Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок и методы определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0048—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** и методы определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—34 с.

1. Разработаны Учреждением Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт питания» РАМН (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, М. М. Гаппаров, Л. С. Василевская, В. К. Мазо, В. В. Бессонов, О. И. Передеряев, Е. А. Арианова, О. Н. Тананова, А. А. Шумакова, Р. В. Распопов, В. А. Шипелин); ФГБУ «Российский научный центр «Курчатовский Институт» (В. Ф. Демин, В. М. Шмелев, Ю. П. Бузулуков, Е. С. Альбицкая, И. Е. Захарченко, Ю. Н. Симирский, В. В. Трусов, А. А. Голосная, В. А. Демин, А. С. Воронцов, Н. А. Смагина, А. А. Христофорова, Д. И. Татарников); Учреждением Российской Академии наук «Институт биохимии им. А. Н. Баха» РАН (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, И. В. Сафенкова, Т. А. Платонова, С. М. Придворова); Учреждением Российской академии наук «Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин).

2. Разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2011 годы».

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 27 ноября 2011 г.

4. Введены в действие 27 ноября 2011 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

I. Область применения 4
II. Введение 5
III. Нормативные ссылки 7
IV. Общие положения 9
V. Порядок определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов 13
5.1. Биологические модели 13
5.2. Методы нейтронной активации препаратов наночастиц и наноматериалов, и содержащих их биологических образцов 19
5.3. Метод гамма-спектрометрического анализа содержания меченных радионуклидами наночастиц и наноматериалов в биологических образцах 24
5.4. Оценка методом нейтронно-активационного анализа биораспределения и бионакопления наночастиц и наноматериалов 27
Приложение 1. Основные обозначения и сокращения 32
Приложение 2. Термины и определения 33
Приложение 3. Рекомендуемая литература по радиоизотопным методам исследования наноматериалов 35

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
27 ноября 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок и методы определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0048—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации определяют порядок и методы оценки органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наночастиц и наноматериалов в тестах на лабораторных животных.

1.2. Настоящие методические рекомендации могут применяться:

- при оценке безопасности разрабатываемых новых и уже используемых наноматериалов;
- при оценке рисков, связанных с процессами производства, оборота, использования и утилизации наноматериалов.

1.3. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единства измерений и представления результатов при оценке органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наночастиц и наноматериалов.

1.4. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями и иными организация-

ми, проводящими исследования по оценке безопасности наноматериалов и продукции наноиндустрии.

II. Введение

Наночастицы и наноматериалы рассматриваются в настоящее время как источник риска для здоровья человека и состояния окружающей среды. В числе наночастиц и наноматериалов, способных оказать неблагоприятное воздействие на состояние здоровья человека и природные экосистемы, рассматриваются производимые в промышленных масштабах наночастицы металлов, диоксида титана, кварца, оксида алюминия, углеродные нанотрубки, «квантовые точки» и многие другие. В соответствии с «Концепцией токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов», утверждённой постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79, искусственные наноматериалы должны быть отнесены к новым видам материалов и продукции, характеристика потенциального риска которых для здоровья человека и состояния среды обитания во всех случаях является обязательной.

Важной характеристикой наночастиц и наноматериалов, во многом определяющей их биологическое действие, является их органотропность, то есть способность проникать через физиологические барьеры организма в определённые органы и ткани и накапливаться в них. Для оценки этих показателей в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии на 2008—2011 гг.» был разработан и утвержден в установленном порядке руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации ряд методических документов: МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов»; МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных»; МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных»; МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных»; МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных»; МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии и в контролирующих организациях»; МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды,

живых организмах и пищевых продуктах». Основными методами, рассматриваемыми в перечисленных документах в аспекте выявления, идентификации и количественного определения наноматериалов в органах и тканях животных, является, во-первых, метод трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), и, во-вторых, современные методы элементного анализа (атомно-эмиссионная спектрометрия и масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой).

Основными преимуществами ТЭМ являются, во-первых, исключительно высокая специфичность и наглядность выявления наноразмерных объектов в составе препаратов животных тканей и, во-вторых, возможность с использованием дополнительных опций дифракции электронов и спектров характеристических потерь энергии непосредственно устанавливать химический состав обнаруженных наноразмерных объектов. К ограничениям ТЭМ относится, в контексте исследований по нанобезопасности, недостаточно высокая чувствительность анализа, что не всегда позволяет выявить наночастицы на ультратонких срезах биологических тканей при недостаточно высокой концентрации наночастиц в образце. Современные методы химического анализа обладают высокой чувствительностью, однако и её может быть недостаточно для выявления проникновения ультрамалых количеств наноматериалов через биологические барьеры, в частности, через гемоэнцефалический барьер в ткани головного мозга. Кроме того, методы химического анализа абсолютно неспецифичны в отношении размерных характеристик анализируемых веществ и не способны отличить наночастицы от эндогенно присутствующих в организме химических соединений тех же элементов в традиционной форме дисперсности.

В задачи настоящих методических рекомендаций входит, во-первых, адаптация метода ПЭМ к анализу проникновения наночастиц через барьеры организма (в первую очередь через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта), позволяющая гарантированно выявлять такое проникновение в модельных условиях, приближенных к физиологическим. Во-вторых, впервые в качестве метода исследования органотропности и токсикокинетических свойств наночастиц и наноматериалов предлагается использование метода радиоактивных индикаторов (МРИ) и тесно связанного с ним в аппаратурно-методическом отношении метода нейтронно-активационного анализа. Разработанные уже много десятилетий назад в целях проведения биохимического и физико-химического анализа, эти методы до настоящего времени являются уникальными с позиции своей чувствительности, а метод МРИ также и специфичности в отношении выявления ультрамалых форм меченых соединений, в том числе наночастиц, в составе биологических объектов.

III. Нормативные ссылки

3.1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

3.2. Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

3.3. Федеральный закон от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

3.4. Федеральный закон от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

3.5. Федеральный закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

3.6. Федеральный закон от 9 января 1996 г. № 3-ФЗ «О радиационной безопасности населения».

3.7. Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».

3.8. Постановление Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2005 г. № 569 «О Положении об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации».

3.9. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

3.10. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

3.11. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 г. № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащих наноматериалы».

3.12. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

3.13. СП 2.2.2.1327—03 «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту».

3.14. СП 2.6.1.2612—10 «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ-99/2010)».

3.15. СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ –99/2009)».

3.16. МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

3.17. МУ 1.2.2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов».

3.18. МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.19. МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных».

3.20. МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.21. МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

3.22. МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

3.23. МР 1.2.0022—11 «Порядок отбора проб для контроля за наноматериалами».

3.24. МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах».

3.25. МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии».

3.26. ГОСТ 7.32—2001 «Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

3.27. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

3.28. ГОСТ 24104—2001 «Весы лабораторные. Общие технические требования».

3.29. ГОСТ 25336—82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

3.30. ГОСТ 26678—85 «Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия».

3.31. ГОСТ Р 51652—2000 «Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия».

3.32. ГОСТ 1770—74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия».

3.33. ГОСТ 12.1.005—88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

3.34. ГОСТ 12.1.007—76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

3.35. ГОСТ 8.395—80 «ГСИ. Нормальные условия измерений при поверке. Общие требования».

3.36. ГОСТ Р ИСО 14644-1—2000 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды».

IV. Общие положения

4.1. Целью оценки органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных являются:

- выявление органов и тканей, являющихся мишенями токсического действия наночастиц и наноматериалов;
- установление возможных эффектов кумуляции наночастиц в организмах животных;
- токсиколого-гигиеническая и медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов и продукции, их содержащей;
- гигиеническое нормирование содержания наноматериалов в объектах окружающей среды и потребительской продукции;
- оценка риска для здоровья населения при поступлении наноматериалов в организм с пищей, водой, атмосферным воздухом и иными путями;
- разработка мероприятий по охране здоровья населения и окружающей среды от воздействия наночастиц и наноматериалов.

4.2. Оценка органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных проводится в острых, подострых и хронических экспериментах *in vivo*, при путях поступления наночастиц и наноматериалов, максимально приближенных к условиям экспонирования ими через объекты окружающей среды в обстановке реального воздействия, а также в модельных системах *in vitro*, воспроизводящих приближенные к физиологическим условия проникновения наночастиц и наноматериалов через биологические барьеры.

4.3. Объектами оценки органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных являются качественные и количественные показатели проникновения через барьеры организма, накопление наночастиц и нанома-

териалов в отдельных органах и тканях, скорость и пути выведения (клиренса) наночастиц и наноматериалов из организма.

4.4. Выбор биологического объекта воздействия наночастиц и наноматериалов (вида, линии лабораторных животных), принципы выбора действующих доз, пути, длительность и кратность введения наночастиц и наноматериалов, состав опытных и контрольных групп тестируемых организмов устанавливаются в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» и 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

4.5. При выборе наноматериалов, являющихся объектами оценки органотропности и токсикокинетических параметров в тестах на лабораторных животных, необходимо принимать во внимание:

• возможность экспозиции работников нанотехнологических производств, потребителей продукции наноиндустрии и населения в целом наночастицами и наноматериалами на данной территории, в условиях промышленного производства или при потреблении продукции определённого типа;

• данные литературы из источников, отвечающих критериям научной полноты и достоверности о наличии у тестируемых наноматериалов и их близких аналогов способности проникать через физиологические барьеры организма и внутрь клеток, накапливаться в органах и тканях;

• степень потенциальной опасности наноматериалов для здоровья человека в соответствии с МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

4.6. Лаборатория (организация), проводящая исследования по органотропности и определению токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных, должна быть аккредитована на проведение работ в области оценки безопасности наноматериалов. В лаборатории должны соблюдаться правила надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

4.7. В организации (лаборатории), проводящей исследования по определению органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных, должна быть разработана программа по обеспечению качества проводимых исследований. Все производственные операции проводятся в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП), осу-

ществляемыми в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

4.8. Организации (лаборатории), проводящие исследования по определению органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных, должны быть укомплектованы необходимым оборудованием и средствами измерений, прошедшими поверку (калибровку) в установленном порядке. Эксплуатация оборудования и средств измерений проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения поверки (калибровки) и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание. Применяются средства измерений, имеющие сертификат и зарегистрированные в Государственном реестре средств измерений.

4.9. Организации (лаборатории), проводящие исследования по определению органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов в тестах на лабораторных животных, должны иметь помещения для содержания и работы с лабораторными животными (виварии, клиники лабораторных животных), требования к которым изложены в санитарных правилах по устройству, оборудованию и содержанию вивариев и в МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

4.10. Организации (лаборатории), проводящие исследования по определению органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов, должны соблюдать правила обращения с источниками ионизирующего излучения, установленными в СП 2.6.1.2612—10 «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ 99/2010)». Все источники ионизирующего излучения подлежат учёту и контролю в установленном порядке. Получение, передача, хранение, использование и утилизация источников ионизирующего излучения осуществляются в соответствии с действующими нормативными правовыми актами СП 2.6.1.2612—10 «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ 99/2010)», СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009)».

4.11. Документом, подтверждающим результаты проведённых исследований по определению органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов, является отчёт о проведённом исследовании. Отчет содержит следующие сведения:

• название исследования;

• адрес организации;

• даты начала и завершения исследований;

• цель и задачи исследования;

• характеристика тестируемого наноматериала (химический состав, CAS-номер, средний, минимальный и максимальный размер частиц, форма частиц, наличие примесей, состав дисперсионной среды (носителя) в соответствии с МУ 1.2.2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов»);

• применяемая биологическая модель и обоснование её использования;

• перечень исследованных биологических образцов и применяемых стандартных образцов;

• вид, линию, пол и возраст используемых лабораторных животных;

• состав применяемых рационов, условия содержания животных;

• метод введения наночастиц/наноматериалов, применяемые дозы, длительность и кратность введения;

• характеристики применяемых источников ионизирующего излучения (изотопный состав, химическая форма, спектральные (энергетические) характеристики излучения, период полураспада, МЗА);

• план (дизайн) исследования;

• перечень использованных средств измерений и вспомогательного оборудования и режимы их работы;

• методы статистической обработки результатов;

• результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой и комментариев к ним;

• заключение, выводы, список использованных источников.

Оформление отчёта о результатах исследования должно соответствовать требованиям ГОСТ 7.32—2001 «Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

Отчет о результатах проведенного исследования составляется ответственным исполнителем, утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

4.12. Организация (лаборатория), проводящая исследования по определению органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов, должна обеспечить конфиденциальность

результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

V. Порядок определения органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов

5.1. Биологические модели

5.1.1. Исследования по определению органотропности и токсикокинетических параметров искусственных наноматериалов проводят на крысах самцах линии Вистар или нелинейных крысах исходной массой 80—100 г (при тестировании в условиях подострого или хронического воздействия) или 200—250 г (в условиях острого опыта). Численность групп животных устанавливается в соответствии с задачами исследования, но во всех случаях составляет не менее 4 особей. Животные всех групп на протяжении всего периода тестирования получают полусинтетический рацион в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсикологогигиеническая оценка безопасности наноматериалов». Крыс размещают в клетках из ударопрочной пластмассы группами по 3—4 особи; рацион и питьевую воду предоставляют в режиме свободного неограниченного доступа.

Примечание: возможно использование при проведении тестирования крыс других линий, а также животных других видов, в частности, линейных мышей. Используемые схемы и дозы введения наноматериала при этом должны быть модифицированы в соответствии с видовыми особенностями используемых организмов.

5.1.2. При введении животным препаратов наночастиц и наноматериалов (как немеченых, так и меченных радионуклидами) их диспергируют в носителе (дисперсионной среде) под действием ультразвука. Частота, мощность и длительность ультразвуковой обработки подбираются эмпирически так, чтобы избежать образования крупных агрегатов наночастиц. При необходимости качество диспергирования наноматериала проверяют методом электронной микроскопии согласно МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах». В случае использования препаратов наночастиц, меченных радионуклидами, рекомендуется предварительно отработать методику приготовления и введения животным препарата с использованием немеченого аналога наноматериала (т. н. «холодный опыт»).

5.1.3. В качестве дисперсионной среды при введении наноматериалов животным внутрижелудочно (в/ж) рекомендуется использовать дистиллированную (деионизованную) воду. При внутрикишечном (в/к) введении предпочтительно использование изотонического (0,15 М) раствора NaCl. Дисперсии наноматериала для парентерального введения готовят в стерильном апирогенном физиологическом растворе (0,15 М NaCl) по ГФ СССР X, 426. При приготовлении дисперсий наночастиц и наноматериалов, особенно для внутрикишечного и парентерального введения, нежелательно использование каких-либо иных растворов и дисперсионных сред, в том числе содержащих ПАВ. pH дисперсионной среды для внутрикишечного введения наноматериалов должен находиться в интервале 5—7, ионная сила не должна превышать 0,15 моль/дм^3.

5.1.4. Тестирование органотропности наночастиц и наноматериалов проводят на животных, которым ежедневно на протяжении не менее 30 дней (предпочтительно от 60 до 180 дней) вводят тестируемые наноматериалы внутрижелудочно или иным способом в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов» (п. 6.3.6). В условиях хронического эксперимента длительность введения наночастиц и наноматериалов должна составлять не менее 180 дней (предпочтительно 1 год и более), способ введения устанавливается в соответствии с задачами тестирования (возможно, в частности, диспергирование наноматериала в корме и питьевой воде; при этом необходим ежедневный контроль количеств их потребления животными).

Вводимые дозы наноматериалов устанавливаются индивидуально в соответствии с задачами исследования. Рекомендуется использование, как минимум, двух доз, меньшую из которых устанавливают на основе анализа возможных сценариев пероральной экспозиции человека наноматериалом в условиях контаминации пищевых продуктов и воды отходами деятельности нанотехнологических производств и (или) возможного поступления наноматериала, входящего в состав потребительской продукции, с учётом возможной неопределённости и 10-кратного коэффициента запаса, определяемого биологической природой используемой модели (тестирование на грызунах). Большую дозу наноматериалов рекомендуется делать 10—100-кратно увеличенной (аггравированной). При определении вводимых доз наноматериалов следует принимать во внимание сведения об их острой токсичности (LD_{50}), если такие имеются.

5.1.5. Отбор, предварительную обработку и хранение проб биологических объектов – органов и тканей животных, которым вводили на-

ночастицы и наноматериалы, для определения их органотропности выполняют в соответствии с МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных» и МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных».

5.1.6. Тестирование органотропности и биораспределения наночастиц и наноматериалов в остром опыте возможно с использованием модели *in vivo* (*in situ*), воспроизводимой путём введения дисперсии наноматериала в изолированную петлю тонкой (подвздошной) кишки крысы в условиях сохранения в полном объёме кровообращения и иннервации в изолированном органе. Этим обеспечивается возможность (в отличие от пути введения наноматериала в желудок или перорально с кормом) создания достаточно высокой локальной концентрации наноматериала в просвете кишки, что позволяет осуществить гарантированную электронно-микроскопическую детекцию наноматериала на уровне его всасывания (проникновения в стенку тонкой кишки) и дальнейшего биораспределения по другим органам и тканям. Одновременно, метод электронной микроскопии позволяет выявить возможность развития ультраструктурных изменений кишечной слизистой оболочки под влиянием локально действующих наноматериалов.

Воспроизведение модели острой внутрикишечной экспозиции наноматериалами осуществляется следующим образом.

Крыс исходной массой тела (200 ± 20) г ($M \pm m$) содержат на протяжении периода адаптации к условиям вивария на полусинтетическом рационе в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов». За 16—18 ч до начала эксперимента животных переносят в клетки с сетчатым дном (для устранения копрофагии) и лишают корма. Доступ к воде не ограничивают. Крыс подвергают анестезии гексеналом внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг массы тела в стерильном апирогенном физиологическом растворе (возможно использование других длительно действующих парентеральных анестезирующих средств; доза препарата должна быть установлена экспериментально). В асептических условиях через небольшой разрез брюшной стенки извлекают петлю подвздошной кишки длиной 4—5 см, содержащую Пейеровы бляшки (ПБ), осторожно изолируют её шёлковыми лигатурами, не повреждая сосуды брыжейки и крупные нервы, и дистальнее нижней лигатуры прокалывают кишечную стенку тонкой инъекционной иглой, через которую в петлю кишки вводят 1 $см^3$ дисперсии наночастиц в изотоническом (0,15 М) растворе хлорида натрия. Дисперсии наночастиц готовят, как указано в п. 5.1.3. Лигатуры плотно затяги-

вают, удаляя излишки шовного материала, петлю кишки осторожно возвращают в брюшную полость, кожу зашивают и помещают крыс в клетки на 3 ч. По окончании этого периода животным вводят гексенал (100 мг/кг массы тела), вскрывают брюшную полость и отбирают изолированную петлю подвздошной кишки. Немедленно после этого лигатуры из сегмента кишки удаляют, осторожно разрезают его вдоль линии прикрепления брыжейки и выделяют фрагменты, содержащие и не содержащие ПБ. Эти фрагменты помещают в фиксатор (2,5 % (об./об.) глутаровый альдегид, 2,0 % (об./об.) формалин, на фосфатно-солевом буфере, pH 6,9), который готовят по прописи, приведённой в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (пункт 5.1.3.3). В этот же фиксатор помещают образцы ткани печени, селезенки и, при необходимости, других органов (почки, гонады, головной мозг и прочее) для проведения электронно-микроскопического исследования.

Примечание: с момента иссечения сегмента тонкой кишки до его помещения в фиксатор не должно проходить более 60 с во избежание некротических изменений в ткани кишки, вызванных гипоксией.

Фиксированный для электронно-микроскопического исследования материал кишки, содержащий и не содержащий Пейеровые бляшки, делят на две или, в зависимости от задач исследования, три части, которые обрабатывают для электронно-микроскопического исследования в соответствии с МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (п. 5.1.4.5), в следующих трёх режимах:

1) без какого-либо дополнительного контрастирования соединениями тяжёлых металлов (ряд 1);

2) с дофиксацией и контрастированием тетроксидом осмия OsO_4 (ряд 2);

3) с контрастированием тетроксидом осмия и окрашиванием уранилацетатом и цитратом свинца (ряд 3, выполняется при необходимости в зависимости от задач тестирования).

Аналогичным образом (ряд 1, ряд 2) осуществляется обработка биологического материала других органов, отобранных для анализа.

Препараты исследуют методом электронной микроскопии в соответствии с МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (пункт 5.1.6) с использованием дополнительных аналитических опций (снятие электронных дифрактограмм, спектров характери-

стических потерь энергии электронов). При этом для препаратов трёх указанных выше рядов решаются следующие задачи.

Ряд 1: выявление наночастиц и нанообъектов в объёме изучаемой ткани, их идентификация (установление формы, размера, химического состава, кристаллической структуры) путём сравнения со стандартными образцами наноматериала; выявление возможных эффектов биотрансформации наночастиц в органах и тканях.

Ряд 2: установление локализации предварительно идентифицированных наночастиц и нанообъектов в составе следующих компартментов:

- в просвете кишки;
- в объёме пристеночных слизистых наложений;
- на мембране щёточной каймы (микроворсинках) энтероцитов;
- в межклеточных пространствах эпителиального пласта выше и ниже плотных контактов (tight junction) клеток;
- в энтероцитах (в объёме цитоплазмы, в эндоплазматических везикулах (в апикальной, надъядерной и подъядерной области), в органеллах (ядро, митохондрии и другое);
- в межклеточном пространстве собственной пластинки;
- в лейкоцитах слизистой оболочки и ПБ;
- в клетках мышечного слоя кишки.

Ряд 3: выявление возможных ультраструктрных изменений в органеллах слизистой оболочки тонкой кишки, подвергшихся экспонированию наночастицами (если в ходе исследования ставится такая задача).

5.1.7. Тестирование органотропности и биокинетических характеристик наночастиц методом МРИ (метод радиоактивных индикаторов) проводится после однократного введения наноматериала в организм. Рекомендуется использовать внутрижелудочный способ введения как наиболее адекватный путь поступления наноматериалов в организм с пищей и питьевой водой. Использование других путей введения наноматериала возможно в случае наличия адекватных методов экспонирования животных радиоизотопно меченным препаратом.

Обработку водной дисперсии меченного радиоизотопом наноматериала проводят как указано в п. 5.1.2. Непосредственно после ультразвуковой обработки отбирают аликвоту дисперсии наноматериала в контейнер для γ-спектрометрии в целях точного определения вводимой радиоактивности препарата. Типичный объём отбираемого препарата составляет 1 $см^3$ и может быть изменён в сторону уменьшения при высокой удельной радиоактивности образца.

В тестировании используют крыс массой тела (250 ± 20) г. На протяжении недели перед введением препаратов животных адаптируют к условиям вивария при потреблении стандартного полусинтетического рациона (в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов»). За 16—18 ч до опыта животных лишают корма. Наноматериал, меченный радиоактивным изотопом, вводят внутрижелудочно через зонд в объёме не более 5 $см^3$ (предпочтительно 1—2 $см^3$). Немедленно после этого крыс размещают в обменные клетки, допускающие раздельный сбор кала и мочи. Клетки размещают в вытяжном шкафу, снабжённом на выходе HEPA фильтром для улавливания радиоактивных аэрозолей (возможным источником которых является, преимущественно, высохший кал животных).

На протяжении всего периода нахождения в клетках крысы получают корм и воду без ограничений.

Отбор проб мочи и кала проводят на протяжении всего периода нахождения животных в клетках с суточными интервалами. Кал и мочу собирают в контейнеры для γ-спектрометрии. При сборе кала используют пинцет. Объём мочи замеряют мерным цилиндром и записывают в лабораторный журнал. В случае, если количество собранной за сутки мочи превосходит объём контейнера, в него помещают аликвоту образца после тщательного перемешивания, объём аликвоты измеряют и записывают.

Забой животных осуществляют через 4 ч, 1, 2, 3 и 5 суток после введения радиоизотопно меченного наноматериала (возможно использование других сроков забоя в соответствии с задачами тестирования). При забое используют методы эвтаназии в соответствии с МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных» и МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных». Отбор проб биологического материала (кровь, внутренние органы) проводят в соответствии с МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных». При этом важно учитывать, что ввиду чрезвычайно высокой чувствительности МРИ возможно получение артефактов, связанных с перекрестной контаминацией органов и тканей радионуклидами в составе тканевых жидкостей и экссудатов. Поэтому желательно проводить отбор каждого органа отдельным комплектом инструментов или с использованием одноразового инструмента, например, скальпелей со съёмными лезвиями (МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных»). Органы

желудочно-кишечного тракта, содержащие высокие уровни радионуклидной метки (особенно в первые двое суток после введения препарата), иссекают в последнюю очередь, стараясь не повредить их целостность в ходе предшествующих операций по пробоотбору.

Пробы органов немедленно после отбора помещают в контейнеры для γ-спектрометрии. По окончании отбора проб остающийся мышечный каркас измельчают ножницами вместе со шкурой и волосяным покровом и также помещают в контейнер соответствующего объёма для γ-спектрометрии.

Все отобранные пробы органов и тканей маркируют одним номером, отвечающим номеру животного. Образцы ткани и мочи маркируют номером животного и сроком с момента введения меченного радионуклидом препарата (например, 1 сутки, 2 суток и т. д.).

Все отобранные пробы хранят до проведения γ-спектрометрического анализа в морозильной камере при температуре не выше –18 °С.

5.2. Методы нейтронной активации препаратов наночастиц и наноматериалов, и содержащих их биологических образцов

5.2.1. Выбор радиоактивного изотопа для проведения исследований

При получении препаратов наночастиц и наноматериалов, меченных радиоактивными изотопами, а также при анализе биораспределения и бионакопления немеченых наночастиц и наноматериалов по органам и тканям используют эффект нейтронной активации, состоящий в поглощении ядрами химических элементов нейтронов, получаемых от подходящего лабораторного источника (исследовательского ядерного реактора или ускорителя протонов с бериллиевой мишенью). Образующиеся при этом радиоактивные изотопы (радионуклиды) химических элементов обладают радиоактивностью с распадом, как правило, по β^- или β^+ типу, сопровождающимся эмиссией гамма-квантов в характеристических узких диапазонах (линиях) энергий. Регистрация этих радионуклидов в образцах органов и тканей возможна с использованием метода γ-спектрометрии, характеризуемом исключительно высокой чувствительностью и селективностью.

Для успешной реализации рассматриваемой методики в биологических экспериментах необходимо, во-первых, чтобы радиоактивные продукты нейтронной активации исходных стабильных изотопов обладали достаточно большим периодом полураспада – от нескольких суток до нескольких десятков и даже сотен суток. Использование в таких экспериментах более короткоживущих радиоактивных изотопов невозможно

или, в крайнем случае, весьма затруднительно. Во-вторых, спектры эмиссии γ-квантов от анализируемых меченных радионуклидами наночастиц не должны перекрываться со спектрами эмиссии активированных нейтронами изотопов химических элементов, эндогенно присутствующих в биологической ткани (это особенно существенно в случае применения метода нейтронной активации биологических образцов).

В дальнейших разделах методики в качестве практически важного примера будет рассмотрена активация радионуклидов серебра, золота, селена и титана, входящих в состав большого числа практически важных образцов наночастиц и наноматериалов (металлические, металлооксидные наночастицы, квантовые точки и другое).

5.2.2. Характеристики используемых ядерных реакций

При нейтронной активации элементов, перечисленных в п. 5.2.1, используются следующие ключевые реакции нейтронной активации:

$^{109}Ag + n \longrightarrow {}^{110m}Ag,$
$^{74}Se + n \longrightarrow {}^{75}Se$
$^{197}Au + n \longrightarrow {}^{198}Au$
$^{46}Ti + n \longrightarrow {}^{46}Sc$ (из реакции (n,p)

Необходимые для реализации методики ядерные и другие данные, характеризующие исходные и активированные изотопы, приведены в табл. 1. Первые три реакции из представленного выше списка осуществляются в потоке тепловых нейтронов (диапазон энергии тепловых нейтронов: 0,005 эВ < E_n < 0,4 эВ). Для изотопов титана необходимые по времени жизни радиоизотопы, образующиеся в реакциях на тепловых нейтронах, отсутствуют. По этой причине выбор сделан в пользу радиоизотопа ^{46}Sc, образующегося в пороговой реакции (n,p) (с вылетом протона) на быстрых нейтронах на стабильном изотопе ^{46}Ti.

5.2.3. Проведение активации

Образцы для активации изготавливаются из водных суспензий с наночастицами выбранного вида. Суспензия объемом 2,0 $см^3$ запаивается в кварцевые колбы (ампулы) из особо чистого кварца. Для этого рекомендуется использовать заготовки колб марки К6 производства ФГУП «ОКТБ ИС» или аналогичные. При запайке колбы заполнялись суспензией не более чем на 50 % объема для снижения опасности разрушения колбы при гипотетическом аварийном перегреве колбы выше 100 °С. Геометрия внутреннего объема суспензии (заполняющей колбу) с высокой точностью соответствует размерам стандартной пластмассовой про-

бирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 $см^3$, в которой размещают биологические образцы-пробы. Если биологические образцы-пробы упаковываются в другую тару, то стандартные образцы (СО) следует приготавливать в колбах другой вместимости. Это сводит к минимуму влияния форм-фактора на точность измерений при последующих гамма-спектрометрических измерениях.

5.2.3.1. Сеанс нейтронной активации в потоке тепловых нейтронов.

Кварцевые колбы с материалом для облучения помещают в негерметичные контейнеры, изготовленные из высокочистой алюминиевой фольги диаметром 35 и высотой 80 мм. Для проведения сеанса облучения подготавливают документы: «Заявка на облучение» и «Программа облучения» в соответствии с принятым порядком для персонала исследовательского ядерного реактора.

Контейнер на цепочке, состоящей из алюминиевых звеньев (нижняя часть с длиной 5 м), и полиэтиленовой леске (верхняя часть с длиной 5 м), опускают в вертикальный экспериментальный канал реактора на позицию облучения на глубине, соответствующей максимуму нейтронного потока.

По окончании облучения контейнер подтягивают на несколько метров за пределы активной зоны и оставляют внутри биозащиты реактора для «остывания» – распада большей части короткоживущих радиоизотопов, в частности, ^{28}Al с $T_{1/2}$ = 2,7 мин и ^{31}Si с $T_{1/2}$ = 2,6 ч, создающих в первое после облучения время доминирующую дозовую нагрузку. После выдержки внутри биозащиты реактора («остывания») в течение нескольких суток контейнер с образцами под контролем дозиметриста извлекают из канала реактора и направляют для дальнейшей обработки и исследований. Все передвижения образца фиксируют в «Паспорте на образец, облученный в реакторе», заполняемом в установленном порядке. Достигнутые уровни излучения ниже МЗА после «остывания» позволяют провести последующие гамма-спектрометрические измерения (раздел 5.3).

5.2.3.2. Сеанс нейтронной активации титана в потоке быстрых нейтронов.

Образец с исходным материалом, содержащим титан (в виде нанопорошка диоксида титана) и помещенный в специальный контейнер, подвергается облучению быстрыми нейтронами в исследовательском канале ускорителя протонов. Быстрые нейтроны образуются при облучении толстой мишени из бериллия потоком протонов, выходящим из основного канала ускорителя протонов. В реакции (n,p) на изотопе бе-

риллия ^{9}Be образуются нейтроны энергетической полосой шириной примерно в 6 МэВ при энергии 14 МэВ в центре полосы.

Таблица 1

Характеристики исходных и активированных изотопов Ag, Se, Ti, Au, участвующих в реакции нейтронного захвата и измерении γ-активности

Наноматериал	Изотоп мишени				Радиоактивный изотоп					
	Изотоп	Содержание в природной смеси, %	M, г/моль	σ_{2}, 10^{-24} см^2	Радиоактивный изотоп из n_{th}-захвата	$T_{1/2}$, сут.	λ, сут.$^{-1}$	Вид излучения	E_γ, МэВ	n_γ, распад$^{-1}$
Серебро	^{109}Ag	48,2	108,905	4,4	^{110m}Ag	249,8	0,00277	β^-, γ	**0,66;** 0,88	**0,95;** 0,73
Селен	^{74}Se	0,89	73,92	48	^{75}Se	119,779	0,00579	γ*	**0,2647;** 0,1360	**0,594;** 0,606
Титан	^{46}Ti	8,25	45,95	0,01	^{46}Sc (из реакции (n,p)	83,79	0,00827	β^-, γ	**1,121;** 0,8892	**1,0;** 1,0
	^{47}Ti	7,44	46,95	0,01	^{47}Sc (из реакции (n,p)	3,35	0,2069	β^-, γ	159,4; 983,5	0,68; 1,0
Золото	^{197}Au	100	196,97	98,7	^{198}Au	2,695	0,2572	β^-, γ	**0,4118;**	**0,955;**

* Из реакции захвата электронов.

Обозначения: σ – сечение захвата нейтрона; $T_{1/2}$ – период полураспада ядра изотопа; n_γ – квантовый выход (число фотонов) на распад; E_γ – энергия γ-излучения изотопа; M – молярная масса изотопа; $\lambda = \ln 2/T_{1/2}$ – постоянная распада.

Жирным шрифтом выделены гамма-линии, которые являются наиболее удобными для определения гамма-активности исследуемого образца

Для проведения сеанса облучения подготавливают документы: «Заявка на облучение» и «Программа облучения» в соответствии с принятым порядком для персонала ускорителя протонов.

Сеанс облучения контейнера с облучаемым материалом в исследовательском нейтронном канале проводится аттестованным сотрудником в соответствии с «Заявкой на облучение», «Программой облучения» и действующими внутренними инструкциями для персонала, обслуживающего ускоритель.

После сеанса и выдержки внутри биозащиты ускорителя («остывания») в течение времени до нескольких суток контейнер с образцами под контролем дозиметриста направляется для дальнейшей обработки и

исследований. Все передвижения образца фиксируются в «Паспорте на образец, облученный на ускорителе», заполняемый в установленном порядке. Как и в варианте облучения образца на реакторе, достигнутые уровни излучения ниже МЗА после «остывания» позволяют провести последующие гамма-спектрометрические измерения (раздел 5.3).

5.2.3.3. Приготовление водных дисперсий радиоизотопно меченных наночастиц для введения животным.

Полученные после облучения в потоке нейтронов радиоактивные наноматериалы используются для приготовления препаратов, предназначенных для введения подопытным животным.

Водные суспензии после сеанса облучения нейтронным потоком разбавляют до удельной активности не менее 5 кБк/см^3 (рабочий интервал активностей, вводимых внутрижелудочно, устанавливается индивидуально в соответствии со свойствами применяемого наноматериала и ядерно-физическими характеристиками применяемого радиоизотопа). Облученный нанопорошок оксида титана разбавляют в 20 см^3 дистиллированной воды до концентрации 50 мг/см^3. Из-за очень высокой активации золота разбавление водной суспензии меченых наночастиц возможно с применением «холодного», не подвергшегося активации препарата этих наночастиц концентрацией 50 мкг/см^3.

Непосредственно перед введением животным препараты наноматериалов, меченные радиоактивными изотопами, помещённые в герметически закрытые стеклянные или пластмассовые контейнеры, дополнительно обрабатывают ультразвуком для предотвращения агрегации наночастиц (время, частота и мощность обработки должны соответствовать параметрам, предварительно подобранным для немеченого образца наноматериала в «холодном» опыте, п. 5.1.2).

5.3. Метод гамма-спектрометрического анализа содержания меченных радионуклидами наночастиц и наноматериалов в биологических образцах

5.3.1. Средства измерений

Гамма-спектрометрические измерения выполняются аттестованным специалистом на низкофоновом гамма-спектрометре, оснащённом германиевым детектором, работающим под управлением ПЭВМ со специализированным программным обеспечением. Рекомендуется использовать спектрометры, обладающие метрологическими характеристиками не хуже следующих:

- диапазон регистрируемого гамма-излучения: 40—2 700 кэВ;

• интегральная нелинейность в диапазоне 59,6—2 500 кэВ – 0,032 %;

• эффективность регистрации в пике 1 332,50 кэВ – $5{,}3 \cdot 10^{-4}$;

• минимальная измеряемая активность Cs-137 за 1 ч в геометрии объемного источника не более 0,15 Бк.

Геометрия детектора прибора должна допускать измерение радиоактивности биологических образцов, в том числе таких объемных, как образцы крови, печени, желудочно-кишечного тракта и костно-мышечного каркаса. Рекомендуется использование гамма-спектрометрического комплекса производства фирмы «Canberra» (США) в составе: детектора GC4018; анализатора DSA-1000; программного обеспечения: Genie-2000 – Genie S501, Genie S502 или иного с аналогичными параметрами. Спектрометр должен быть внесён в государственный реестр средств измерений и поверен в установленном порядке.

Измерения выполняются в соответствии с заданием на гамма-спектроскопические измерения, инструкцией и руководством по эксплуатации оборудования.

Результаты гамма-спектрометрических измерений обрабатываются программным комплексом гамма-спектрометра. В частности, для каждого измерения определяется среднеквадратичная ошибка. Расчет этих ошибок по формулам настоящих методических рекомендаций (формулы 3, 4) должен давать совпадающие результаты.

5.3.2. Процедура гамма-спектрометрического анализа

Осуществляются операции по подготовке гамма-спектрометра к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Непосредственно перед проведением основных измерений с пробой образца проводят фоновые измерения скорости счета без образца в тех энергетических областях, которые будут использоваться при проведении измерений значений скорости счета от проб исследуемого образца и стандартного образца.

Сосуд с исследуемым образцом или СО закрепляют на торцевой стороне корпуса детектора и затем перемещают детекторный блок в свинцовый защитный домик.

Время экспозиции образца в спектрометре выбирают в зависимости от прогнозируемой точности измерения, определяемой величиной радиоактивности образца в Бк.

После снятия гамма-спектра в области пика полного поглощения выделяют энергетический диапазон, в котором производится оценка скорости счета. Выбранный диапазон должен располагаться симметрич-

но относительно пика эмиссии анализируемого изотопа. Ширину диапазона устанавливают из условия, чтобы она была не менее четырехкратной полной ширины пика эмиссии на ½ его высоты.

С помощью программного обеспечения гамма-спектрометра в выбранном диапазоне определяют полное число зафиксированных импульсов, $с^{-1}$ в гамма-спектре исследуемого или стандартного образца.

Производится обработка результатов измерений, включая определение абсолютной радиоактивности образца в Бк.

5.3.3. Обработка результатов измерений

Основными результатами измерения на гамма-спектрометре являются числа зарегистрированных импульсов $N_э$ и N_x соответственно от стандартного и исследуемого образцов за время измерения Δt.

Числа $N_э$ и N_x гамма-распадов ядер изучаемого радиоактивного элемента соответственно в эталонном и исследуемом образцах за время измерения Δt получаются из полного количества измеренных импульсов в гамма-пике за вычетом фонового числа зарегистрированных импульсов:

$$N_э = N_{э,п} - N_{э,ф} \quad \text{и} \quad N_x = N_{x,п} - N_{x,ф.}, \text{ где} \qquad (1)$$

$N_{э,п}$ ($N_{x,п}$) – полное число импульсов от стандартного (исследуемого) образца;

$N_{э,ф.}$ ($N_{x,ф.}$) – соответственно фоновые значения регистрируемых импульсов.

Содержание искомого элемента m_x в образце вычисляется по следующей формуле:

$$m_x = m_э \times \left(\frac{N_x}{N_э}\right), \text{ где} \qquad (2)$$

$m_э$ – известное количество элемента в стандартном образце.

5.3.4. Оценка погрешности результатов измерений

Статистический разброс измерений числа γ-распадов радиоактивных ядер подчиняется распределению Пуассона. В этом распределении при числе распадов $N >> 1$ среднеквадратичные ошибки величин $N_э$ и N_x определяются следующей формулой:

$$\sigma(N_э) = (N_{э,п} + N_{э,ф.})^{1/2}; \quad \sigma(N_x) = (N_{x,п.} + N_{x,ф.})^{1/2} \qquad (3)$$

Относительные среднеквадратичные ошибки соответственно равны:

$$\sigma_{\hat{i}\grave{o}\acute{i}}(N_{\acute{y}}) = \frac{(N_{\acute{y},\ddot{i}} + N_{\acute{y},\hat{o}})^{1/2}}{N_{\acute{y}}}; \quad \sigma_{\hat{i}\grave{o}\acute{i}}(N_{\tilde{o}}) = \frac{(N_{\tilde{o},\ddot{i}} + N_{\tilde{o},\hat{o}})^{1/2}}{N_{\tilde{o}}} \qquad (4)$$

Для полного описания неопределенности оценки значения m_x необходимо еще иметь среднеквадратичную ошибку $\sigma(m_э)$ измерения количества искомого элемента в стандартном образце. Полную среднеквадратичную ошибку определения массы искомого элемента m_x в исследуемом образце с учетом всех среднеквадратичных ошибок, описанных выше, вычисляют по формуле

$$\sigma(m_{\tilde{o}}) = m_x \{\frac{1}{N_{\acute{y}}} + \frac{1}{N_x} + 2\,(\frac{N_{\acute{y},\hat{o}}}{N_{\acute{y}}^2} + \frac{N_{\tilde{o},\hat{o}}}{N_{\tilde{o}}^2}) + [\frac{\sigma(m_{\acute{y}})}{m_{\acute{y}}}]^2\}^{1/2}, \text{ где} \qquad (5)$$

индекс «x» относится к исследуемому, а «э» – к стандартному образцу.

Доверительный 95-процентный интервал измеряемого значения m_x определяют как

$$ДИ(95) = [m_x - 2\sigma(m_x),\ m_x + 2\sigma(m_x)] \qquad (6)$$

с центром, равным m_x. Величина m_x рассчитывается по формуле (2), а ее среднеквадратичное отклонение $\sigma(m_x)$ – по формуле (5).

5.4. Оценка методом нейтронно-активационного анализа биораспределения и бионакопления наночастиц и наноматериалов

5.4.1. Предварительные замечания

Метод нейтронно-активационного анализа (НАА) является, по существу, одним из возможных методов элементного анализа образца, характеризуемым, в первую очередь, рекордно высокой чувствительностью. Его применимость к детектированию наночастиц и наноматериалов в составе органов и тканей животных определяется следующими основными факторами:

1. В составе изучаемого наноматериала должны быть химические элементы представленные изотопами с подходящими для нейтронной активации ядерно-физическими свойствами (энергия нейтронов, сечение захвата, изотопный состав дочерних радионуклидов).

2. Фоновые уровни детектируемого элемента в составе биологического объекта не должны препятствовать выявлению наночастиц методом НАА. Для каждого отдельного случая эти фоновые уровни должны быть установлены путём нейтронной активации образцов тканей от интактных (контрольных) животных.

3. Детектируемые в органах и тканях наночастицы должны быть, по возможности, нерастворимыми в биологических жидкостях и небиотрансформируемыми (к их числу принадлежат, в частности, наночастицы золота и других благородных металлов, а также диоксида титана).

При определении количеств искомых элементов в исследуемом образце могут быть использованы:

- абсолютный метод;
- метод эталонов.

Основным методом измерения является метод эталонов, обеспечивающий высокую точность измерений. Абсолютный метод не может обеспечить высокую точность, но он используется при планировании измерений по методу эталонов, позволяя расчетным путем выбрать оптимальные характеристики обоих этапов измерения: время экспозиции образца в потоке тепловых или быстрых нейтронов, время измерения на гамма-спектрометре для заданных свойств исследуемого образца.

5.4.2. Применение абсолютного метода

Содержание m (в граммах) искомого элемента в исследуемом образце определяют расчетным методом по свойствам изотопа-мишени и активированного радиоактивного изотопа, измеренной γ-активности на γ-спектрометре радиоактивного изотопа в образце, величине плотности потока нейтронов во время сеанса облучения и другого. Расчет проводят по следующей формуле:

$$m = (M/\theta) \cdot A_\gamma / \{A_{г.-м.}(t_{обл}) \cdot \exp(-\lambda \cdot t_p)\}, \text{ где} \qquad (7)$$

M – атомная масса активируемого изотопа в облучаемом образце в г-ат;

θ – доля активируемого изотопа в естественной смеси;

λ – постоянная распада ($\lambda = \ln 2/T_{1/2}$);

$T_{1/2}$ – период полураспада продукта активации – радиоактивного изотопа;

t_p – время между окончанием сеанса облучения и началом измерения γ-активности на γ-спектрометре;

A_γ – гамма-активность образца на некоторой выбранной гамма-линии радиоактивного изотопа в момент начала измерения числа распадов на γ-спектрометре в Бк;

$A_{г.-м.}(t_{обл})$ – γ-активность от г-ат активируемого изотопа к моменту времени $t_{обл}$ окончания сеанса облучения в канале реактора, определяемая как:

$$A_{г.-м.}(t_{обл}) = N_A \cdot \sigma \cdot F \cdot n_\gamma \cdot [1 - \exp(-\lambda \cdot t_{обл})] \qquad (8)$$

Здесь $N_A = 6{,}02 \cdot 10^{23}$ – число Авагадро;

σ – сечение (n,γ)-реакции для исходного изотопа, рассчитывается как $\sigma = 10^{-24}$ см$^2 \cdot \sigma_0$ (σ_0, выраженное в бн (барн);

F – плотность потока нейтронов (число частиц $\times 10^{12}$/(см$^2 \cdot$ с),

n_γ – квантовый выход (число фотонов) на распад радиоактивного изотопа.

В формулах (7) и (8) удобно время и величину $T_{1/2}$ измерять в сутках. Подставляя выражение (8) в основную расчетную формулу (7), получаем

$$m = [1{,}66 \cdot 10^{-12}] \cdot (M/\theta) \cdot A_\gamma / \{f \cdot \sigma_0 \cdot n_\gamma \cdot [1 - \exp(-\lambda \cdot t_{обл})] \cdot \exp(-\lambda \cdot t_p)\} \quad (9)$$

Если необходимо связать ожидаемую гамма-активность с массой активируемого элемента, то формулу (9) следует переписать в следующем виде:

$$A_\gamma = 6{,}02 \cdot 10^{11} \cdot (m \cdot \theta/M) \cdot f \cdot \sigma_0 \cdot n_\gamma \cdot [1 - \exp(-\lambda \cdot t_{обл})] \cdot \exp(-\lambda \cdot t_{p.}) \quad (10)$$

При измерении на γ-спектрометре определяется как величина начальной гамма-активности A_γ, так и полное число γ-распадов N_γ за время измерения Δt. Связь между N_γ и A_γ задается формулой:

$$N_\gamma = A_\gamma \cdot [1 - \exp(-\lambda \cdot \Delta t)]/\lambda \text{ или } A_\gamma = N_\gamma \cdot \lambda / [1 - \exp(-\lambda \cdot \Delta t)] \quad (11)$$

Для рассматриваемых в качестве примера в настоящих методических рекомендациях радиоактивных изотопов ^{110m}Ag, ^{75}Se и ^{46}Sc значения постоянной распада λ малы (табл. 1) и при практически реализуемых временах измерения гамма-активности (порядка 1 ч – нескольких часов) показатель степени в формуле (11) мал и экспоненту можно с высокой точностью разложить до первых двух членов, и тогда получаем соотношение

$$N_\gamma \cong A_\gamma \cdot \Delta t \quad (12)$$

При относительно малых A_γ (порядка 1Бк или меньше) необходимо выбрать время Δt измерения достаточно большим, чтобы, получив относительно большое число N_γ, иметь в результате достаточно малую статистическую ошибку измерений. Расчет ошибки измерения и доверительного интервала при этом выполняют как указано в п. 5.3.4.

Таким образом, в «абсолютном» методе количество элемента определяется по измеренному числу γ-распадов N_γ на γ-спектрометре и по задаваемой плотности потока нейтронов F. Все остальные величины берутся из таблиц ядерных данных. Формулы (7) и (8) справедливы для постоянной во времени плотности потока нейтронов. Если используется

источник с переменной (нестабильной) во времени t плотностью потока $F(t)$, то для вычисления величины $A_{г.-м.}(t_{обл})$ должна использоваться более сложная формула:

$$A_{г.-м.}(t_{обл}) = N_{Ав} \cdot \sigma \cdot \lambda \cdot \exp(-\lambda \cdot t_{обл}) \cdot \int_0^{tk} dt \cdot F(t) \cdot \exp(\lambda \cdot t), \text{ где} \qquad (13)$$

$tk \equiv t_{обл}$.

Недостаток абсолютного метода измерений – возможные его неточности, обусловленные нестабильностью потока нейтронов, неточностью знания величины сечения σ, и неточностями измерений абсолютных значений величины N_γ. Величина сечения нейтронного захвата сильно зависит от энергии нейтронов, в том числе и в зоне «тепловых» энергий, причём указанная зависимость может иметь сложный, немонотонный характер. Из-за указанных проблем получения точных результатов «абсолютный» метод в практике биологических измерений используется очень редко. Однако он используется при планировании измерений по методу эталонов, позволяя расчетным путем выбрать оптимальные характеристики обоих этапов измерения: время экспозиции образца в потоке тепловых или быстрых нейтронов, время измерения на γ-спектрометре для заданных свойств исследуемого образца.

5.4.3. Применение «метода эталонов»

В этом методе одновременно с анализируемым образцом облучается и стандартный образец (СО) с точно известным количеством исследуемого элемента и максимально приближенной к анализируемому образцу геометрией. Искомое содержание этого элемента m_x в исследуемом образце определяется по простой формуле:

$$m_x = m_э \cdot \frac{A_{\gamma x}}{A_{\gamma э}}, \text{ где} \qquad (14)$$

$m_э$ – известное количество элемента в СО;

$A_{\gamma x}$ ($A_{\gamma э}$) – измеренная гамма-активность в исследуемом (стандартном) образце.

Такой метод измерений позволяет рассчитывать на достаточно высокую его точность. В нем отсутствуют те проблемы с точностью измерений, которые описаны выше в абсолютном методе.

В «методе эталонов» нет необходимости знать точно плотность потока нейтронов, и отсутствует требование к постоянству его интенсивности во времени.

В «методе эталонов» особое требование предъявляется к приготовлению стандартного образца. Прежде всего, это требование относится к надежному и точному установлению количества искомого элемента или искомого вещества в СО. Кроме того, в зависимости от ожидаемых результатов эксперимента с исследуемыми образцами, рекомендуется приготавливать СО с содержанием искомого элемента (вещества), в той или иной степени близкого к ожидаемому его содержанию в исследуемом образце. В частности, при ожидаемом измерении очень малых содержаний искомого элемента (вещества) в исследуемом образце, например, на уровне единиц нанограммов, рекомендуется приготовлять СО с подобным низким содержанием этого элемента (вещества). При относительно большом содержании искомого элемента в СО его совместное облучение в потоке нейтронов с исследуемым образцом с очень низким содержанием элемента потребуется достаточно длительное время облучения. Это может вывести активность СО за пределы МЗА.

Приложение 1

Основные обозначения и сокращения

ДИ – доверительный интервал
МЗА – минимально значимая активность
МРИ – метод радиоактивных индикаторов («меченых атомов»)
НАА – нейтронно-активационный анализ
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ПБ – Пейеровы бляшки
СО – стандартный образец
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
A – радиоактивность, единицы измерения – беккерель (Бк)
CAS – идентификационный номер химического соединения
E – энергия (нейтронов или квантов электромагнитного излучения)
HEPA – высокоэффективный воздушный фильтр
LD_{50} – доза, отвечающая 50 %-й летальности
m – масса наноматериала в образце
N – число импульсов, зарегистрированных прибором
$T_{1/2}$ – период полураспада
λ – постоянная распада
σ – среднеквадратичное отклонение

Приложение 2

Термины и определения

Образец – исследуемый фрагмент подопытного животного, то есть орган, образец ткани, крови и т. д. в виде и объёме, пригодном для проведения измерений на приборах, определяющих интегральную массу исследуемых наночастиц в образце.

Препарат (для введения) – заданный объем радиопрепарата, упакованный в ампулы, прошедший гомогенизацию ультразвуком и при необходимости содержащий поверхностно-активные вещества стабилизаторы.

Радиопрепарат – (в данном случае) водная дисперсия с заданной массовой концентрацией исследуемых меченых наночастиц в деионизованной воде, с измеренными размерами наночастиц, и известной удельной активностью (по гамма-линии радионуклида-метки).

Радиоактивные индикаторы (синоним – меченые атомы) – искусственные радиоактивные изотопы с характерным ядерным излучением, обладающие достаточно большим периодом полураспада для его использования как метки исходного изотопа в разного рода небиологических и биологических материалах; получаются в ядерных реакциях (чаще всего в реакциях нейтронного захвата при облучении исходного природного изотопа в потоке нейтронов).

Стандартные образцы (в данном случае) образцы – искусственно созданные образцы небиологической природы, содержащие точно известную дозу радиопрепарата для калибровки измерений.

Метод радиоактивных маркеров – (синоним – метод меченых атомов), в данном случае метод определения количественного содержания элемента, вводимого (в составе исследуемого вещества) в организм подопытного животного, основанный на предварительной трансмутации некоторой известной доли атомных ядер вводимого элемента в радиоактивный изотоп (радиоактивный индикатор) с характеристическим гамма излучением.

Реперный исходный изотоп – один из возможных природных изотопов исследуемого элемента, для которого возможно получение радиоактивного изотопа с подходящими для гамма-спектрального анализа свойствами при облучении в потоке нейтронов.

Абсолютный метод – метод измерения содержания элемента в исследуемом образце, при котором определение массового содержания искомого элемента в исследуемом образце производят расчетным методом по свойствам изотопа-мишени и активированного радиоактивного

изотопа, измеренной на гамма-спектрометре гамма-активности радиоактивного изотопа в образце, величине плотности потока нейтронов во время сеанса облучения и других параметров.

Метод эталонов – метод измерения содержания элемента в исследуемом образце, при котором определение массового содержания искомого элемента в исследуемом образце производят по отношению измеренных активностей исследуемого образца и стандартного образца с известным содержанием элемента после одновременного облучения образца и стандартного образца в потоке нейтронов.

Приложение 3

Рекомендуемая литература по радиоизотопным методам исследования наноматериалов

1. База ядерных данных МАГАТЭ: gost.e-ecolog.ru 'ork/Nuclear Data Service.

2. Бузулуков Ю. П., Гмошинский И. В., Демин В. Ф. и др. Экспериментальные исследования токсикокинетики наночастиц серебра в организме лабораторных крыс методом радиоактивных индикаторов /В сб. материалов III евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010», 21—25 июня 2010 г., г. Москва. Т. 3. С. 238—239.

3. Кузнецов Р. А. Активационный анализ. М.: Атомиздат, 1974, 343 с.

4. Машкович В. П., Кудрявцева А. В. Защита от ионизирующих излучений: Справочник. Энергоатомиздат, 1995. 496 с.

5. Распопов Р. В., Бузулуков Ю. П., Демин В. Ф. и др. Изучение биодоступности наночастиц оксида цинка методом радиоактивных индикаторов //Вопросы питания. 2010. № 6. С. 32—38.

gost.e-ecolog.ru