by silver nanoparticles // Toxicology. 2009. V. 264. № 3. P. 179–184.
23. Shin S.H., Ye M.K., Kim H.S., Kang H.S. The effects of nanosilver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells // Int. Immunopharmacol. 2007. V. 7. № 13. P. 1813–1818.
24. Powers C.M., Badireddy A.R., Ryde I.T., Seidler F.J., Slotkin T.A. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition // Environ. Health Perspect. 2011. V. 119. № 1. P. 37–44.
25. Haase A., Rott S., Manton A., Graf P., Plendl J., Thünemann A.F., Meier W.P., Taubert A., Luch A., Reiser G. // Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses // Toxicol. Sci. 2012. V. 126. № 2. P. 457–468.
26. Шумакова А.А., Смирнова В.В., Тананова О.Н., Трушина Э.Н., Кравченко Л.В., Аксенов И.В., Селифанов А.В., Сото Х.С., Кузнецова Г.К., Булахов А.В., Сафенкова И.В., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Токсиколого-гигиеническая характеристика наночастиц серебра, вводимых в желудочно-кишечный тракт крыс // Вопросы питания. 2011. Т. 80. № 6. С. 9–18.
27. Kim Y.S., Song M.Y., Park J.D., Song K.S., Ryu H.R., Chung Y.H., Chang H.K., Lee J.H., Oh K.H., Kelman B.J., Hwang I.K., Je Yu I.J. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles // Part. and Fibre Toxicol. 2010. V. 7. № 1. P. 20.
28. Bhol K.C., Schechter P.J. Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis // Dig. Dis. Sci. 2007. V. 52. № 10. P. 2732–2742.
29. Sawosz E., Binek M., Grodzik M., Zielińska M., Sysa P., Szmidi M., Niemiec T. Chwalibog A. Influence of hydrocolloidal silver nanoparticles on gastrointestinal microflora and morphology of enterocytes of quails // Arch. Anim. Nutr. 2007. V. 61. № 6. P. 444–451.
30. Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H.R., Larsen E.H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver actate // Part. and Fibre Toxicol. 2011. V. 8. P. 18.
31. Платонова Т.А., Придворова С.М., Жердев А.В., Василевская Л.С., Арианова Е.А., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Дзантиев Б.Б., Попов В.О., Тутельян В.А. Идентификация наночастиц серебра в тканях слизистой оболочки тонкой кишки, печени и селезенки крыс методом просвечивающей электронной микроскопии // Бюл. экп. биол. мед. 2013. Т. 155. № 2. С. 204–209.
32. van der Zande M., Vanderbruel R.J., van Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serano-Rojero C.S., Gremmer E.R., Mast J., Peters R.J., Hollman P.C., Hendriksen P.J., Marvin H.J., Peijnenburg A.A., Bouwmeester H. Distribution, elimination and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day exposure // ACS Nano. 2012. V. 6. № 8. P. 7427–7442.
33. Semmler M., Seitz J., Erbe F. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs // Inhal. Toxicol. 2004. V. 16. № 6–7. P. 453–459.
34. Pelka J., Gehrke H., Esselen M. Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity // Chem. Res. Toxicol. 2009. V. 22. № 4. P. 649–659.