

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Інститут високих технологій

Завідувач кафедри нанофізики конденсованих середовищ

проф. Валерій Антонович Скришевський

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2021 р.

**Дослідження вмісту окремих макро- і мікроелементів у біологічних
тканинах щурів за хронічного навантаження організму наноматеріалами**

TiO₂ та ZnO

Випускна кваліфікаційна робота магістра

студентки напряму підготовки

105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

Романенко Катерини Володимирівни

Науковий керівник, к.ф.-м.н., асистент

кафедри молекулярної біотехнології

та біоінформатики

Войтешенко Іван Сергійович

Оцінка захисту роботи

КИЇВ-2021

РЕФЕРАТ

Випускна кваліфікаційна робота магістра: с. 36, рис. 9, діаграм 7, 1 додаток, 17 джерел.

Наведено результати експериментальних досліджень характеристичних спектрів зразків шерсті та крові щурів. В дослідженнях використовувався рентгенофлуоресцентний метод. Для більш точного аналізу рентгенофлуоресцентних спектрів було вдосконалено відповідне програмне забезпечення. В результаті на основі отриманих даних визначено вміст елементів Ti та Zn за хронічного навантаження наночастинка TiO₂ та ZnO за допомогою спектрометра виробництва ТОВ "ЕЛВАТЕХ.

Ключові слова: ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ СПЕКТР, ХАРАКТЕРИСТИЧНЕ РЕНТГЕНІВСЬКЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ, МІКРОЕЛЕМЕНТ, ЗРАЗОК КРОВІ ТА ШЕРСТІ, НАНОЧАСТИНКА, НАКОПИЧЕННЯ.

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Огляд літератури.....	5
1.1. Фізичні основи рентгенівської флуоресценції.....	5
1.2. Рентгенофлуоресцентний аналіз (РФА).....	8
1.3. Відомості про наноматеріали TiO_2 та ZnO	12
2 Експериментальна частина.....	14
2.1. Опис експериментальної установки.....	14
2.2. Методика пробопідготовки.....	17
2.3. Розділення аналітичних ліній Ва та Ті.....	19
2.4. Експериментально отримані дані.....	22
Висновки.....	32
Перелік літератури.....	33
Додаток А.....	35

ВСТУП

Одиним з ключових напрямків сучасної промисловості є розробка методів синтезу і дослідження фізико-хімічних та біологічних властивостей наноматеріалів, зокрема наночастинок оксидів металів, з метою їх ефективного використання у біосенсоричі, біотехнології, фармакології тощо. За визначенням Європейської комісії (2011 р.), наноматеріали – це природній або штучно виготовлений матеріал, який містить частинки в незв'язаному стані, у вигляді агрегатів або агломератів, де не менше, ніж 50% часток мають розмір у діапазоні 1-100 нм.

Діоксид титану (TiO_2) – найбільш вживаний промисловий барвник білого кольору. Зокрема, він широко використовується для надання забарвлення харчовим продуктам, косметичним і гігієнічним засобам, наномедичним реактивам, фармацевтичним засобам (добавка з шифром E171); причому близько третини від обсягу TiO_2 харчового призначення є нанорозмірним. [8]

Оксид цинку (ZnO), натепер, активно використовують у промисловому виробництві (при виробництві пластмас, пігментів, гуми тощо), втім його також застосовують у косметології та харчових технологіях (з метою надання продуктам антибактеріальних властивостей). Вивчення впливу оксиду цинку на організм людини є одним з найпопулярніших предметів в науці. [9]

Проте, маємо достатньо переконливих даних, які свідчать про цитотоксичність і органотоксичність оксидів металів за їх надходження в організм у нанорозмірних формах. Як відомо, порушення в організмі може супроводжуватись зміною концентраційних градієнтів окремих іонів, у зв'язку з цим **метою нашої роботи** було здійснити дослідження вмісту окремих макро- і мікроелементів у біологічних тканинах щурів за хронічного навантаження організму наноматеріалами TiO_2 та ZnO сучасними фізичними мультиелементними методами рентгенофлуоресцентного аналізу (РФА).

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Фізичні основи рентгенівської флуоресценції

Будемо виходити із спрощених уявлень про атом як про структуру сферичних оболонок рис 1.1.

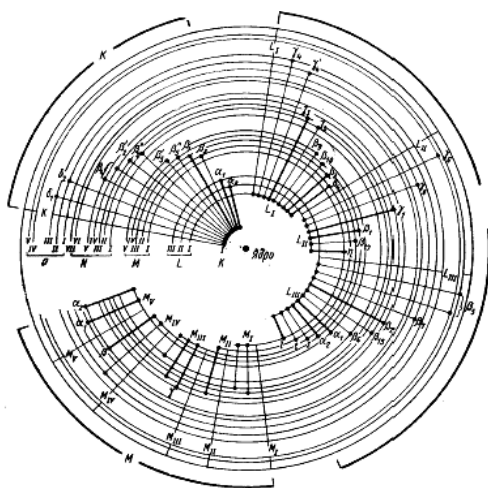


Рисунок 1.1 Модель Бора

Негативно заряджені атомні електрони зв'язані з позитивно зарядженим ядром силами електростатичної взаємодії. У відповідності з положеннями атомної фізики електрон може займати лише певні (дискретні) орбіти, що концентрично розташовані навколо ядра. Внутрішня, найближча до ядра оболонка вважається першою і т.д. В класичній теорії будови атома цей номер називають головним квантовим числом n .

Прийняте позначення оболонок: К ($n=1$), L ($n=2$), М ($n=3$), N ($n=4$), О ($n=5$) і т.д. (рис 1.2)

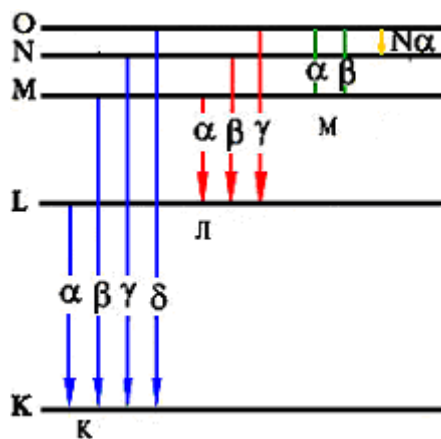


Рисунок 1.2. Схема рентгенівських переходів в атомі.

Вид елемента, його хімічні властивості визначаються структурою оболонок атомів. На кожній оболонці може знаходитися $2n^2$ електронів. Кожна електронна оболонка характеризується конкретним значенням енергії зв'язку електрона – мінімальною енергією, необхідною для перевodu електрона в стан, в якому на нього не діє притягання ядра. Енергія зв'язку для конкретної оболонки залежить від заряду ядра, тобто від атомного номеру Z , який також характеризує елемент. [16]

Флуоресценція, або вторинне випромінювання атома, виникає внаслідок видалення електрона з оболонки. Можливі два способи видалення, але для нас так зване резонансне збудження не представляє великого інтересу, в цьому випадку наш електрон отримує визначену енергію, що призводить до переходу електрона на більш високий, але все ще зв'язаний рівень. Значно важливіший для нас процес повного видалення електрона з атома. Видалення електрона з оболонки призводить до збудження атома, при якому його енергія є більшою енергії в стабільному стані. Атом знову намагається перейти в стабільний енергетичний стан. [2] Це здійснюється посередництвом переходу електронів з більш високоенергетичних рівнів на вакансію. Такі електронні переходи, завдяки дискретному характеру дозволених оболонок, припускають цілком визначену втрату енергії атомної системи. Закон збереження енергії виконується завдяки випромінюванню

енергії, еквівалентної різниці енергетичних рівнів оболонок, між якими здійснюється електронний перехід.

На рис.1.1 схематично показана більша частина електронних переходів, які можуть виникати з певною ймовірністю в результаті виникнення вакансій. Внаслідок багатократних переходів виникає спектр характеристичного випромінювання(рис 1.3). Лінії випромінювання мають різну інтенсивність (кількість частинок (фотонів) на одиницю площі в одиницю часу), що відповідає ймовірності електронних переходів.

На рис.1.1 більш жирним позначені лінії випромінювання, які зазвичай визначаються в спектрометрії. Для нас в першу чергу представляють інтерес спектри випромінювання, зобов'язані своїм виникненням утворенню вакансій на внутрішніх оболонках. Саме ці вакансії обумовлюють спектр характеристичного рентгенівського випромінювання. [17]

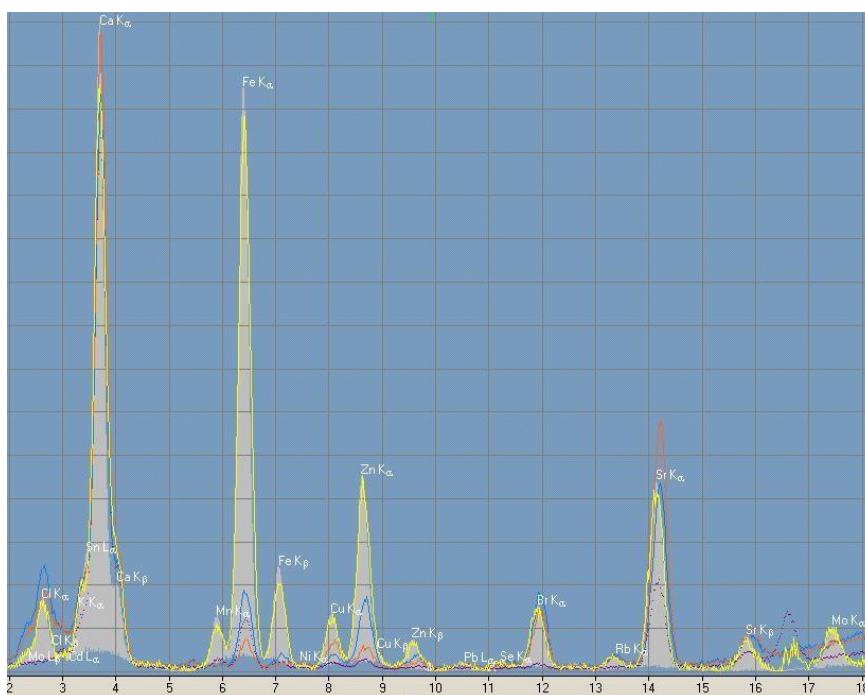


Рисунок 1.3 Спектр характеристичного випромінювання біопробу.

Аналіз на основі рентгенівської спектроскопії проводять двома способами, збуджуючи флуоресценцію за допомогою первинного джерела електромагнітного випромінювання (випромінювання рентгенівських трубок,

рентгенівське та гамма-випромінювання від радіоактивних речовин) або за допомогою джерела заряджених частинок (джерела електронів, протонів, α -частинок і т.д.). В даній роботі використовується перший із зазначених способів.

1.2. Рентгенофлуоресцентний аналіз (РФА)

Дослідження властивостей елементів, присутніх в різних середовищах в малих та надмалих концентраціях стали можливими лише з появою чутливих аналітичних методів, що дозволяють проводити кількісні виміри таких малих величин. Початок цих досліджень пов'язаний з розвитком методів активаційного аналізу. Основними є чотири методи аналізу, які дозволяють аналізувати вміст в зразку більшості елементів періодичної таблиці Менделєєва:

1. Метод атомно-абсорбційної спектрометрії з атомізацією в полум'ї (ААС в полум'ї);
2. Метод атомно-абсорбційної спектрометрії з атомізацією в графітовій кюветі (ААС в графітовій кюветі);
3. Метод атомно-емісійної спектроскопії із збудженням в індуковано-зв'язаній плазмі (ІЗП-АЕС);
4. Масс-спектрометричний метод з іонізацією в індуковано-зв'язаній плазмі (ІЗП-МС).

Вказані вище методи припускають проведення озолення на стадії пробопідготовки та переведення проб в рідкий стан. Для цього застосовуються муфельні печі або спеціалізовані автоклави. [16]

Найбільш доступними методами аналізу мікроелементів являються ААС в полум'ї та ААС в графітовій кюветі. Недоліком методів ААС являється необхідність збільшення об'єму проби та тривалості аналізу при збільшенні числа аналізованих елементів. Недоліком ІЗП-АЕС являється

його низька чутливість. Це обмежує можливість його використання або припускає введення в цикл пробопідготовки додаткової операції – концентрування проби, що в свою чергу, призводить до збільшення похибки вимірювання.

Найбільш інформативним методом аналізу з вище згаданих є ІЗП-МС. Всі ці методи є проборуйнуючими і жоден з них не дозволяє виявити вміст всіх мікроелементів в пробі одночасно. У зв'язку із зростанням вимог виробництва та досліджень до швидкості визначення складу речовини з'явилась необхідність в універсальному та недеструктивному засобі вимірювань. Поставленим вимогам задовольняє рентгено-флуоресцентний метод. [7]

Рентгенофлуоресцентний аналіз (РФА) – це один із найбільш використовуваних методів якісного та кількісного аналізу елементного складу сплавів в металургії та ювелірній промисловості, ґрунтів та мінералів в геології, археологічних об'єктів, зразків біологічного походження. Це неруйнівний метод аналізу, не вимагаючий спеціальної пробопідготовки. Цим методом можна досліджувати зразки різних типів: тверді, рідкі, порошкоподібні, осажені на поверхні або поглинуті фільтром. РФА – це мультиелементний метод дослідження, він дозволяє визначити значну кількість елементів за один цикл вимірювання. Звичайна чутливість рентгенофлуоресцентного аналізу для більшості елементів складає 1 ppm та дозволяє визначити концентрації елементів в діапазоні 0,0001% - 100%.

Метод РФА складається з трьох етапів:

- 1) збудження ліній характеристичного випромінювання атомів досліджуваних елементів в речовині (у зразку);
- 2) вимірювання їх інтенсивності;
- 3) перехід від інтенсивностей вимірюваних ліній до концентрацій даних атомів у речовині за допомогою калібрувальної процедури, яка враховує вплив матриці самої речовини. [7]

Для збудження атомів хімічних елементів в різних пробах використовують випромінювання рентгенівських трубок або радіоактивних ізотопів ^{109}Cd або ^{241}Am , іонізуючі атоми зразка (первинне випромінювання). При переходах атомів в початковий стан виникає вторинне характеристичне випромінювання, яке називають рентгенівською флуоресценцією. Для збудження рентгенівської флуоресценції необхідно, щоб енергія фотонів первинного випромінювання перевищувала енергію зв'язку електронів на внутрішніх оболонках атома. Для елементів з атомним номером $Z > 10$ ймовірність виникнення випромінювання (вихід флуоресценції) близька до 1, а для легких елементів ($Z < 10$) – вихід флуоресценції менше 0.1. Цей параметр в значній мірі визначає діапазон вимірюваних елементів методом РФА.

Рентгенівське випромінювання від різних елементів може розкладатися в спектр по довжинам хвиль або по їх енергіям. В залежності від цього розрізняють два типи аналізаторів:

- 1) аналізатори з хвильовою дисперсією;
- 2) енергодисперсійні аналізатори.

У першому випадку рентгенівське випромінювання за допомогою кристал-аналізатора (наприклад, $\text{LiF}(200)$) розділяється по довжинам хвиль таким чином, що кожній довжині хвилі відповідає визначений кут відбивання від поверхні кристалу.

Роздільна здатність цих приладів достатньо висока 140 - 160 eV для характеристичної лінії Fe ($K\alpha$). Для перетворення аналітичного сигналу спектрометра в кількісний вміст елементів використовують способи багаторазової (множинної) регресії та стандарт – фону. Ці способи вимагають використання на етапі побудови калібрувальної характеристики декількох зразків порівняння з відомим вмістом визначуваних елементів. Характерною особливістю приладів з хвильовою дисперсією це вузький діапазон співвідношення сигнал/фон. [6] Для усунення цього недоліку

використовують змінні кристал-аналізатори. Їх кількості варіюються в залежності від класу устаткування від 3 до 14.

В енергодисперсійних аналізаторах розділення характеристичних фотонів виконується у відповідності з їх енергіями. В цьому випадку детектор повинен мати кращу роздільну здатність, ніж газові пропорційні та сцинтиляційні детектори, що використовуються в спектрометрах з хвильовою дисперсією.

Для реєстрації рентгенівського випромінювання використовують напівпровідникові Si-pin детектори з термоелектричним охолодженням або Si(Li) детектори з охолодженням рідким азотом. Підсумковий спектр представляє собою розподіл інтенсивності характеристичного рентгенівського випромінювання як функції від енергії рентгенівських квантів. Використання вакуумної камери розширює діапазон визначуваних елементів до натрію та далі. [7]

Незважаючи на популярність методу в цілому ряді областей промисловості, його використання в медицині та біології поки ще обмежено.

Незважаючи на те, що РФА відноситься до методів з середньою чутливістю, діапазон медичних застосувань цього методу дуже широкий. Він дозволяє визначати нормальні концентрації ряду клінічно важливих елементів у волоссі/шерсті, крові та інших біосубстратах. Дозволяє знаходити забруднення організму важкими металами, а також ідентифікувати невідомі елементи.

Простота підготовки дозволяє протягом короткого часу провести розширені дослідження різних об'єктів. Для деяких важливих елементів (S, Cl, K, Ca, Br, I), визначення яких іншими методами ускладнене, використання РФА методу має перевагу.

До переваг рентгенофлуоресцентного аналізу слід віднести: недеструктивність, простоту пробопідготовки (без хімпрепаратів), широкий діапазон елементів, що визначаються (від бору до урану) та їх кількостей (від 100 до 10^{-4} мас.% і нижче), можливість проведення одночасного аналізу

всього спектру мікроелементів, що дозволяє не помилитися в їх співвідношеннях, а також експресність аналізу (декілька хвилин).

1.3. Відомості про наноматеріали TiO₂ та ZnO

Щодня типова людина в західному світі споживає в середньому 2,5 мг нерозчинного субмікронного діоксиду титану (TiO₂), враховуючи фракцію наночастинок. Основними джерела TiO₂ є: харчові добавки (E171), кондитерські вироби, фармацевтичні препарати, косметика та товари для здоров'я, наприклад, зубна паста. До 36% харчовий TiO₂ нанорозмірний.[3]

Харчова добавка TiO₂ всмоктується у ссавців після їх перорального прийому, але вплив на організм та локалізація накопичення є предметом вивчення та дослідження. Нещодавнє дослідження з використанням «низьких» доз (2,3 мг) TiO₂ наночастинок (в діапазоні від 107-360 нм гідродинамічного діаметра) показало, що у дорослих здорових щурів спостерігалось незначне збільшення Ti в печінці і селезінці, але в більшій кількості накопичується в мезентеріальних лімфатичних вузлах. [3] Дослідження у 1994 році показало, що 12,5 мг/щур перорально введеного TiO₂ розміром 500 нм може перетинати стінки кишківника і накопичуватися в печінці, селезінці і легенях, в той час як в 2014 році вчені виявили підвищений рівень Ti в селезінці і яєчниках щурів та спостерігалось пошкодження ДНК після перорального застосування TiO₂ дозою 2 мг/щура. [11] Радіоактивність зразків вимірювали методом променевої спектрометрії з використанням екранованих детекторів. TiO₂ виявився досить стабільним при впливі кислого середовища і середовищ з близьким до нейтрального рН. [12]

Одним з найбільш цікавих і перспективних металевих наноматеріалів є цинк (Zn) і його оксид (ZnO). Цинк - досить активний елемент і одночасно

сильний відновник; відповідно до свого відновного потенціалу він може легко окислюватися, утворюючи оксид цинку. [4] Цинк – один з найважливіших мікроелементів в організмі людини. Він міститься у всіх тканинах організму, тобто в м'язах і кістках (85% вмісту цинку в організмі), в шкірі (11%), розташований переважно в ядрі, цитоплазмі і клітинній мембрані. [5] Було показано, що цинк має вирішальне значення для правильного функціонування великої кількості макромолекул і ферментів, де він має як каталітичну (активний центр ферментів), так і структурну функцію.

Наночастинки ZnO можуть бути використані в промисловості як нанооптичні і наноелектричні пристрої, в харчовій промисловості і в медицині як протимікробні і протипухлинні засоби. Підвищена увага до нанооксидів цинку призвела до винаходів і розвитку методів синтезу наночастинок. Проте, не зважаючи на потенційно цікаву для науки протипухлинну активність наночастинок ZnO, доведено, що вони можуть бути також цитотоксичними і генотоксичними для декількох типів клітин людини (наприклад, нейрональних та епітеліальних клітин). З'являється все більше доказів того, що вільні іони цинку можуть спричинити, наприклад, деградацію нейронів. [10]

Було проведено кілька досліджень цитотоксичності наночастинок ZnO, вони показали, що наночастинки мають негативний вплив на дихальну систему людини, так як він може передаватися через альвеолярні епітеліальні клітини в легеневу тканину і викликають важкі легеневі запальні процеси. Вплив високої концентрації ZnO (5 мкг/мл) викликало збільшення секреції хемокінів (аналогічні результати були отримані для наночастинок TiO₂). [8] Це може означати, що наночастинки оксиду металу відіграють вирішальну роль в ініціюванні імунологічної реакції, викликаючи секрецію медіаторів запалення. Вони також можуть сприяти утворенню активних форм кисню і викликати окислювальний стрес, втручаючись в метаболізм клітин, пошкоджуючи ДНК. [14, 15]

Проте, необхідні подальші дослідження, щоб зрозуміти механізми дії, що лежать в основі токсичного впливу.

2 ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Опис експериментальної установки

Спектрометр енергій рентгенівського випромінювання СЕР-01 виробництва ТОВ “ЕЛВАТЕХ” складається з наступних компонентів (рис. 2.1):

- кремнієвий рентгенівський детектор;
- спектрометричний підсилювач;
- спектрометричний АЦП;
- блок керування та обробки інформації;
- керований блок живлення випромінювача (до 50 кВ) та випромінювач (рентгенівська трубка)
- блок живлення системи від мережі 220 В, 50 Гц.



Рисунок 2.1 Спектрометр енергій рентгенівського випромінювання СЕР-01.

Більш суттєво та наглядно структурну схему спектрометра можна представити так (рис. 2.2):

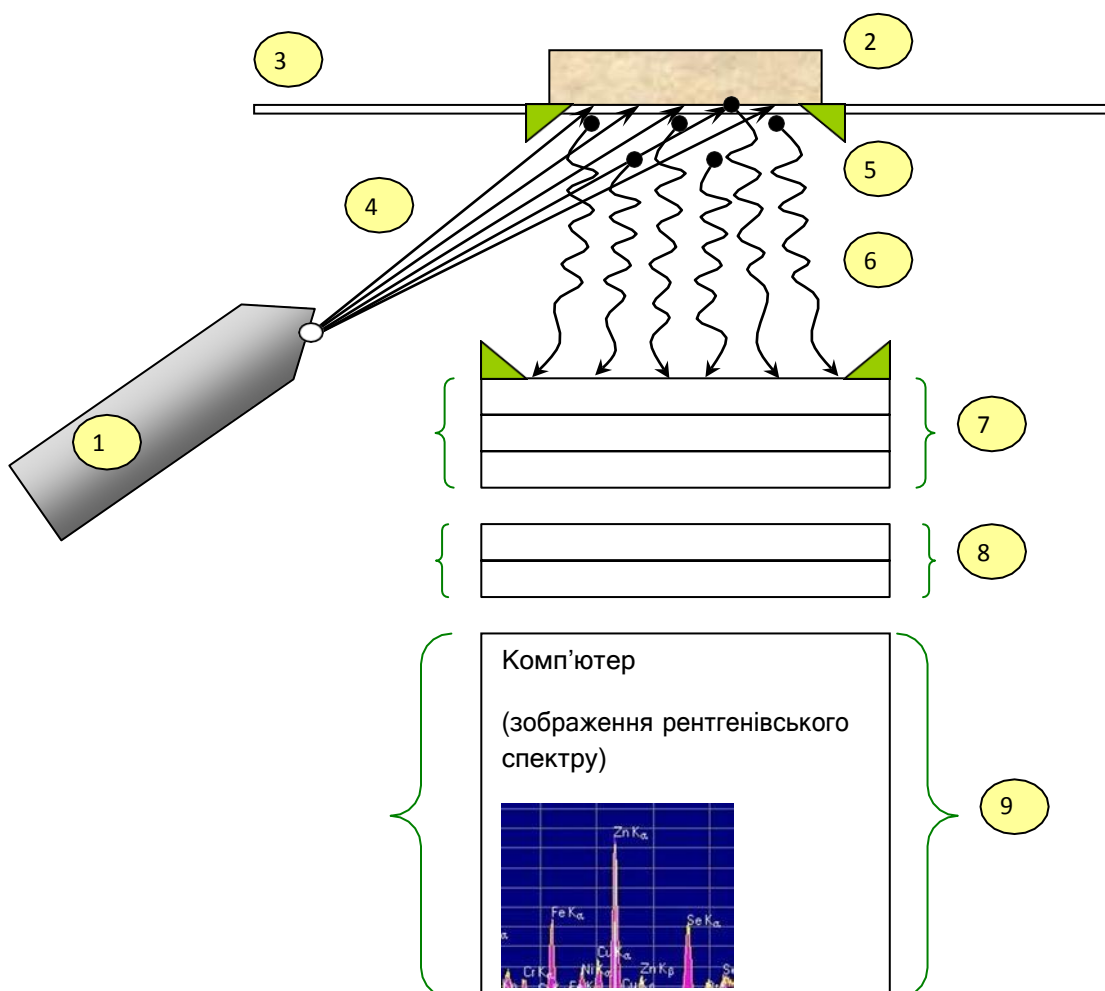


Рис. 2.2. Наглядна схема будови спектрометра (1 – рентгенівська трубка; 2 – досліджуваний зразок (біопроба); 3 – прозора предметна плівка; 4 – збуджуюче рентгенівське випромінювання (первинне); 5 – колімаційна система; 6 – флуоресцентне випромінювання (вторинне) ; 7 – детектор (р-і-п діод, попередній підсилювач, термоелектричний охолоджувач); 8 – аналізатор (спектрометричний підсилювач, аналогово - цифровий перетворювач); 9 – отриманий спектр рентгенівського випромінювання (на комп'ютері)).

Корпус аналізатора виконує функцію біологічного захисту від невикористаного розсіяного рентгенівського випромінювання, при цьому послаблюючи первинне та перерозсіяне випромінювання до біологічно-нешкідливого рівня.

Система аналізу рентгенівських спектрів виконує наступні **функції**:

- аналіз енергій вторинного рентгенівського випромінювання;
- вивід інформації про стан системи на вбудований дисплей;
- передача даних на комп'ютер через інтерфейс USB.

Вихідні параметри (аналізатор має один вимірювальний канал для аналізу рентгенівського випромінювання):

- робочий діапазон – 1-40 кеВ;
- роздільна здатність на лінії Mn (5.9 кеВ) не гірше 180 еВ;
- час встановлення робочого режиму не більше 15 хвилин.

Робочі параметри спектрометра:

- живий час – 600с;
- напруга рентгенівської трубки – 40000 В;
- струм рентгенівської трубки – 90 мкА.

Розглянемо роботу аналізатора: досліджувану пробу поміщають у вимірювальну камеру аналізатора. В камері проба опромінюється рентгенівським випромінюванням. Виникаюче вторинне (флуоресцентне)

рентгенівське випромінювання атомів проби, пройшовши через колімаційну систему, реєструється енергодисперсійним детектором. Детектор з попереднім підсилювачем перетворює енергію фотона в електричний імпульс, амплітуда якого пропорційна енергії фотона. Після імпульсного підсилювача-формувача імпульс поступає на вхід 12-ти розрядного АЦП. На виході АЦП формується двійковий код, значення якого пропорційне амплітуді імпульсу, а відповідно і енергії рентгенівського фотона, що прийшов. Сформований код визначає адресу ячейки буферної пам'яті, вміст якої збільшується при цьому на одиницю. Процес повторюється з кожною появою імпульсу на вході АЦП.

У випадку, якщо в період часу обробки сигналу від одного фотона (мертвий час) на вході підсилювача-формувача з'являється імпульс від наступного фотона, то обидва ці сигнали виключаються аналізатором імпульсів, при цьому мертвий час спектрометра збільшується. В результаті, під час експозиції (живий час) в буферній пам'яті аналізатора імпульсів формується початковий спектр рентгенівського випромінювання досліджуваної проби. Інформація з буферу автоматично пересилається в пам'ять комп'ютера та відображається на екрані монітору. Спектр також може бути роздрукованим на принтері або збереженим у вигляді файлу на вінчестері. Приклад робочого спектру зразка крові щура показано на рис.2.3.

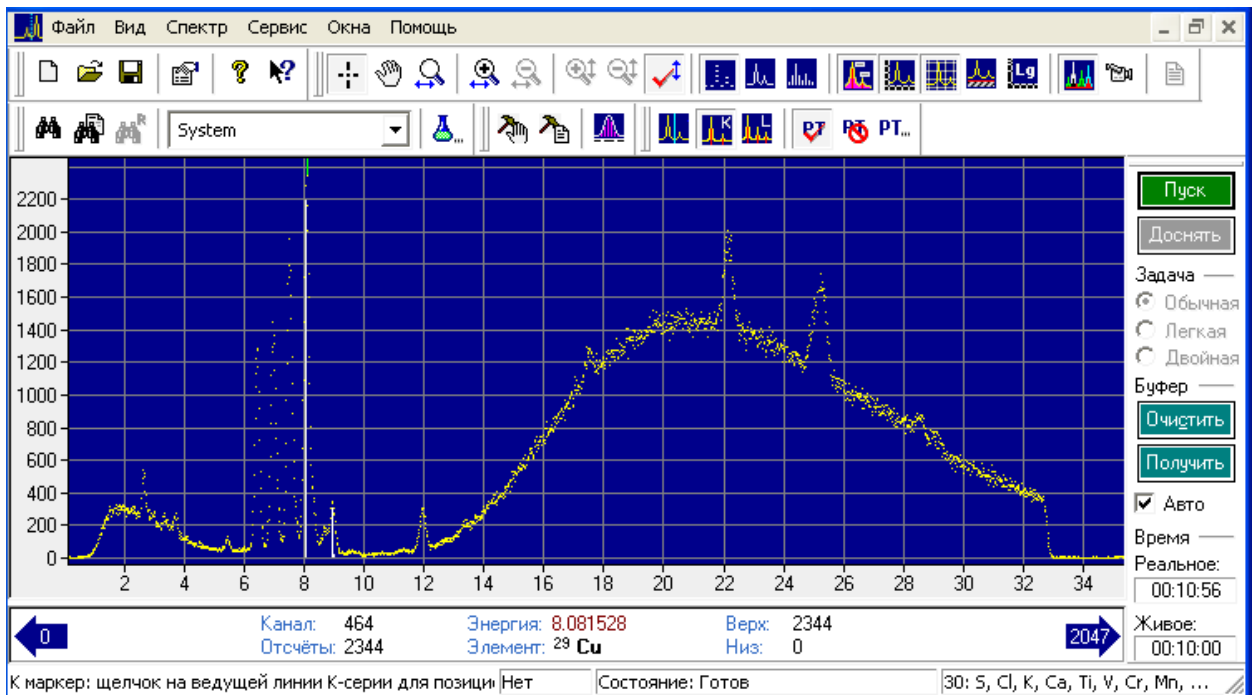


Рисунок 2.3 Робочий спектр зразка крові щура.

2.2. Методика прободготовки

Для дослідів *in vivo* використовували самиць щурів лінії Wistar 8-тижневого віку. Щурів утримували в стандартних умовах віварію (температура приміщення 20 ± 2 °C, відносна вологість 50-70%, цикл світло-темрява 12:12 годин).

Тварин ділили на 3 групи: група 1 – інтактні щури (7 тварин); група 2 – щури, які щодня протягом 6 місяців перорально отримували суспензію наночастинок ZnO із розрахунку 3 мг/кг/добу (7 тварин); група 3 – щури, щодня протягом 6 місяців перорально отримували суспензію наночастинок TiO₂ із розрахунку 0,1 мг/кг/добу (7 тварин).

Пероральну дозу нанорозмірного оксиду цинку (3 мг/кг/добу) було обрано у відповідності до протоколу [4] щодо вірогідних дозових меж цього наноматеріалу (>50 мг/людина/добу; у перерахунку на одиницю ваги – 0,7 мг/кг/добу), які можуть викликати його токсичні прояви.

За основу було взято протокол дослідження, який було розроблено раніше [3] на основі даних щодо середньостатистичного надходження

наночастинок TiO_2 з продуктами харчування у Великобританії (0,1 мг/кг щодобово).

Наночастинки TiO_2 (PlasmaChem GmbH, D-12489 Berlin, Germany; були люб'язно надані для досліджень завідувачем кафедри нанофізики конденсованих середовищ ІВТ, докт. фіз.-мат. наук, проф. В.А. Скришевським) використовували у формі нанопорошку (суміш рутилу і анатазу в співвідношенні 1:4), розмір частинок (21 ± 5) нм, питома поверхня (50 ± 10) $\text{м}^2/\text{г}$; чистота $> 99.5\%$, вміст $\text{Al}_2\text{O}_3 < 0.3$ мас.%; $\text{SiO}_2 < 0.2$ мас.%

У роботі також використовували комерційний препарат оксиду цинку ZnO (PlasmaChem GmbH, Berlin, Germany; були люб'язно надані для досліджень завідувачем кафедри нанофізики конденсованих середовищ ІВТ, докт. фіз.-мат. наук, проф. В.А. Скришевським) у формі нанопорошку; питома поверхня 19 ± 5 $\text{м}^2/\text{г}$; чистота $> 99.5\%$, середній розмір частинок 25 нм.

Для одержання гомогенної суспензії наночастинок наважку наноматеріалу диспергували в очищеній воді за допомогою ультразвукової обробки упродовж 2 хв на частоті 37 кГц. Наприклад, для тварини 8-тижневого віку наважку 1,1 мг ZnO ресуспендували в 15 мл води за умови середнього добового вживання води щурами цього віку 8-11 мл. Вагу тварин контролювали один раз на 3 дні для адекватного дозування наноматеріалу.

Акцент дослідження робиться на двох системах: зразки крові, як модель найбільш задіяної системи у транспортуванні речовин та обмінних процесах, а також волосяний покрив, як модельний об'єкт, що мало приймає участь у обміні речовин, але має властивості накопичення. Дослідження проводили упродовж шести місяців на самицях щурів лінії Wistar (початковий вік тварин становив 8 тижнів).

Процес формування зразка складається з наступних етапів:

1. Подрібнення шерсті за допомогою лабораторних ножиць та висушування крові у тефлоновій посудині;
2. Перетирання сухого залишку для крові;

3. Зважування проби – 50 мг;
4. Закапування проби розчином з органічного клею та ацетону;
5. Пресування таблетки.

Висушування плазми крові здійснювалося за допомогою шафи сушильної з регулятором температури в діапазоні 60°-135° С. Сухий залишок ретельно перетирився до утворення однорідної маси на млині лабораторному електричному ЕМ-ЗА ТУ 10-23, 99-88 Е. Для зважування використовувалися ваги лабораторні ВЛР-20 з межею зважування 20 г та границею сумарної похибки 0.1 мкг ГОСТ 24104-88. Для процедури викапування скористалися державними стандартними зразками ДСЗУ. Викапування проводилося піпеткою ГОСТ Р 50 444. Після цього кожну наважку висушують та пресують у таблетку за допомогою пресу з комплекту спектрометра.

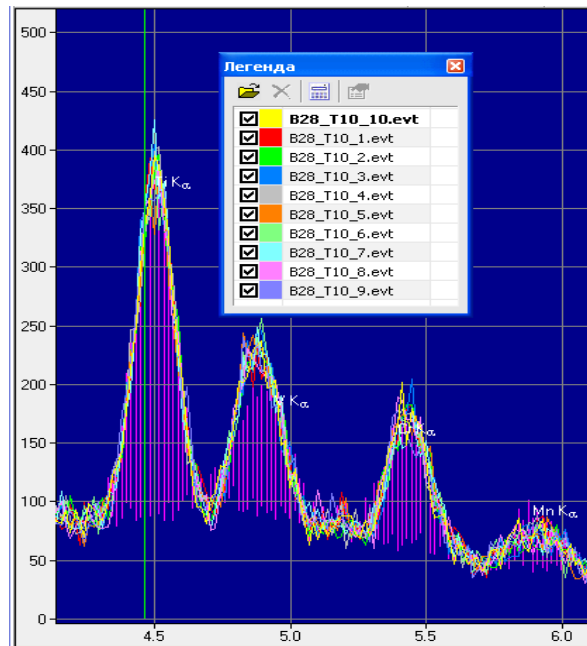
2.3. Розділення аналітичних ліній барію та титану.

У ході виконання обробки спектру характеристичного випромінювання для титану у ручному режимі було виявлено, що у пік титану по К α -серії робить вклад лінія барію по L α -серії. [16] При відомих нульових калібровочних коефіцієнтах без врахування барію, титан інтерпретується в одинадцять мкг, а з врахуванням вкладу – у п'ять мкг. Для того, щоб вірно інтерпретувати значення площі титану для подальших розрахунків необхідно розділити ці характеристичні лінії, що мають енергію в діапазоні 4.46-4.51 КеВ.

Для вирішення задачі було зроблено наступні кроки:

- виготовлено зразок масою 50 мг з перетертого фільтрувального паперу та виміряно його спектр – цей спектр нам потрібен як фоновий;

- виготовлено таблетку з фільтрувального паперу з додатковим введенням суміші елементів: Ва-28 мкг, Тi-10 мкг. В цьому випадку вони мають приблизно однакову спектральну вагу у діапазоні – 4.46-4.51 КеВ. На рис.2.4 представлена енергетична ділянка з спектральним розподілом



десяти вимірювань.

Рисунок 2.4. Енергетична ділянка з спектральним розподілом 10 вимірювань.

Стандартна обробка цих спектрів дає значення інтенсивності тільки $K_{\alpha 1}$ лінії Тi, а Ва зовсім не реєструється. Для вирішення цієї проблеми в середовищі Delphi була розроблена програма, яка здійснює експертизу наявності в спектрі цих елементів і по відомим критеріям проводить врахування їх взаємовкладу. Нижче наведено короткий опис алгоритму.

В отриманому характеристичному спектрі даного зразка перевіряємо наявність K_{α} лінії з енергією 32 КеВ, яка характерна для барію. У випадку наявності цієї лінії в спектрі знищується пік барію, а потім виконується ланцюг знаходження наступних елементів: Ag, Sn, I і Ва та виводиться істинне значення барію. У випадку ж відсутності в спектрі лінії барію вище

перераховані операції не виконуються. Далі виконується ланцюг визначення калію, кальцію і титану та виводиться значення титану. Виконання ланцюгів: Ag-Sn-I-Ba та K-Ca-Ti є необхідною операцією, оскільки характеристичні лінії по K_{α} -серії даних елементів саме в такій послідовності роблять певні внески у піки наступних елементів ланцюга. Блок-схема та текст програми представлено в додатку А.

На рис 2.5 представлено приклад роботи програми при послідовній обробці спектру, коли в залежності від наявності піку Ba в області 32 КеВ будується модель всіх L_{α} - ліній Ba в діапазоні 4.46 – 4.51 КеВ (правий рисунок, сірий спектр). На лівому рис 2.5 представлено результат роботи програми при остаточній побудові модельного спектру **Ti**. Видно що модельний спектр чудово повторює форму реального спектру. На цих рисунках червоним кольором відображено спектр зразку з чистого фільтру, блакитним – спектр таблетки з **Ba** та **Ti**, синім – спектр різниці перших двох спектрів, сірий – модельний спектр.

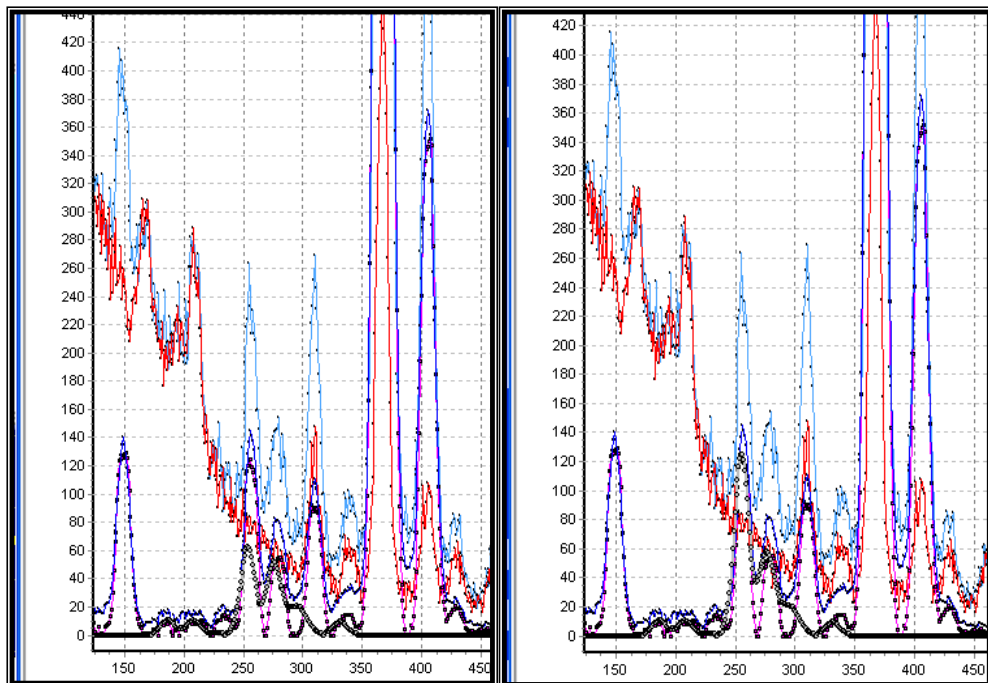


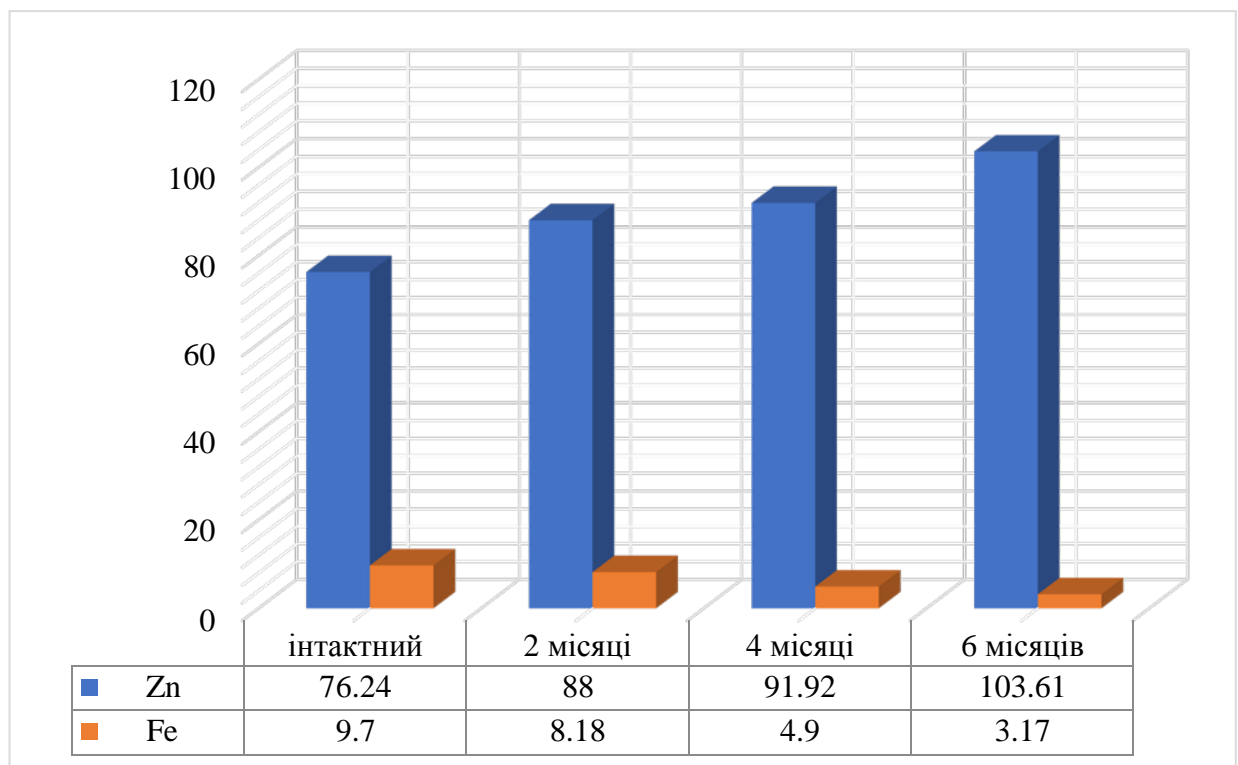
Рисунок 2.5. Приклад роботи програми при послідовній обробці спектру.

2.4. Експериментально отримані дані

При виконанні вимірювань необхідно дотримуватися наступних умов:

- температура навколишнього середовища (20 ± 5) С;
- атмосферний тиск від 84,0 до 106,7 кПа;
- відносна вологість повітря (при температурі 25 С) не більше 85 %;
- напруга в електричній мережі (220 ± 20) В;
- частота електричного струму в мережі (50 ± 1) Гц.

Вимірювання проводились протягом 6 місяців перорального годування щурів наночастинками ZnO та TiO₂. Для аналізу вмісту концентрації елементів Zn та Fe у шерсті щурів зріз волосяного покриву робили на 2 місяць, 4 місяць та 6 місяць. Було обрано такий період через властивість волосяного покриву збільшуватися у щурів до 1 сантиметру протяг двох місяців. Саме така довжина дає змогу зібрати необхідну кількість матеріалу для проведення вимірювань. Результати вимірювань представлені на діаграмі 2.1.



Діаграма 2.1. Концентрація елементів при хронічному навантаженні ZnO у шерсті першого щура (мкг/г).

Наведена діаграма показує те, що вміст Zn у зразках шерсті першого щура накопичується рівномірно кожні два місяці. Цікаво те, що зі збільшенням Zn спостерігалось пропорційне зменшення Fe, що є біологічно нормальним явищем. Елементи Zn та Fe є мікроелементами антагоністами. В свою чергу елемент заліза – має критичне значення для життя практично всіх відомих форм життя: від бактерій до людини. Залізо приймає участь у цілому ряді біологічних реакцій: транспорт електронів, транспорт та депонування кисню, участь у формуванні активних центрів окислювально-відновних ферментів(оксидази, гідроксилази), транспорт та депонування заліза (трансферин), участь у синтезі ДНК, діленні клітин, участь у метаболізмі гормонів мозкової речовини наднирників, участь у метаболізмі альдегідів. [5] Це доводить, що додаткове пероральне введення наночастинок ZnO впливає на організм тварини та накопичується, що спонукає до подальших досліджень саме впливу на кожний орган щура.

Для зразків шерсті на вміст Zn наведено фрагменти рентгенофлуоресцентного спектру, які відповідають саме пікам цього елемента (рис. 2.4). Бачимо, що величина площі під піком збільшується пропорційно до зростання концентрації елемента у пробі.

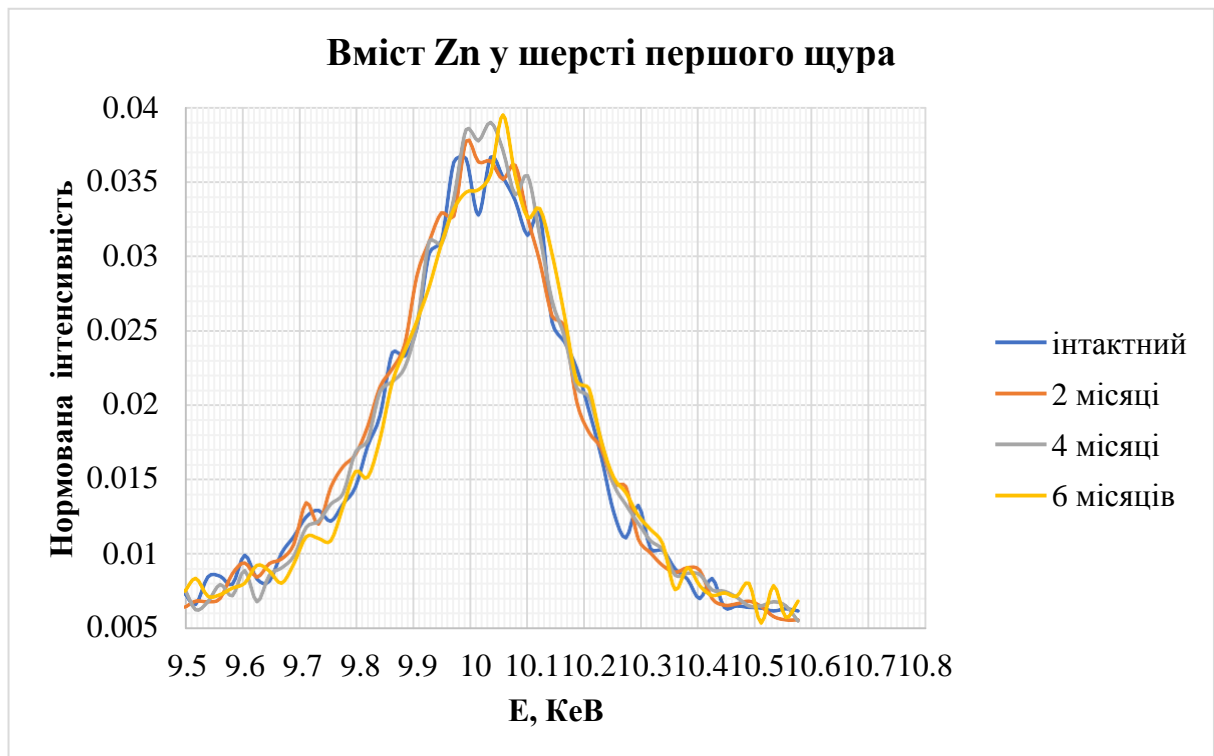
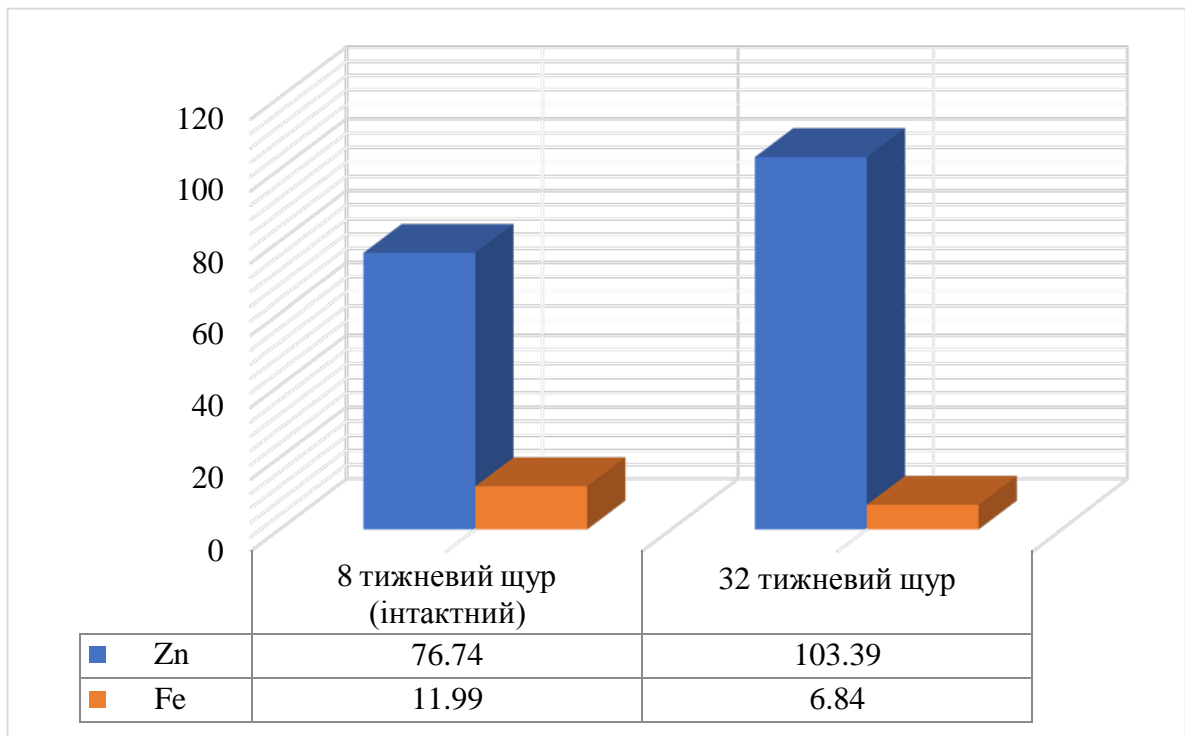


Рис. 2.4. Фрагмент рентгенофлуоресцентного спектру зразків при хронічному навантаженні ZnO, що відповідає пікам Zn.

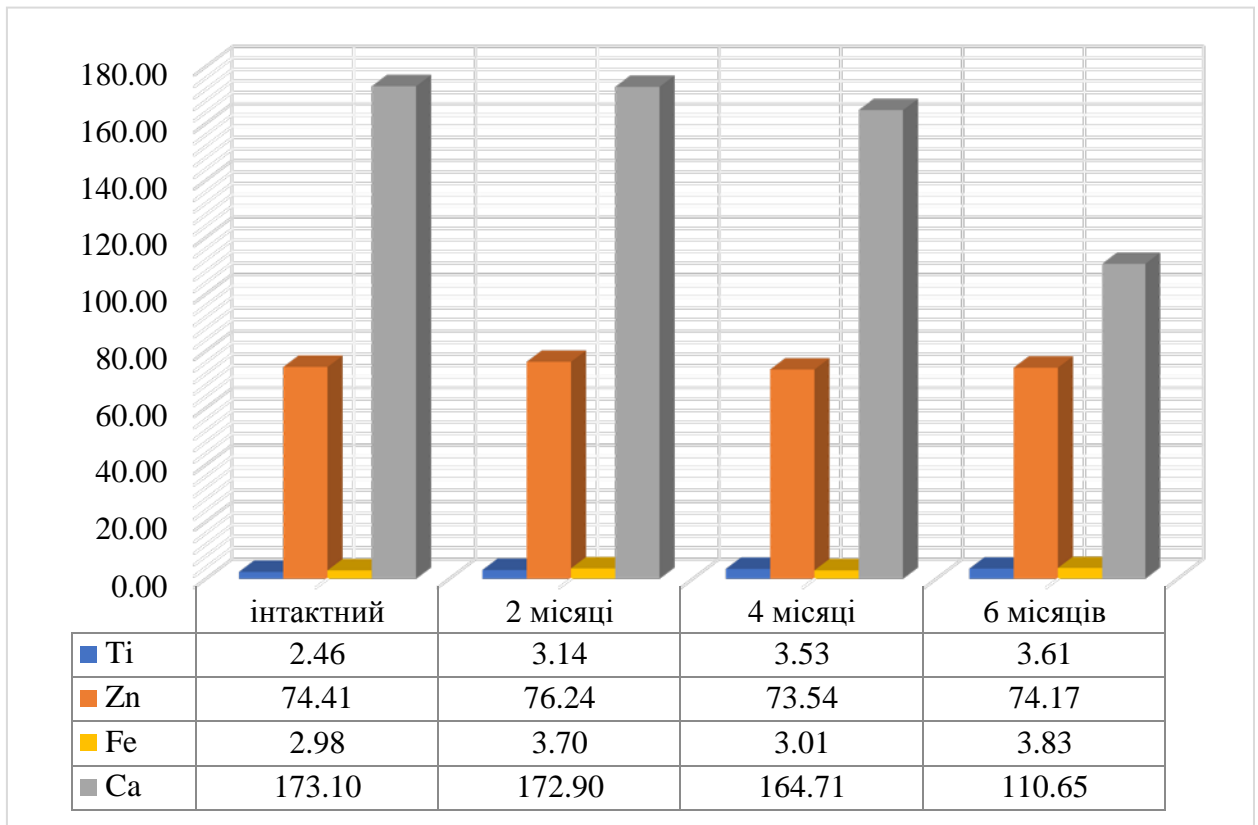
Щоб переконатися в точності результатів, було обрано другого щура та взято зразки перед пероральним годуванням наночастинками на восьмому тижні життя тварини (інтактна) та після завершення експериментального періоду через 6 місяців, коли вік щура становив 32 тижні. Спостерігалась аналогічна картина як для першого випадку: вміст Zn у пробах шерсті другого щура збільшувався рівномірно кожні два місяці і зі збільшенням Zn спостерігалось пропорційне зменшення Fe. Результати представлені на діаграмі 2.2.



Діаграма 2.2. Концентрація елементів при хронічному навантаженні ZnO у шерсті другого щура (мкг/г).

Також, за допомогою рентгенофлуоресцентного спектрометру «ЕЛВАТЕХ» було отримано спектри зразків шерсті обраного щура на вміст Ті. Щур протягом 6 місяців щодня перорально отримував суспензію наночастинок TiO₂ із розрахунку 0,1 мг/кг/добу. Було виміряно вміст елементу Ті на початку (інтактна тварина) та кожні наступні два місяці після годування. Окрім елементу Ті було проаналізовано інші мікроелементи та помічено певне співвідношення Ті до Са – зі збільшенням Ті вміст Са зменшується. Взаємодію Ті та Са окремо не було досліджено та немає жодних відомостей, але Са є одним з основним мікроелементів в організмі. Всі клітини: від примітивних одноклітинних організмів до нейронів кори великих півкуль ссавців залежать від обміну кальцію: формування кісток, дентину та емалі зубів, участь у процесах скорочення м'язів, зменшення проникності стінок судин, участь у процесах ділення клітин, участь у стабілізації клітинної структури. Цікаво, що вміст Zn та Fe залишається майже незмінним при однаковому харчуванні групи щурів, яких перорально

годували наночастинками ZnO та TiO₂. Цей факт ще раз свідчить про накопичення Zn у попередніх вимірюваннях саме через додаткове введення наночастинок ZnO. Результати концентрацій елементів кожної проби представлені на діаграмі 2.3.

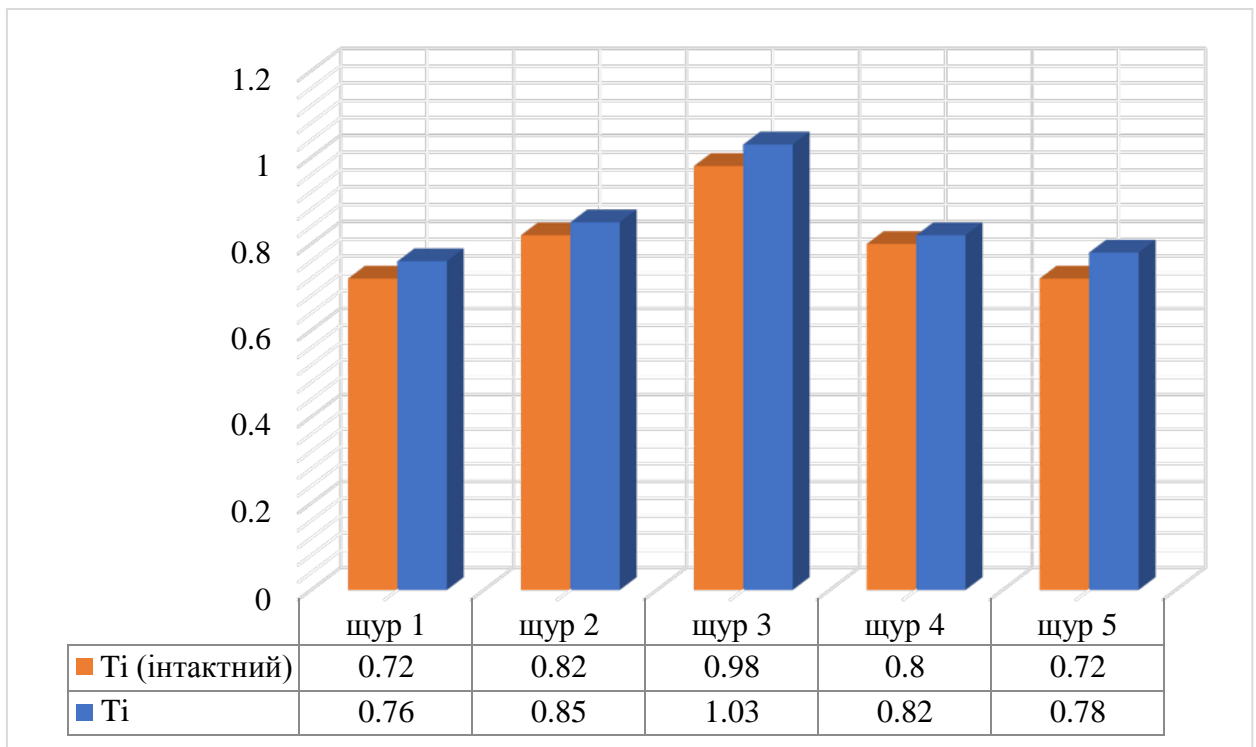


Діаграма 2.3. Концентрація елементів при хронічному навантаженні TiO₂ у шерсті щура (мкг/г).

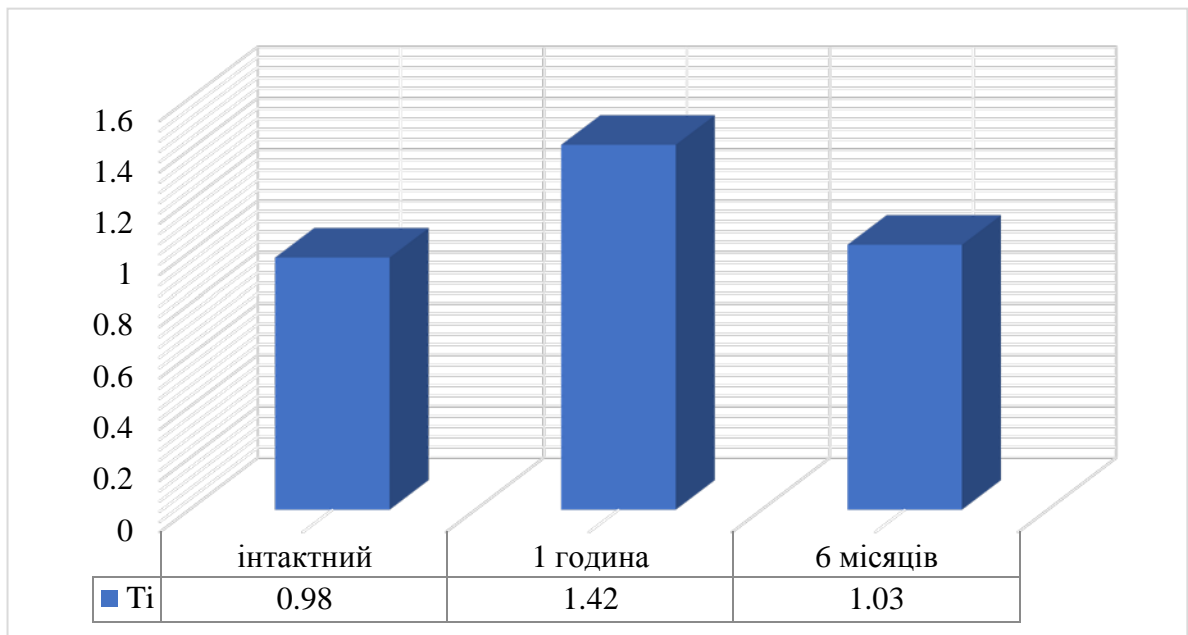
Наведена діаграма показує те, що вміст Ti у пробах шерсті щура накопичується нерівномірно кожні два місяці в низькій концентрації. Розуміємо, що наночастинки TiO₂ мають надзвичайно низьке поглинання, в той час як наночастинки ZnO мали більш високе поглинання і чітку рівномірність накопичення елементу в волосяному покриві. Це означає, що частинки TiO₂ мають мінімальну швидкість всмоктування в клітини та тканини та механізми швидкого виведення. Окремих клінічних проявів накопичення Ti не спостерігалось у щура при пероральному введенні наночастинок TiO₂. В той час, як при введенні ZnO клінічними ознаками надлишкового накопичення елементу Zn в організмі щурів були: ерекція

волосяного покрыву, депресія, діарея і зниження маси тіла більш ніж на 10%. Можна казати про те, що на відміну від TiO_2 , наночастинки ZnO , як відомо, володіють високою токсичністю. Одним з механізмів цієї токсичності є їх властивість іонізації в біологічних рідинах. [14] Хоча, цинк є основним мікроелементом, який виявлено майже у двохстах ферментах, які визначають протікання різноманітних метаболічних процесів, включаючи синтез та розпад вуглеводів, жирів, білків та нуклеїнових кислот. Коли цинк в нормальній кількості в організмі, його основні функції: вплив на функцію генетичного апарату, вплив на ріст та ділення клітин, володіє певними антивірусними та антитоксичними властивостями, стимулювання синтезу інсуліну, захист від стресу, необхідний для розвитку мозку та формування поведінкових реакцій. [5]

Окрім шерсті, було досліджено вміст тих самих елементів у крові щурів. Результати вимірювань зразків крові на вміст Ti продемонстровані в наступних діаграмах 2.4, 2.5.



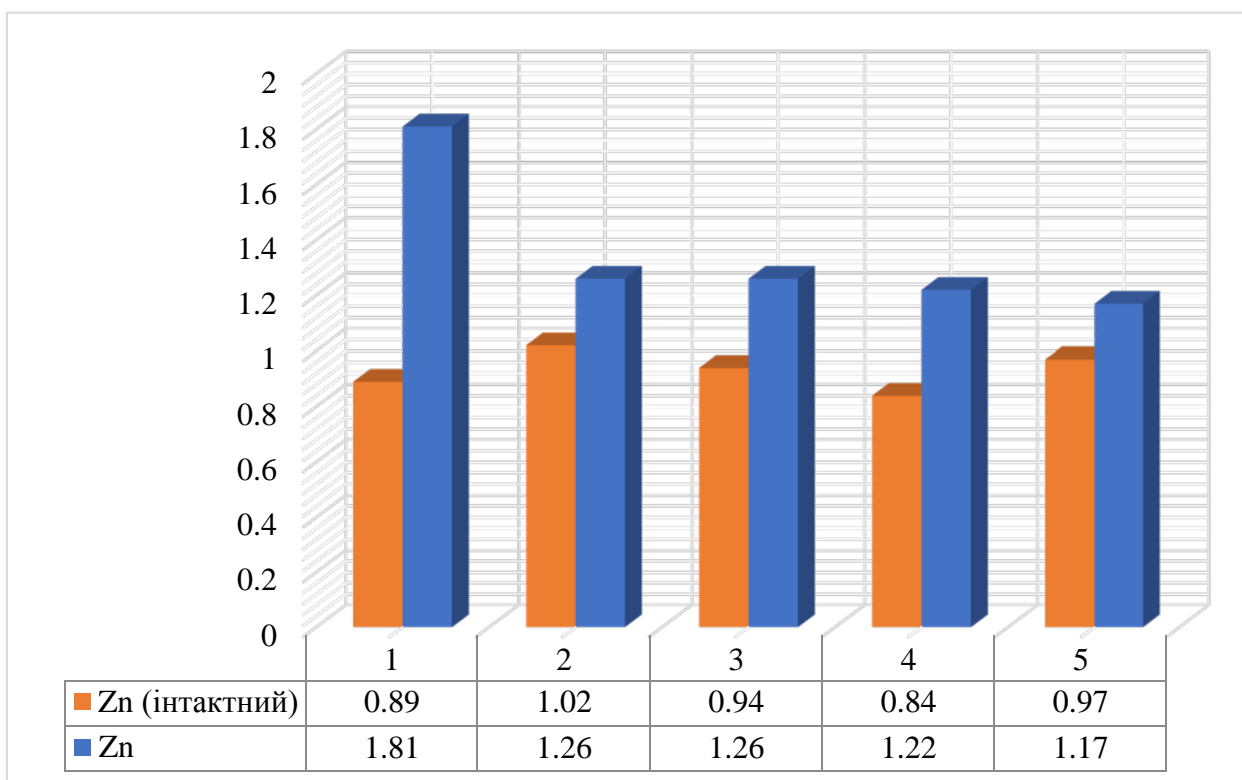
Діаграма 2.4. Концентрація елементу Ti при хронічному навантаженні TiO_2 у крові щурів (мкг/г).



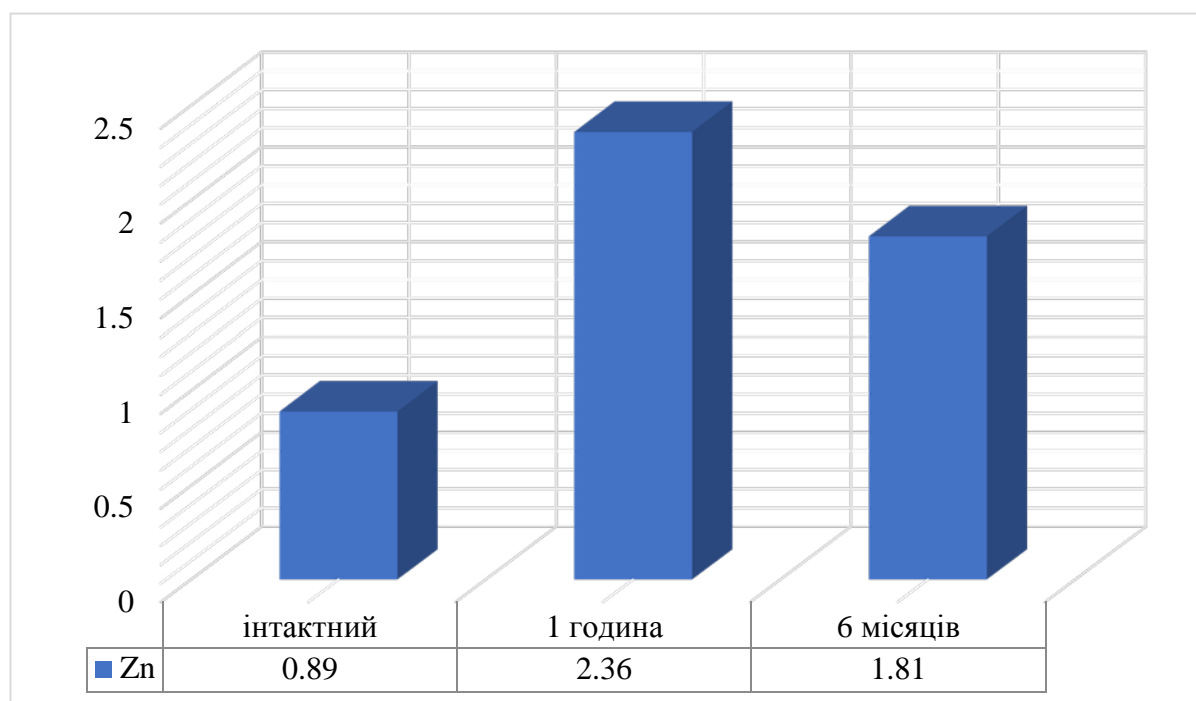
Діаграма 2.5. Концентрація елементу Ti при хронічному навантаженні TiO₂ у крові щура 3 (мкг/г).

Наші отримані дані підтверджують, що протягом 1 години після перорального введення наночастинок, які потрапили через шлунково-кишковий тракт, вони досягли системних кровоносних шляхів і залишилися в різних органах, тканинах. На це вказує різке підвищення вмісту елементу в крові. Концентрація елементу, що залишилася в організмі після експериментального періоду 6 місяців, впала майже до рівня інтактного показника. Це означає, що елемент Ti має не тільки низьку активність поглинання, але і механізми раннього виведення. [12] Отже, ми спостерігали накопичення елементу Ti в волосяному покриві тварин при хронічному навантаженні, але дослідження по крові продемонстрували здатність Ti до швидкого виведення. Цікавим буде дослідити як саме в організмі розподіляється Ti та на які органи/тканини припадає найбільша концентрація елементу в організмі.

Результати вимірювань зразків крові на вміст Zn продемонстровані в наступних діаграмах 2.6, 2.7.



Діаграма 2.6. Концентрація елементу Zn при хронічному навантаженні ZnO у крові щурів (мкг/г).



Діаграма 2.7. Концентрація елементу Zn при хронічному навантаженні ZnO у крові щура 1 (мкг/г).

Більш високе поглинання ZnO, ніж наночастинки TiO₂, може бути пов'язане з більш високою швидкістю розчинення в кислій шлунковій рідині, однак потрібні більш ретельні дослідження. Концентрація ZnO в крові майже в 2 рази вище концентрації TiO₂. Більш висока концентрація Zn в крові в порівнянні з Ti може бути пов'язана з біоперсистентністю (здатність розчинення в організмі) наночастинок ZnO. TiO₂ і наночастинки ZnO мають різну стійкість в кислих умовах, хоча обидва є мінімально руйнівними в лужних або фізіологічних умовах. [9, 11] На кінетику наночастинок при пероральному введенні може впливати взаємодія між фізико-хімічними властивостями наночастинок і біологічним середовищем з яким вони контактують.

ВИСНОВКИ

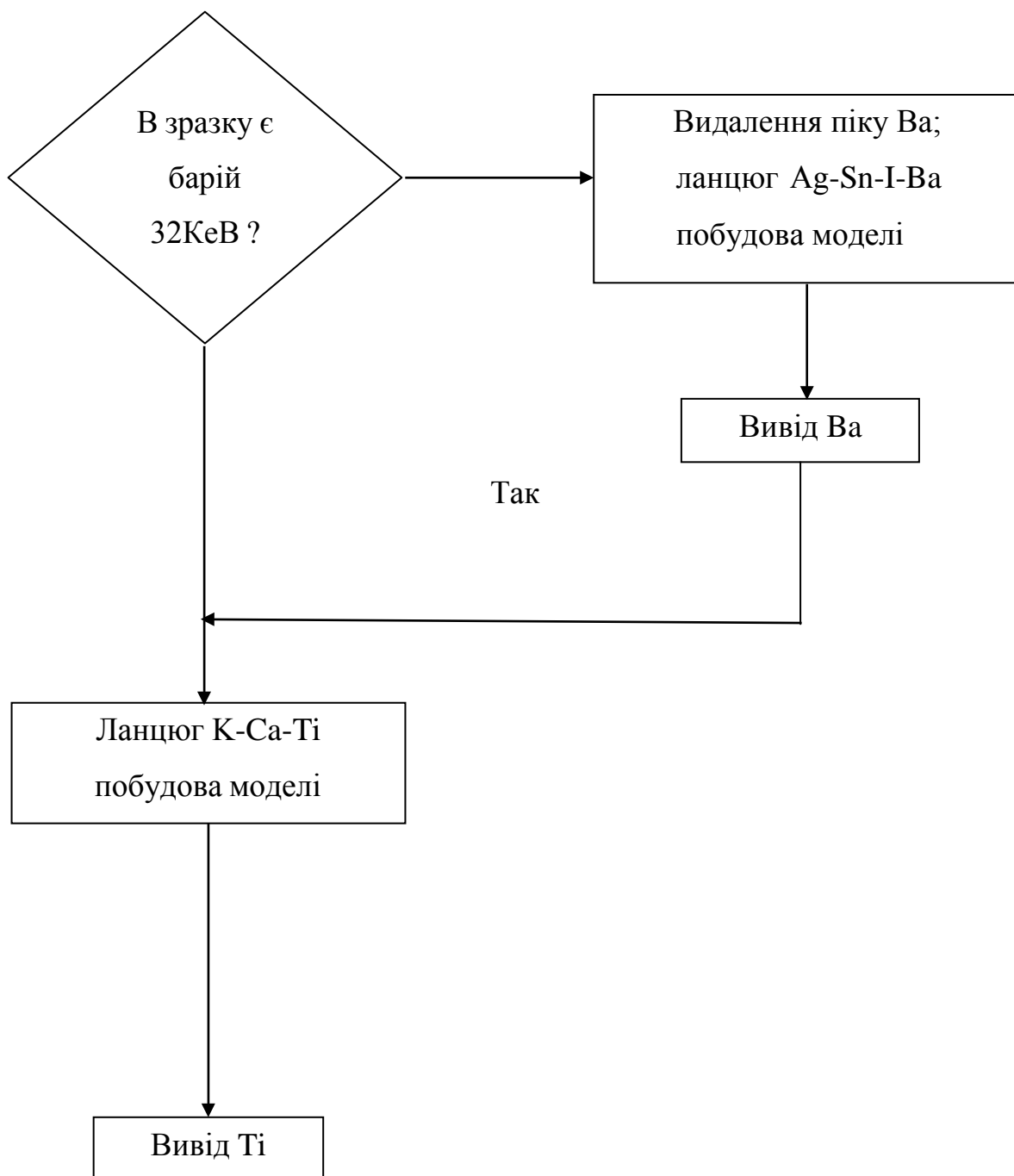
- Розроблено алгоритм та реалізація розділення характеристичних ліній рентгенівської флуоресценції для барію та титану, що мають близькі енергії випромінювання в діапазоні 4.46-4.51KeV. Це значно підвищило якість роботи основної програми.
- Показано, що при аналізі волосяного покриву спостерігається накопичення елементів, що свідчить про вплив наночастинок на організм. Це доводить те, що наночастинок краще всмоктуються в шкіру. Отже, необхідна подальша оцінка тканинного розподілу і абсорбції цих наночастинок після перорального введення, щоб отримати цінну інформацію для оцінки токсичності цих наночастинок.
- Показано, зі збільшенням Zn спостерігалось пропорційне зменшення Fe, що є біологічно нормальним явищем.
- Доведено, що додаткове пероральне введення наночастинок ZnO впливає на організм тварини та накопичується в організмі, що спонукає до подальших досліджень саме впливу на кожний орган щура.
- Показано, що TiO₂ має надзвичайно низьке поглинання, в той час як наночастинок ZnO мали більш високе поглинання і чітку рівномірність накопичення елементу в волосяному покриві. Це означає, що частинки TiO₂ мають мінімальну швидкість всмоктування в клітини, тканини та механізми раннього виведення.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Методика. Виконання вимірювань масової частки хімічних елементів у волоссі рентгено-флуоресцентним методом. МВВ 081/12-4502-00 – Київ, 2000.
2. Черноруков Н.Г., Нипрук О.В. Теория и практика рентгенофлуоресцентного анализа. Электронное учебно-методическое пособие – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012.
3. Wang Y., Chen Z., Ba T., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Jia G. Susceptibility of Young and Adult Rats to the Oral Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles small, 2012.
4. Scientific committee on toxicity, ecotoxicity and the environment opinion on the results of the risk assessment of: Zinc metal (CAS No. 7440-66-6), Zinc chloride (CAS No. 7646-85-7), Zinc sulphate (CAS No. 7733-02-0), Zinc distearate (CAS No. 557-05-1, 9105-01-3), Zinc phosphate (CAS No. 779-90-0), Zinc oxide (CAS No. 1314-13-2) – Brussels, Belgian, 2003.
5. Скальный А.В. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение). Практическое руководство для врачей и студентов медицинских вузов. М.: изд-во КМК, 2001.
6. Методика виконання вимірювань масової частки хімічних елементів у волоссі рентгенофлуоресцентним методом. МВВ 081/12-4502-00 – Київ, 2000.
7. Sasaki N., Okada K., Kawai J. X-ray tube spectral measurement method for quantitative analysis of X-ray fluorescence analysis. X-Ray Spectrometry, 2010.
8. Janusz B., Joanna P.-C., Joanna Z. Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment, 2007.
9. Sabah A., Manal A., Amal S. A., Sherifa S. Hamed Hesperidin alleviates zinc oxide nanoparticle induced hepatotoxicity and oxidative stress, 2018.

10. Miri B. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles, 2012.
11. Durgaiah G., Harikiran L., Narsimhareddy Y. Nano titanium exposure induces dose- and sizedependent cytotoxicity on human epithelial lung and colon cells, 2018.
12. Wolfgang G., Uwe H., Carsten S. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after oral application in rats (Part 2), 2017.
13. Krol A., Pomastowski P., Rafinska K. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism, 2017.
14. Imen B., Imen M., Naima R. Sub-Acute Oral Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in Male Rats, 2015.
15. Martinez-Carmona M., Gun'ko Y., Vallet-Regi M. ZnO Nanostructures for Drug Delivery and Theranostic Applications, 2018
16. Рентгено-флуоресцентный анализ. Под ред. Н.Ф. Лосева. - Новосибирск, 1991, 420 ст.
17. Вольдсет Р. Прикладная спектрометрия рентгеновского излучения. Изд. доп. (США, 1977). Пер. с англ. М., Атомиздат, 1977.

ДОДАТОК А



```

procedure Cep_Ti;
var SqP : real;
begin
  Kartoteka.RGS1.ItemIndex:=0;
  if MCE_Ka1[19]=0 then
    begin // знаходження к-сті калію
      SqP:=ExpertP('K ',19,0,0);
      ArhSpectr.TB_K.ImageIndex:=ArhSpectr.TB_K.ImageIndex+1;
      PodgIDSp(SqP,19);
    end;
  if MCE_Ka1[20]=0 then
    begin // знаходження к-сті кальцію з врахуванням вмісту калію
      SqP:=ExpertP('Ca',20,0,0);
      ArhSpectr.TB_Ca.ImageIndex:=ArhSpectr.TB_Ca.ImageIndex+1;
      PodgIDSp(SqP,20);
    end;
  if MCE_Ka1[22]=0 then
    begin // знаходження к-сті титану з врахуванням вмісту кальцію
      SqP:=ExpertP('Ti',22,0,0);
      ArhSpectr.TB_Ti.ImageIndex:=ArhSpectr.TB_Ti.ImageIndex+1;
      PodgIDSp(SqP,22);
    end;
  Kartoteka.RGS1.ItemIndex:=3;
end;
procedure TArhSpectr.Button2Click(Sender: TObject);
var SqP : real;
begin
  Kartoteka.RGS1.ItemIndex:=0;
  if MCE_Ka1[56]=0 then
    begin //знаходження к-сті барію
      SqP:=ExpertP('Ba',56,0,0);
      TB_Ba.ImageIndex:=TB_Ba.ImageIndex+1;
      PodgIDSp(SqP,56);
    end;
  Kartoteka.RGS1.ItemIndex:=3;
  if MCE_Ka1[56]=0 then
    begin // за відсутності барію, знаходимо к-сть титану
      Cep_Ti;
    end else
    begin // за наявності барію, виконуємо ланцюг Ag-Sn-I-Ba
      DeletePeak(56); // знищення піку барію
      Kartoteka.RGS1.ItemIndex:=0;
      if MCE_Ka1[47]=0 then
        begin // знаходження к-сті аргентуму

```

```

SqP:=ExpertP('Ag',47,0,0);
TB_Ag.ImageIndex:=TB_Ag.ImageIndex+1;
PodgIDSp(SqP,47);
end;
if MCE_Ka1[50]=0 then
begin // знаходження к-сті олова з врахуванням вмісту аргентуму
SqP:=ExpertP('Sn',50,0,0);
TB_Sn.ImageIndex:=TB_Sn.ImageIndex+1;
PodgIDSp(SqP,50);
end;
if MCE_Ka1[53]=0 then
begin // знаходження к-сті йоду з врахуванням вмісту олова
SqP:=ExpertP('I ',53,0,0);
TB_I.ImageIndex:=TB_I.ImageIndex+1;
PodgIDSp(SqP,53);
end;
if MCE_Ka1[56]=0 then
begin // знаходження к-сті барію з врахуванням вмісту йоду
SqP:=ExpertP('Ba',56,0,0);
TB_Ba.ImageIndex:=TB_Ba.ImageIndex+1;
PodgIDSp(SqP,56);
end;
Сер_Ti; // знаходження к-сті титану з врахуванням вмісту барію
end;
end;

```