

УДК 620.3

**И.В. Анциферова, Е.Н. Макарова, И.В. Фефилова**Пермский национальный исследовательский  
политехнический университет**ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ  
НАНОПОРОШКА СИСТЕМЫ  $ZrO_2-2Y_2O_3-4CeO_2+3\%Al_2O_3$   
ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИЗУЧЕНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ  
НАНОЧАСТИЦ МЕТОДОМ ВИЗУАЛИЗАЦИИ IN VIVO**

Все более широкое использование наноматериалов вызывает обеспокоенность по поводу долгосрочного влияния наночастиц на здоровье человека. В числе методов, существующих в настоящее время, наиболее разработанным и надежным применительно к идентификации и выявлению искусственных наночастиц является электронная микроскопия. Она позволяет определять число, размер, форму, кристаллическую структуру, химический состав электроноплотных веществ в диапазоне размеров 1–100 нм. Однако для изучения и выявления распределения и накопления искусственных наночастиц в организме животного требуется не только электронная микроскопия, а также визуализационные камеры, где мы можем изучать распределение наночастиц в теле животного в динамике, при этом не убивая животное. В исследованиях использовался комплекс оборудования по визуализации движения наночастиц в организме животного. В данный комплекс входят установки Photon Imager Optima – Bioscrape Lab (Франция) и TECAN SpectraFlour. Первый используется для визуализации статических и динамических процессов, при введении нанопорошка в лабораторное животное. Вторым – это многофункциональный измеритель флуоресценции и поглощения света. Работа позволит лучше понять биораспределение наночастиц в естественных условиях и позволит использовать полученные данные при изучении токсичности наноматериалов.

**Ключевые слова:** наночастицы системы  $ZrO_2-Y_2O_3-CeO_2-Al_2O_3$ , размер, форма, степень агломерации, токсичность, методы визуализации, флуоресценция.

**I.V. Antsiferova, E.N. Makarova, I.V. Fefilova**

Perm National Research Polytechnic University

**INVESTIGATION OF FLUORESCENCE'S PROPERTIES  
OF THE  $ZrO_2-2Y_2O_3-4CeO_2+3\%Al_2O_3$  NANOPOWDER  
FOR FURTHER STUDY OF THE DISTRIBUTION  
OF NANOPARTICLE USING IMAGING METHOD IN VIVO**

The increasing use of nanomaterials raises concerns about the long-term effects and chronic exposure to nanoparticles on human health. Among the techniques that are currently the most developed and reliable with regard to detection and identification of synthetic nanoparticles is electron microscopy. It allows determining the number, size, shape, crystalline structure, chemical composition of electron-dense

substances in the size range 1–100 nm. However, to examine and identify the distribution and accumulation of engineered nanoparticles in the body of an animal is required not only electron microscopy, as well as a visualization camera, where we can study the distribution of nanoparticles in the body of the animal in the dynamics at the same time without killing the animal. In the study was used a complex of equipment for the visualization of nanoparticles in the body of the animal. Photon Imager Optima – Bioscape Lab (France) and TECAN SpectraFlour are included in this complex. First one is used for the visualization of static and dynamic processes, when the nanopowders are administered to the laboratory animal. The second one is a multifunctional instrument of measuring of fluorescence and absorption of light. This research will allow better understanding the behavior of the biodistribution of nanoparticles in vivo and allowing the use of the data obtained in the study of the practical use of the toxicity of nanomaterials.

**Keywords:** nanoparticles  $ZrO_2$ – $Y_2O_3$ – $CeO_2$ – $Al_2O_3$ , size, shape, degree of agglomeration, toxicity, imaging, fluorescence.

Сфера нанотехнологий находится на стыке многих научных дисциплин, таких как химия, биология, физика и электроника. Интерес к конструкционным материалам на основе  $ZrO_2$  определяется уникальным сочетанием их высокой прочности и вязкости разрушения, стойкости к воздействию агрессивных химических сред, низкой теплопроводности, огнеупорности, ионной проводимости, биоинертности. Эти материалы наиболее интересны для создания биоимплантатов, конструкционной и режущей керамики, твердых электролитов для топливных ячеек. Однако интенсивно развивающееся нанотехнологическое производство порошковых технологий требует рассмотрения вопросов безопасности и оценки рисков воздействия наноматериалов на человека и другие живые организмы. Высокая реакционная способность и малый размер (1–100 нм) позволяют им проявлять повышенное токсическое действие по отношению к биоорганизмам.

Широкое использование наноматериалов вызывает беспокойство по поводу неблагоприятного влияния наночастиц на здоровье человека [1]. Наночастицы обладают свойствами высокоэффективных адсорбентов, они способны поглощать на единицу своей массы во много раз больше адсорбируемых веществ, чем макроскопические дисперсии. При этом происходит облегчение транспорта наночастиц внутрь клетки, причем многие частицы обладают гидрофобными свойствами или являются электрически заряженными, что усиливает как процессы адсорбции на них различных токсикантов, так и их способность проникать через барьеры организма. Известно, что наночастицы могут проникать в неизменном виде в организм через плацентарный барьер, кожу, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и накапливаться в костном мозге, центральной и перифериче-

ской нервной системах, органах желудочно-кишечного тракта, легких, печени, почках, лимфатических узлах, обладать длительным периодом полувыведения [2].

Возможно, из-за малого размера наночастицы могут не распознаваться защитными системами организма, не подвергаются биотрансформации и не выводятся из организма. Это ведет к накоплению наноматериалов в растительных, животных организмах, а также микроорганизмах, передаче их по пищевой цепи, и в итоге увеличивается их поступление в организм человека. На первый план выходит проблема нанотоксичности, в силу того, что токсичность наночастиц не объясняется с помощью сведения токсикологии к наномасштабам [3]. Большинство исследователей соглашаются, что непрерывное преднамеренное или непреднамеренное воздействие наночастиц может привести к хронической токсичности [4].

В настоящее время нет стандартных испытательных методик для измерения воздействия наночастиц. Для успешной оценки применения наноматериалов помимо разработки стандартов потребуются нахождение новых методов измерения и проведение испытаний наноматериалов для определения риска для здоровья. Еще неизвестно, все ли наноматериалы подвергают риску здоровье человека. Необходимы дополнительные исследования, чтобы в полной мере оценить особенности токсичности наночастиц, включая и физические показатели [5].

В числе существующих в настоящее время методов наиболее разработанным и надежным применительно к идентификации и выявлению искусственных наночастиц является электронная микроскопия. Она позволяет определять число, размер, форму частиц электронноплотных веществ в диапазоне размеров 1–100 нм в составе сложных многокомпонентных соединений. По их содержанию в образце с учетом сведений о химическом и фазовом составе наноматериала, плотности частиц, их распределении по размерам можно определить массу, число и суммарную площадь поверхности частиц в единице образца, что позволяет перейти собственно к задаче гигиенического нормирования наноматериалов. Необходимо установление единого научно обоснованного подхода к применению перечисленного комплекса методов в целях выявления, идентификации и количественного определения наиболее важных видов искусственных наноматериалов в объектах окружающей среды в ходе реализации задач контроля за наномате-

риалами на всех стадиях их жизненного цикла. Поскольку реакционная способность и биологическая активность наночастиц зависит от их состава, размеров, концентрации, заряда, площади поверхности, необходимо учитывать эти параметры при контроле содержания наночастиц в животных организмах [3].

Измерить воздействие наночастиц сложно, потому что современные методы количественного определения требуют изоляции или отбора проб внутренних органов [6, 7]. Эти инвазивные методы измерения не подходят для оценки накопления наночастиц в организме человека. Существуют неинвазивные методы – методы визуализации целого лабораторного животного с использованием флуоресценции и медицинской визуализации при помощи радиоволн, спектроскопии комбинационного рассеяния света, мультиспектроскопия и конфокальная микроскопия, которые используют в научных исследованиях для неинвазивного измерения наночастиц в организме лабораторных животных [8–10].

Наночастицы накапливаются в различных органах и помимо изучения размеров, форм, поверхностных свойств и путей введения требуется определить, как физико-химические свойства наночастиц и размер дозы могут повлиять на их накопление в организме. Такая работа позволит лучше понять механизмы биораспределения наночастиц в естественных условиях и использовать полученные данные при изучении токсичности наноматериалов.

Цель работы – изучение методов визуализации, выявления, идентификации и количественного определения наночастиц в организме лабораторных животных для дальнейших исследований токсикологических свойств нанопорошка *in vivo*. Объект исследования – нанопорошок системы  $ZrO_2-2Y_2O_3-4CeO_2+3\%Al_2O_3$ .

Приборы и методы – комплекс оборудования по визуализации наночастиц в организме животного. В данный комплекс входят приборы Photon Imager Optima – Bioscapse Lab (Франция) и TECAN Spectra-Flour. Первый используется для визуализации статических и динамических процессов при введении нанопорошка в лабораторное животное. Второй – это многофункциональный измеритель флуоресценции и поглощения света.

Токсикологические исследования искусственных наночастиц *in vivo* требуют наличия методов выявления, идентификации и количественного определения наночастиц. В числе методов, существующих

в настоящее время, наиболее разработанным и надежным применительно к идентификации и выявлению искусственных наночастиц является электронная микроскопия. Она позволяет определять число, размер, форму, кристаллическую структуру, химический состав электронно-плотных веществ в диапазоне размеров 1–100 нм. Однако для изучения и выявления распределения и накапливания искусственных наночастиц в организме животного требуется не только электронная микроскопия, но и визуализационные камеры, где мы можем изучать распределение наночастиц в теле животного в динамике, при этом не убивая животное.

На установке Photon Imager Optima были проведены эксперименты на флуоресценцию нанопорошка без введения в тело лабораторного животного, в результате которых было выявлено, что данный порошок обладает флуоресцентными свойствами и необходимы дальнейшие исследования по измерению интенсивности этого излучения, для того чтобы можно было выявить не только то, в каких частях организма осаждается нанопорошок, но и в каком количестве.

Была проведена серия экспериментов на установке TECAN SpectraFlour. Эксперимент проводится с нанопорошком в различных состояниях: 1) в порошкообразном состоянии, 2) нанопорошок был предварительно растворен в воде, и 3) нанопорошок был растворен в 0,5 % растворе метилцеллюлозы (МЦ). Исследования нанопорошка, растворенного в 0,5%-ном растворе метилцеллюлозы, проводились для того, чтобы определить интенсивность флуоресцентного излучения именно в том растворе, который будет введен лабораторному животному перорально. Также с раствором МЦ работали еще и потому, что с ее помощью замедляется осаждение препарата и, следовательно, увеличивается точность дозирования.

В ходе данных экспериментов проводился подбор длины волны, при которой происходит излучательный переход (флуоресценция). Также проводился подбор концентрации растворенного порошка и параметров для съемки, так как от этого зависит интенсивность излучения нанопорошка. Исходя из литературных данных по вопросам визуализации при исследованиях *in vivo* и флуоресцентных свойств данного нанопорошка, установили, что данный порошок имеет длину волны поглощения 350 нм и длину волны для излучательного перехода 500 нм.

В ходе эксперимента произведен расчет требуемых концентраций для введения в организм животного. Было принято решение подавать перорально суспензию нанопорошка в 0,5%-ном растворе метилцеллюлозы в расчете 2 г нанопорошка на 1 кг массы животного. Данная концентрация была подобрана исходя из литературных данных и руководства Минздрава РФ по проведению доклинических исследований на лабораторных животных.

Ниже представлены диаграммы, полученные по результатам экспериментов на установке TECAN SpectraFlour (рисунок).

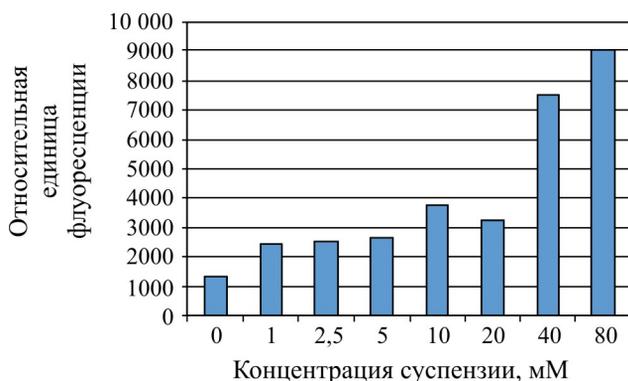


Рис. Интенсивность флуоресценции суспензии нанопорошка в растворе метилцеллюлозы в зависимости от концентрации нанопорошка

Из полученных данных видно, что данный нанопорошок обладает флуоресцентными свойствами и чем выше концентрация нанопорошка в суспензии, тем интенсивней флуоресценция.

Таким образом, для исследования токсичности наноматериалов необходим комплекс исследований, включающий как использование визуализационных камер, так и электронную микроскопию.

### Список литературы

1. Elsaesser A., Howard C.V. Toxicology of nanoparticles // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – Vol. 64. – P. 129–137.
2. Анциферова И.В. Наноматериалы и потенциальные экологические риски // *Изв. вузов. Порошковая металлургия и функциональные покрытия.* – 2010. – № 1. – С. 48–53.
3. МР 1.2.2639-10.1.2. Гигиена, токсикология, санитария. Использование методов количественного определения наноматериалов на пред-

приятнях nanoиндустрии. Методические рекомендации 2010 г. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.alppp.ru/law/obrazovanie-nauka-kultura/nauka/18/mr-1-2-2639-10--1-2--gigiena-toksikologija-sanitarija-ispol-zovanie-metodov-kolichestvenno.html> (дата обращения: 15.06.2014).

4. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice / C. Lasagna-Reeves [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 393. – P. 649–655.

5. Анциферова И.В., Макарова Е.Н. Методы производства наноматериалов и возможные экологические риски // *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Машиностроение, материаловедение.* – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 59–67.

6. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives / M.A. Hahn [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 399. – P. 3–27.

7. Noninvasive imaging of quantum dots in mice / B. Ballou [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – No. 15. – P. 79–86.

8. In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles / R. Kumar [et al.] // *ACS Nano.* – 2010. – No. 4. – P. 699–708.

9. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy / S. Keren [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – No. 105. – P. 5844–5849.

10. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo / A.V. Zvyagin [et al.] // *Journal of Biomedical Optics.* – 2013. – Vol. 13 (6). – P. 064031–1–064031–9.

Получено 10.11.2014

**Анциферова Ирина Владимировна** (Пермь, Россия) – доктор технических наук, профессор кафедры «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета; e-mail: [iranciferova@yandex.ru](mailto:iranciferova@yandex.ru)

**Макарова Екатерина Николаевна** (Пермь, Россия) – аспирант кафедры «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета; e-mail: [katimak59@gmail.com](mailto:katimak59@gmail.com)

**Фефилова Ирина Вячеславовна** (Пермь, Россия) – аспирант, Научно-образовательный центр химических и биологических исследований Пермского национального исследовательского политехнического университета; email: ivfefilova@gmail.com

**Antsiferova Irina** (Perm, Russian Federation) – Doctor of Technical Sciences, Professor, Department “Materials, Technologies and Design of Machines”, Perm National Research Polytechnic University; e-mail: iranciferova@yandex.ru.

**Makarova Ekaterina** (Perm, Russian Federation) – Graduate Student, Department “Materials, Technologies and Design of Machines”, Perm National Research Polytechnic University; e-mail: katimak59@gmail.com.

**Fefilova Irina** (Perm, Russian Federation) – Graduate Student, Research and Education Center of Applied Chemical and Biological Research, Perm National Research Polytechnic University; e-mail: ivfefilova@gmail.com