

## Об экспресс-методе прогноза возможного канцерогенного влияния нерастворимых наночастиц на организм

Б. Т. Величковский

Российский государственный медицинский университет, г. Москва

В связи с активным развитием производства и применения наноматериалов появилась новая актуальная задача — определение потенциального вреда наночастиц для здоровья человека. Подобный вред, по-видимому, возможен. В эксперименте на животных установлен высокий уровень задержки наночастиц в легких, а также способность проникать через аэрогематический барьер в ткани организма. При введении в кровь они преодолевают гематоэнцефалический барьер и откладываются в мозгу. В модельных клеточных опытах наночастицы-фуллерены могут повреждать молекулу ДНК — изогнуть, «расплести», разрезать.

К наноматериалам и наноструктурам относят разнообразные объекты, величина которых хотя бы в одной из трех размерностей меньше 100 нм (1 нанометр — миллиардная доля метра). Они могут быть трехмерными (фуллерены, нанокристаллы), двумерными (нанотрубки), одномерными (нанопленки). По происхождению различают два вида наноструктур: природные и искусственные. К природным наноструктурам относятся наиболее малые разновидности вирусов, молекулы ДНК. Искусственные наноструктуры создаются на основе современных наукоемких технологических процессов. Крупномасштабное производство наночастиц основано на трех механизмах их образования: конденсации из газовой фазы, осаждения из коллоидного раствора и дезинтеграции твердого вещества. Кроме полезных нанопродуктов, в ряде производств возникают побочные техногенные наночастицы. Они содержатся в дымах металлургических и химических предприятий, в выхлопных газах бензиновых и дизельных двигателей, в аэрозолях конденсации, образующихся при газо- и электросварочных работах. К слову сказать, первичные размеры частиц табачного дыма обычных сигарет целиком располагаются в области нановеличин.

Ведущими в характеристике наночастиц являются свойства поверхности. От них зависит их стабильность и реакционная способность, полупроводниковые, магнитные, оптические и механические свойства, а также особенности биологического действия. Трудные проблемы для медицины создают как уникальные свойства, так и значительное разнообразие наночастиц. В настоящее время наиболее широкое практическое применение имеют две их группы. В количественном отношении пальма первенства принадлежит, по-видимому, углеродным наночастицам. Самая известная из них — фуллерен. Это молекула углерода, состоящая из 60 атомов. По виду она похожа на футбольный мяч, сшитый из правильных многоугольников. Другая многочисленная разновидность — нанотрубки из правильных углеродных шестиугольников, с соотношением длины к диаметру больше 3:1. Ту и другую разновидность углеродные наноструктур отличает механическая прочность, превышающая прочность стали, химическая инертность, электропроводность, каркасное (полое внутри) строение, нередко с толщиной стенки в одну молекулу. Вторую группу, имеющую широкое коммерческое применение, составляют наночастицы оксидов металлов, преимущественно  $TiO_2$ ,  $ZnO$ ,  $Al_2O_3$ . Они обладают каталитическими, полупроводниковыми и другими уникальными свойствами и используются в микроэлектронике, энергетике, химической, пищевой и парфюмерно-косметической промышленности.

Чрезвычайно высокая поверхностная энергия наночастиц обуславливает их почти мгновенную коагуляцию в воздухе рабочей зоны и образование крупных достаточно быстро оседающих хлопьев. Наглядно воздушную коагуляцию наночастиц демонстрирует процесс образования табачного дыма, благодаря которому он и становится виден. Для наночастиц весовой метод определения их содержания в воздухе абсолютно непригоден. Любые варианты счетного метода также недостаточно информативны. Наиболее перспективны, вероятно, устрой-

Величковский Борис Тихонович — д. м. н., академик РАМН, Российский государственный медицинский университет.

ства, основанные на высокой адсорбционной способности наночастиц. Например, могут быть использованы приборы, фиксирующие изменение стандартной концентрации светящегося газообразного эталонного вещества в измерительной камере, при прохождении через нее воздушного потока с наночастицами.

Президиум РАМН среди 5-ти наиболее актуальных направлений изучения нанотехнологий выделил исследования:

- фундаментальных аспектов взаимодействия наночастиц с клеточными и субклеточными структурами организма;
- проблемы безопасности при разработке и использовании нанотехнологий и наноматериалов.

С 1 декабря 2007 года введены в действие методические рекомендации по «Оценке безопасности наноматериалов», утвержденные руководителем Роспотребнадзора, Главным санитарным врачом РФ, академиком РАМН Г. Г. Онищенко. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единого, научно-обоснованного подхода к оценке безопасности наноматериалов на этапах разработки, экспертизы и государственной регистрации подобной продукции. В них для изучения взаимодействия наночастиц с биологическими макромолекулами и клеточными мембранами и для выяснения возможность проникновения через биологические барьеры рекомендованы следующие 13 методов:

- атомно-силовая микроскопия;
- сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия;
- светооптическая флуоресцентная микроскопия;
- светооптическая конфокальная микроскопия;
- спектрометрия деполяризации флуоресценции;
- спектрометрия кругового дихроизма;
- спектрофлуориметрия;
- ЯМР- спектроскопия;
- ЭПР-спектрометрия;
- масс-спектрометрия;
- метод радиоактивных индикаторов;
- аналитическое ультрацентрифугирование;
- жидкостная хроматография высокого разрешения.

У большинства медицинских организаций профилактической направленности нет подобного оснащения, отсутствуют специалисты, могущие эксплуатировать перечисленные приборы. Поэтому пока необходимо опираться на накопленные ранее данные и на те методы исследования, которыми они в свое время были получены. Такие сведения в методических ре-

комендациях, к сожалению, отсутствуют. К тому же, по своей структуре они ориентированы в основном на оценку наноматериалов, попадающих в организм *per os*.

Для предварительной характеристики особенностей биологического влияния наночастиц на организм следует получить представление о том, каков механизм взаимодействия их поверхности с окружающей средой. Химия поверхности твердых тел вообще представляет собой одну из важнейших проблем естествознания и техники. В ходе эволюции легкие приспособились к борьбе с возбудителями инфекции дыхательных путей и в меньшей степени оказались подготовленными к воздействию неорганических микрочастиц. При контакте возбудителя инфекции, иммунного комплекса или пылевой частицы с мембраной фагоцита так интенсивно повышается уровень потребления кислорода, что это явление получило название «дыхательного взрыва». Например, при активации макрофагов частицами кварца потребление кислорода увеличивается в 4 раза, частицами угольной пыли или диоксида титана — в 1,5 раза. Практически весь дополнительно поглощенный кислород не используется ни на энергетические, ни на пластические нужды клетки. Особая ферментная система фагоцитов, встроенная во внешнюю клеточную мембрану, НАДФ.Н-оксидаза, изменяет электронную структуру молекулы кислорода, превращая его в главное оружие бактерицидной защиты клетки — активные формы кислорода (супероксидный анион-радикал и пероксид водорода). В бактерицидной защите органов дыхания принимает участие и оксид азота. NO\* — газ, обладающий свойствами свободного радикала, благодаря непарному электрону на внешней орбитали молекулы. Оксид азота синтезируется фагоцитами из аминокислоты аргинина ферментом NO-синтазой. Таким образом, первичный ответ организма на действие нерастворимых частиц стереотипен и заключается в мобилизации неспецифических бактерицидных систем фагоцитов.

Основываясь на опыте изучения биологического действия различных субмикроскопических аэрозолей конденсации можно выделить пять типов биологически значимых межмолекулярных взаимодействий поверхности наночастицы с мембраной фагоцита..

К первой группе относятся наночастицы симметричного внутреннего строения, для которых контакт поверхности с окружающей средой обусловлен самым универсальным неспецифическим слабым межмолекулярным взаимодействием, вызываемым флуктуациями электронов в пограничном слое частицы. К этой группе относятся углеродные наночастицы с

абсолютно однородной, чистой поверхностью. Количество таких наноструктур невелико. При их фагоцитозе наблюдается наиболее «физиологичный» механизм гибели кониофага. Клетка, поглотившая большое количество таких частиц, длительное время остается жизнеспособной и подвижной, увеличивается в объеме. Происходит типичная «рабочая» гипертрофия кониофага на внутриклеточном уровне. Гипертрофированные кониофаги, естественно, нуждаются в потреблении повышенного количества кислорода. Однако с увеличением размеров клетки отношение площади ее поверхности к объему прогрессивно снижается, поскольку масса клетки возрастает пропорционально кубу, а поверхность — квадрату линейных размеров. Поэтому в расчете на единицу массы потребление кислорода уменьшается, нарушается режим работы митохондрий, и в конце концов клетка погибает. В медицине труда указанный сценарий наблюдается при воздействии низкоцитотоксичной пыли алмаза.

Все современные технологии получения углеродных нанотрубок требуют применения металлических катализаторов, следы которых загрязняют их поверхность. В состав катализаторов чаще всего входят Co, Ni, Fe и их сочетания. Наночастицы, содержащие в пограничном слое ионы железа или других переходных металлов, составляют вторую, биологически значимую группу. Когда наночастицы содержат в пограничном слое ионы переходных металлов, то на таких каталитических центрах происходит вторичная трансформация бактерицидных продуктов, образованных активированными фагоцитами. При этом возникает наиболее агрессивный из всех свободных радикалов — гидроксильный радикал  $\text{OH}^\bullet$ , который запускает цепную реакцию перекисного окисления липидов клеточных мембран и может вызвать окислительное повреждение молекул РНК и ДНК. Подобным механизмом биологического действия обладают волокнистые пылевые частицы асбеста, содержащие в пограничном слое катионы железа.

К третьей группе относятся наночастицы, также содержащие в пограничном слое катионы металлов, но способные покидать ее и переходить в тканевую жидкость. Там ионы металлов — аллергенов способны связываться с белковыми молекулами и вызывать аллергическую реакцию. В обыденной жизни типичным примером подобного действия являются аэрозоли полиметаллических руд.

Четвертую группу составляют наночастицы с гидратированной поверхностью, облада-

ющей способностью к специфическим электростатическим взаимодействиям, ориентированным в пространстве за счет образованию водородных связей (А-ОН...В). Классическим образцом вещества с подобной поверхностью служит кремнезем. Кварцевая пыль даже в вакууме в считанные минуты адсорбирует остаточные молекулы воды, образуя состоящую из силанольных групп (Si-OH) гидроксильрованную поверхность. Именно такая поверхность, покрытая силанольными группами, обуславливает химическую инертность и устойчивость кремнезема в условиях земной атмосферы

Последнюю группу составляют наночастицы, поверхность которых способна к межмолекулярным взаимодействиям за счет электростатического связывания, обусловленного неравномерным распределением электронной плотности на поверхности излома, создающим неориентированный в пространстве суммарный эффективный заряд частицы. Чем выше дзета-потенциал такой частицы, тем больше ее способность активировать фагоциты.

Таким образом, наиболее малоопасное воздействие на организм присуще лишь одной из пяти групп наночастиц, отличающейся самым слабым электростатическим взаимодействием с клеточной мембраной, обуславливающим достаточно физиологичный тип активации фагоцитов. Он характеризуется постепенным нарастанием, низким уровнем и медленным затуханием хемилюминесцентного свечения клеток. Для всех остальных групп наночастиц, обладающих сильными вариантами межмолекулярных взаимодействий, биологические эффекты более выражены. Все они должны рассматриваться как потенциальные канцерогены.

Наиболее быстрым, информативным, простым и относительно дешевым способом обнаружения характера воздействия наночастиц на фагоциты является хемилюминесцентный метод исследования. Хемилюминометры выпускаются отечественной приборостроительной промышленностью и стоят значительно дешевле любого из приборов, обозначенных в методических рекомендациях Роспотребнадзора «Оценка безопасности наноматериалов». Поэтому хемилюминесцентный метод следует дополнительно внести в указанные рекомендации. Все варианты хемилюминесцентного исследования нерастворимых микрочастиц тщательно разработаны и опубликованы. В частности, одной из последних таких публикаций является методическое пособие «Методы определения влияния фиброгенной пыли на организм в эксперименте и клинике». М., 2003.