

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗАЛІЗА НА ЗМІНУ МАСИ ТІЛА ТА ВІДНОСНУ МАСУ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ У МИШЕЙ

Дорошенко А.М.

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна

Ключові слова: нанофармакологія, безпечність, наночастинки заліза, органи-мішені, морфометричні показники, маса тіла, відносна маса внутрішніх органів.

Вступ. Сучасний науково-технічний прогрес пов'язаний із новими відкриттями у галузі матеріалознавства. Ідентифікація природних та синтез штучних наноматеріалів відкривають можливості як у вивченні фізіологічних процесів, що протікають в організмі, так і можуть слугувати більш ефективними засобами для діагностики і лікування багатьох соціально важливих і поширених захворювань [3, 4]. Зокрема, одним з таких захворювань є анемія, на яку за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я страждає близько чверті населення Землі. Основними причинами анемії є дефіцит заліза в організмі та полідефіцитні стани [9, 24, 43].

Одним із основних принципів медичної допомоги хворим на залізодефіцитну анемію є призначення препаратів заліза для відновлення пулу цього біметалу в організмі. Однак існуючі лікарські засоби є недостатньо ефективними і безпечними, що пов'язано із пониженою біодоступністю елементарного заліза і, як наслідок, необхідністю застосування порівняно високих доз для досягнення терапевтичного ефекту [18]. Це, в свою чергу, може призводити до розвитку побічних ефектів та проявів токсичності. З огляду на те, що нанорозмірні частинки мають більшу біологічну активність на молекулярному рівні, вивчення фармакологічних і токсикологічних властивостей наночастинок заліза (НЧЗ) як потенційної субстанції для створення протианемічного лікарського засобу є актуальним завданням [5]. За даними [10, 19, 37] наночастинки оксидів заліза (НЧОЗ), зокрема магнетиту (Fe_3O_4), призводять до стимуляції метаболізму заліза в організмі, включення цього біметалу у склад гемоглобіну та посилення еритропоезу, що робить перспективним застосування цих наночастинок для лікування залізодефіцитної анемії.

Цей підхід правомірний і для наночастинок нуль-валентного заліза (НЧЗ), але даних стосовно біологічної активності, розподілу в організмі і токсичності даних наночастинок на сьогодні недостатньо. Переважна більшість публікацій з біомедичного застосування НЧЗ стосується знешкодження забруднювачів органічного та неорганічного походження у навколишньому середовищі [15]. При цьому порівняно нещодавно інтенсифікувалися дослідження змін, які можуть виникати у навколишньому середовищі при застосуванні цих нанорозмірних матеріалів. Зокрема встановлено, що НЧЗ здатні окиснюватися з ут-

воренням Fe^{2+} та Fe^{3+} , викликати зниження вмісту кисню у ґрунтових водах, індукувати утворення реактивних сполук кисню і, як наслідок, можуть призводити до порушення життєдіяльності фауни і флори ґрунтів і водойм та потенційно загрожувати екологічному стану місцевостей, в яких вони застосовуються [12, 13, 17, 39, 40].

Отже, НЧЗ є потенційною субстанцією для розробки оригінального протианемічного лікарського засобу. З іншого боку, досліджень *in vivo* стосовно безпечності та біологічної активності НЧЗ на сьогодні недостатньо. Так як застосування будь-якого нового синтезованого матеріалу потребує різностороннього вирішення ключових питань безпеки для уникнення можливих несприятливих наслідків як для здоров'я населення, так і для навколишнього середовища [33, 35], встановлення гострої токсичності НЧЗ є одним із провідних етапів доклінічного вивчення цих наночастинок. Зміна маси тіла, як інтегрального показника загального стану і фізичного розвитку, а також встановлення потенційних органів-мішеней має велике практичне значення з точки зору розуміння основних патофізіологічних механізмів і тактики лікування при можливих навмисних чи випадкових отруєннях наночастинками заліза.

У попередніх дослідженнях встановлено, що НЧЗ, синтезовані в Інституті біологічної хімії імені Ф.Д. Овчаренка НАН України, належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) при внутрішньовенному та до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) при внутрішньошлунковому шляхах введення за класифікацією Hodge H. C. і Sterner L. H [20]. В плані продовження вивчення токсичності НЧЗ в даній статті представлені результати дослідження стосовно зміни основних морфометричних показників у мишей після одноразового внутрішньовенного і внутрішньошлункового введення НЧЗ.

Мета дослідження – встановити динаміку зміни маси тіла лабораторних тварин (мишей), а також зміни масових коефіцієнтів внутрішніх органів для визначення потенційних органів-мішеней за умови одноразового внутрішньошлункового та внутрішньовенного введення наночастинок нуль-валентного заліза у токсичних дозах.

Матеріали та методи дослідження. Сферичні наночастинки нуль-валентного заліза (НЧЗ) розміром 40 нм отримані в Інституті біологічної хімії імені Ф. Д. Овча-

ренка НАН України за допомогою оригінального методу хімічного синтезу. Дослідження проведені на 74 самках і 56 самцях білих мишей лінії BALB/c масою 18–22 г із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України №66 від 13.02.2006 р., Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” 2006 р. Тварин утримували у віварії НМУ імені О. О. Богомольця в стандартних умовах за температури 22–24 °С та відносної вологості 50–70% з вільним доступом до корму та води. Групи тварин формували за методом рандомізації. Період карантину та акліматизації тривав протягом 7 діб. План експерименту схвалений Комітетом з біоетики НМУ імені О.О. Богомольця, усі процедури, пов’язані з гуманним поводженням із тваринами, були дотримані. Дослідження проведено на базі кафедри фармакології та клінічної фармакології та віварію НМУ імені О.О. Богомольця.

Стерильний порошок НЧЗ *ex tempore* розчиняли у воді для ін’єкцій та вводили одноразово у латеральну хвостову вену дослідних мишей або внутрішньошлунково за допомогою зонду. Для внутрішньошлункового введення НЧЗ було використано 10 самок, з яких сформовано дослідну (5000 мг/кг) та контрольну (0 мг/кг) групи по 5 тварин. Протягом 3–4 год. перед введенням тварин утримували без корму з вільним доступом до води. Мишам контрольної групи вводили через зонд розчинник – воду для ін’єкцій – у тому ж об’ємі. Об’єм введення становив 40 мл/кг. Для внутрішньовенного введення НЧЗ було обрано 7 рівнів доз по 8 тварин в кожному для самок (130, 155, 180, 205, 230, 255 і 280 мг/кг за субстанцією НЧЗ) та 6 рівнів доз по 8 тварин в кожному для самців (180, 205, 230, 255, 280, 305 мг/кг за субстанцією НЧЗ). Тваринам з контрольних груп (8 самців і 8 самок) вводили тим же самим способом розчинник – воду для ін’єкцій. Об’єм внутрішньовенного введення для всіх груп становив 10 мл/кг.

Після внутрішньовенного чи внутрішньошлункового введення спостереження за станом тварин проводили протягом 14 діб. Масу тварин визначали перед введенням НЧЗ та на 3-тю, 7-му і 14-ту добу відновного періоду. На 14 добу усіх тварин виводили з експерименту та при аутопсії вилучали головний мозок, тимус, серце, легені з бронхами, печінку, селезінку, нирки, шлунок. Після відокремлення зайвої жирової (сполучної) тканини органи промивали у фізіологічному розчині, зайву вологу прибирали за допомогою фільтрувального паперу та зважували на електронних вагах. На основі абсолютних значень маси органів розраховано відносні маси шляхом визначення співвідношення маси органу до маси головного мозку даної тварини. Маса головного мозку використана в якості точки відліку (константи) у зв’язку з мінімальною зміною цього показника при дії токсичних доз НЧЗ, порівняно із абсолютною масою тварини, яка значно

змінювалася в залежності від рівня дози та терміну спостереження [32].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп’ютерної програми BioStat 2009 for Windows (v5.8.4). Розраховували значення середніх арифметичних величин (M) і стандартних помилок середньої (m). Для визначення достовірності відмінностей між середніми величинами використовували параметричний критерій Стьюдента (t). Зміни показників вважали достовірними з рівнем значимості понад 95% ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення. Після одноразового внутрішньошлункового введення НЧЗ протягом 14 діб спостереження в контрольній та дослідній групах не загинула жодна тварина, а динаміка набору маси тіла була однаковою. На 14 добу маса тіла мишей дослідної і контрольної груп достовірно ($p < 0,05$) зросла на 14,6% і 15,6% відповідно, порівняно із показником до введення НЧЗ (рис. 1).

Середня маса головного мозку на 14 добу після внутрішньошлункового введення НЧЗ становила $0,43 \pm 0,02$ г та $0,42 \pm 0,03$ г для контрольної та дослідної груп відповідно. Відсутність статистичної різниці між даними показниками дозволило застосувати масу мозку за константу при розрахунку відносних мас органів мишей, які представлені на табл. 1. Встановлено достовірне зменшення відносних мас тимусу на 32,1% і обох нирок на 9,4% і 12,9% ($p < 0,05$) порівняно із контролем. Крім того, спостерігається тенденція до підвищення маси шлунка на 17,1%. Дані відмінності можуть попередньо свідчити про вплив НЧЗ при пероральному введенні на вказані органи-мішені.

Після одноразового внутрішньовенного введення мишам токсичних доз НЧЗ спостерігалася дозозалежна загибель тварин протягом перших 4 діб і зменшення кількості спостережень (n) в дослідних групах, що було застосовано для розрахунку середньосмертельної дози (результати не наведено). На 3-тю добу після введення НЧЗ як серед самців, так і серед самок, окрім найнижчого рівня дози (130 мг/кг), спостерігалася тенденція або достовірне зниження ($p < 0,05$) маси тіла приблизно на 2,8–10,3% порівняно із вихідним значенням показника (рис. 2, 3). При цьому в контрольних групах на 3-тю добу спостерігалася тенденція до підвищення (у самців) або достовірне підвищення

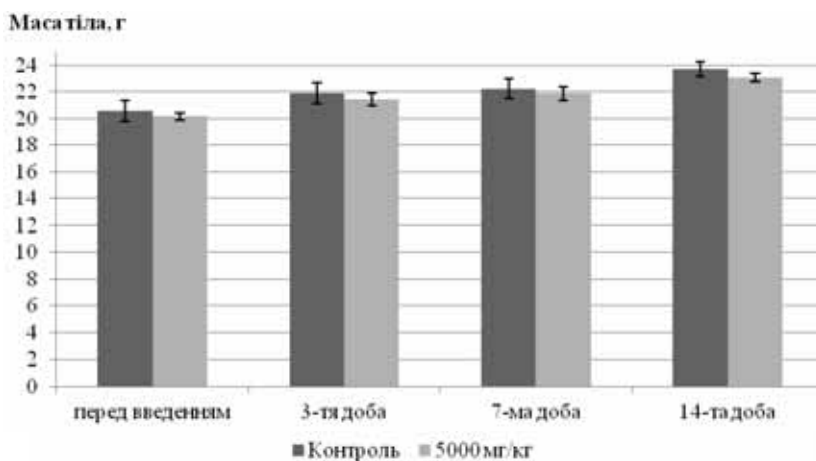


Рис. 1. Динаміка зміни маси тіла самок мишей в залежності від дози після одноразового внутрішньошлункового введення НЧЗ ($M \pm m$), $n=5$

Таблиця 1.

Відносна маса органів самок мишей в залежності від дози на 14 добу після внутрішньошлункового одноразового введення НЧЗ (M±m)

| Рівень дози, мг/кг | Кількість спостережень | Показник | Середня маса головного мозку, г | Відносна маса органів | | | | | | | | |
|--------------------|------------------------|----------|---------------------------------|-----------------------|-------|-------|--------|---------|-----------|--------------|-------------|--------|
| | | | | Головний мозок | Тимус | Серце | Легені | Печінка | Селезінка | Нирка більша | Нирка менша | Шлунок |
| 0 | n=5 | M | 0,43 | 1,00 | 0,28 | 0,28 | 0,44 | 2,75 | 0,27 | 0,32 | 0,31 | 0,41 |
| | | m | 0,02 | – | 0,01 | 0,03 | 0,13 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | |
| 5000 | n=5 | M | 0,42 | 1,00 | 0,19* | 0,27 | 0,45 | 2,72 | 0,29 | 0,29* | 0,27* | 0,48 |
| | | m | 0,03 | – | 0,02 | 0,02 | 0,14 | 0,04 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | |

Примітка. * – p<0,05 порівняно із контролем.

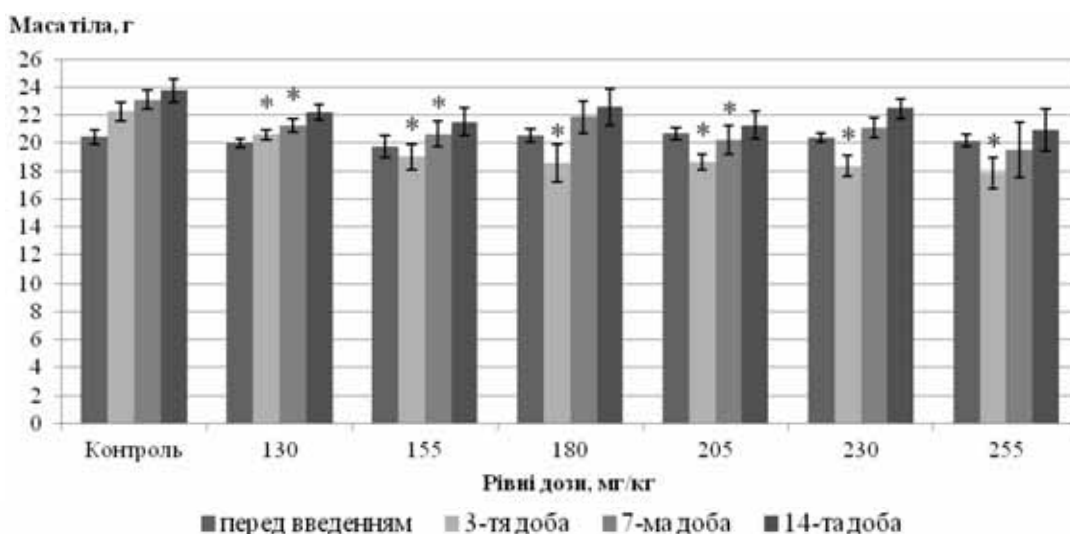


Рис. 2. Динаміка зміни маси тіла самок мишей, в залежності від дози після одноразового внутрішньовенного введення НЧЗ, г (M±m), n=8

Примітка. * – p<0,05 порівняно із контролем.

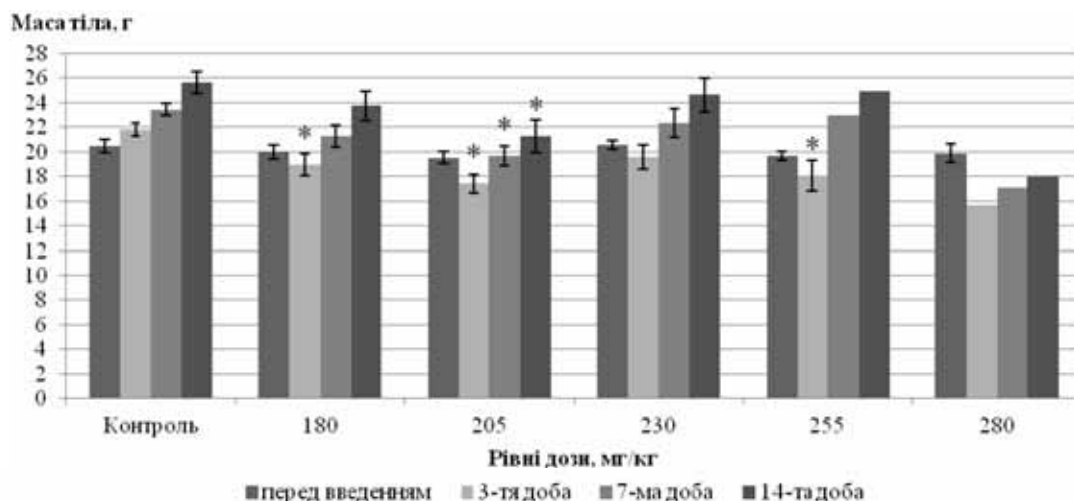


Рис. 3. Динаміка зміни маси тіла самців мишей, в залежності від дози після одноразового внутрішньовенного введення НЧЗ, г (M±m), n=8

Примітка. * – p<0,05 порівняно із контролем. Відсутність планок похибок свідчить про зменшення кількості спостережень в групах до одного (n=1) внаслідок загибелі частини підослідних тварин протягом 14 діб після введення токсичних доз НЧЗ.

(у самок, $p < 0,05$) маси тіла на 6,5% та 9,1% відповідно. Маса тіла дослідних мишей обох статей, як інтегральний показник стану організму, на 3-тю добу понижувалася пропорційно до підвищення рівня дози, що свідчить про дозову залежність токсичного впливу НЧЗ на піддослідних тварин. Лише у групі з найменшим рівнем дози – 130 мг/кг – на 3-тю добу маса тіла мишей мала тенденцію до підвищення приблизно на 2,9% з подальшим зростанням показника протягом усього відновного періоду на 7-му і 14-ту добу. На 7-му добу у дослідних групах, крім рівня дози 130 мг/кг, маса тіла мишей мала тенденцію до збільшення або достовірно підвищувалася ($p < 0,05$) приблизно до вихідних значень. На 14-ту добу спостерігалася подальше зростання маси тіла тварин в усіх групах. За 14

днів спостереження приріст маси тіла самок мишей контрольної та дослідних груп склав 16,8% проти 5,5–10,9% відповідно, а приріст маси тіла самців контрольної та дослідних груп – на 26,0% проти 6,8–22,6% відповідно. Це свідчить про відставання тварин дослідних груп у розвитку і зростанні маси тіла, порівняно із контролем.

Статистичних відмінностей значення середньої маси мозку як для самок, так і для самців мишей на 14 добу після внутрішньовенного введення НЧЗ у токсичних дозах не зареєстровано, що дозволило використати даний показник за константу при розрахунку відносних мас органів (табл. 2 і 3).

На 14 добу після одноразового внутрішньовенного введення НЧЗ у дослідних групах самок порівняно із кон-

Таблиця 2.

Відносна маса органів самок мишей в залежності від дози на 14 добу після одноразового внутрішньовенного введення НЧЗ ($M \pm m$)

| Рівень дози, мг/кг | Кількість спостережень | Показник | Середня маса головного мозку, г | Відносна маса органів | | | | | | | |
|--------------------|------------------------|----------|---------------------------------|-----------------------|-------|-------|--------|---------|-----------|--------------|-------------|
| | | | | Головний мозок | Тимус | Серце | Легені | Печінка | Селезінка | Нирка більша | Нирка менша |
| 0 | n=8 | M | 0,43 | 1,00 | 0,25 | 0,30 | 0,48 | 3,08 | 0,31 | 0,34 | 0,32 |
| | | m | 0,02 | – | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,16 | 0,03 | 0,01 | 0,02 |
| 130 | n=8 | M | 0,44 | 1,00 | 0,19 | 0,23* | 0,43 | 2,46* | 0,31 | 0,29* | 0,27* |
| | | m | 0,01 | – | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |
| 155 | n=7 | M | 0,43 | 1,00 | 0,17 | 0,26 | 0,45 | 2,83 | 0,44 | 0,30* | 0,27* |
| | | m | 0,04 | – | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,17 | 0,06 | 0,01 | 0,01 |
| 180 | n=5 | M | 0,42 | 1,00 | 0,19 | 0,25* | 0,47 | 2,93 | 0,38 | 0,29* | 0,28 |
| | | m | 0,04 | – | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,30 | 0,05 | 0,02 | 0,02 |
| 205 | n=5 | M | 0,44 | 1,00 | 0,24 | 0,25* | 0,44 | 2,85 | 0,31 | 0,32 | 0,30 |
| | | m | 0,05 | – | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,23 | 0,04 | 0,005 | 0,01 |
| 230 | n=3 | M | 0,43 | 1,00 | 0,21 | 0,27 | 0,44 | 3,28 | 0,4 | 0,33 | 0,31 |
| | | m | 0,04 | – | 0,04 | 0,01 | 0,02 | 0,31 | 0,08 | 0,01 | 0,02 |
| 255 | n=2 | M | 0,43 | 1,00 | 0,20 | 0,28 | 0,45 | 3,24 | 0,41 | 0,33 | 0,31 |
| | | m | 0,15 | – | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,16 | 0,07 | 0,04 | 0,03 |

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно із контролем.

Таблиця 3.

Відносна маса органів самців мишей в залежності від дози на 14 добу після одноразового внутрішньовенного введення НЧЗ ($M \pm m$)

| Рівень дози, мг/кг | Кількість спостережень | Показник | Середня маса головного мозку, г | Відносна маса органів | | | | | | | |
|--------------------|------------------------|----------|---------------------------------|-----------------------|-------|-------|--------|---------|-----------|--------------|-------------|
| | | | | Головний мозок | Тимус | Серце | Легені | Печінка | Селезінка | Нирка більша | Нирка менша |
| 0 | n=8 | M | 0,42 | 1,00 | 0,14 | 0,30 | 0,52 | 2,82 | 0,35 | 0,39 | 0,37 |
| | | m | 0,03 | – | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,16 | 0,02 | 0,02 | 0,03 |
| 180 | n=8 | M | 0,41 | 1,00 | 0,16 | 0,30 | 0,52 | 2,91 | 0,32 | 0,41 | 0,39 |
| | | m | 0,02 | – | 0,02 | 0,01 | 0,03 | 0,14 | 0,02 | 0,03 | 0,03 |
| 205 | n=6 | M | 0,44 | 1,00 | 0,16 | 0,25 | 0,48 | 3,2 | 0,41 | 0,34 | 0,32 |
| | | m | 0,05 | – | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,29 | 0,06 | 0,02 | 0,02 |
| 230 | n=5 | M | 0,44 | 1,00 | 0,18 | 0,32 | 0,52 | 2,98 | 0,45* | 0,38 | 0,36 |
| | | m | 0,02 | – | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,30 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| 255 | n=1 | M | 0,44 | 1,00 | 0,18 | 0,29 | 0,49 | 3,88 | 0,32 | 0,51 | 0,50 |
| | | m | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 280 | n=1 | M | 0,37 | 1,00 | 0,16 | 0,24 | 0,68 | 2,76 | 0,30 | 0,35 | 0,35 |
| | | m | – | – | – | – | – | – | – | – | – |

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно із контролем.

тролем спостерігається достовірне зниження ($p < 0,05$) або тенденція до зниження відносної маси серця на 6,7–23,3% і нирок на 2,9–15,6%, а також тенденція до зменшення маси тимусу на 4–24% при усіх застосованих рівнях дози, порівняно із контролем (табл. 2). При рівні дози 130 мг/кг визначено достовірне зниження відносної маси печінки на 20,1% порівняно із контролем ($p < 0,05$). У дослідних групах самців спостерігалася тенденція до підвищення відносної маси печінки на 3,2–37,6% при рівнях дози від 180 до 255 мг/кг та маси тимусу на 14,3–28,6% при всіх застосованих рівнях доз, порівняно із контролем (табл. 3). Крім того, встановлено достовірне підвищення відносної маси селезінки на 28,6% при рівні дози 230 мг/кг ($p < 0,05$). Інших значних відмінностей відносної маси органів порівняно із контролем, що мали б систематичний характер, не зареєстровано. Дані відмінності можуть попередньо свідчити про вплив НЧЗ при внутрішньовенному введенні на вказані органи-мішені.

Хоч залізо і є незамінним нутрієнтом, необхідним для транспортування кисню, переносу електронів та каталізу, з іншого боку цей метал може у надлишку накопичуватися в організмі або навмисно чи випадково вводиться у токсичних дозах, що призводитиме до оксидативного стресу, розвитку гемохроматозу та онкологічних захворювань. Дослідження з токсичності нанозаліза переважно зосереджені на біологічних ефектах Fe^{2+} . Несприятливі біологічні ефекти іонів Fe^{2+} пояснюють властивістю каталізувати утворення гідроксильних радикалів ($OH\cdot$) із перекису водню у реакції Фентона. Вільні радикали є високоактивними, нестабільними молекулами, які можуть порушувати активність ферментів антиоксидантної системи, посилювати пероксидацію мембранних ліпідів і модифікацію нуклеїнових кислот та врешті призводити до загибелі клітин і пошкодження тканин організму [16, 18]. Так, в дослідженні на мишах встановлено, що наночастинки Fe_3O_4 розміром близько 35 нм при щоденному інтраперитонеальному введенні протягом тижня викликають дозозалежне порушення антиоксидантно-прооксидантної рівноваги в тканинах печінки і нирках, на користь чого свідчить зростання рівня маркерів оксидативного стресу, а саме реактивних сполук кисню, малонового діальдегіду, 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину, а також зниження вмісту глутатіону [23].

З іншого боку за даними літератури недостатньо досліджені особливості токсичності НЧЗ стосовно організму людини і тварин. Але у зв'язку із тим, що Fe^0 у НЧЗ окиснюється з утворенням Fe^{2+} та оксидів заліза, цей процес так само може призводити до утворення вільних радикалів і розвитку оксидативного стресу. Так, Keenan C. R. та співавторами в умовах *in vitro* встановлено утворення реактивних сполук кисню і окисне пошкодження епітеліальних клітин бронхів людини під впливом НЧЗ та продуктів їх окиснення до Fe^{2+} та Fe^{3+} [29]. При цьому часткове або повне окиснення НЧЗ призводить до зниження їх окисно-відновної активності, ступеня седиментації і агломерації, що, ймовірно, зменшує токсичність по відношенню до клітинних культур, виділених від ссавців. Модифікація поверхні також понижує токсичність НЧЗ шляхом зменшення їх седиментації та, як наслідок, зниження біо-

доступності [30]. Крім того, в процесі взаємодії НЧЗ і біологічних об'єктів також можуть відігравати роль й інші механізми. Зокрема експериментально показано, що в залежності від розміру і властивостей наночастинок відбуваються конформаційні перетворення фосфоліпідів, які можуть призводити до зміни фізико-хімічних властивостей клітинних мембран, або навіть утворення пор [22, 28].

Згідно даних літератури, після внутрішньовенного введення наночастинок оксидів заліза (НЧОЗ) – магнетиту (Fe_3O_4) та/або меггеміту ($\gamma-Fe_2O_3$) – підслідним тваринам спостерігається їх накопичення та підвищення вмісту заліза у таких органах-мішенях, як печінка і селезінка, що встановлено за допомогою атомно-абсорбційної спектроскометрії, радіонуклідних методів, надчутливої магнітометрії, електронної мікроскопії, магнітно-резонансної томографії, морфологічних методів тощо [11, 21, 26, 36, 37, 38, 41] (табл. 4). Крім того, залізо накопичується й у інших органах-мішенях: легенях, нирках, лімфатичних вузлах, кістковому мозку, серці тощо. Подібний органний розподіл спостерігається й після перорального введення НЧОЗ [14, 31] (табл. 4).

НЧЗ мають подібні фармакологічні властивості, про що свідчать нечисленні літературні дані стосовно їх проникнення у стінку травного тракту [6], а також зростання вмісту заліза у печінці після перорального введення НЧЗ лабораторним тваринам [42].

Зміна відносної маси органів мишей на 14 добу після одноразового внутрішньошлункового і внутрішньовенного введення НЧЗ, показана у даному дослідженні, може бути пов'язана із накопиченням наночастинок і впливом на вказані органи-мішені. Так, за літературними даними, на 15 добу після одноразового внутрішньовенного введення мишам НЧОЗ (Fe_3O_4) розміром 9 нм в дозах 102,4–250 мг/кг виявлено пошкодження структури серцевого м'язу і порушення функції нирок, про що свідчили білкові зліпки у каналцях нефронів, екстравазати [38]. Іншим авторським колективом показано, що пероральне введення непокритих НЧОЗ (Fe_3O_4) розміром 70 ± 10 нм щурам в дозах 250–1000 мкг/кг протягом 5 днів призводило до розвитку дозозалежних змін у внутрішніх органах тварин порівняно із контролем. Зокрема у шлунку спостерігалася повнокров'я судин підслизового шару, у нирках – ознаки дистрофії епітелію каналців нефрона, у печінці – дистрофічні зміни гепатоцитів, ознаки венозного повнокров'я, а у міокарді – зерниста дистрофія кардіоміоцитів. Але на думку авторів, ці зміни є оборотними [2]. Порушення мікроскопічної будови нирок, а також печінки і селезінки було встановлено також після п'ятиразового внутрішньошлункового введення даних наночастинок мишам [27]. В подальшому авторським колективом було встановлено, що стабілізовані цитратом наночастинки Fe_3O_4 розміром 23 ± 6 нм після одноразового (в дозі 700 мг/кг) або семиразового (в разовій дозі 250 мг/кг) внутрішньоочеревинного введення щурам не викликали порушень загального стану тварин та загибелі. За даними мікроскопічних досліджень наночастинки спричиняли морфологічні зміни в паренхіматозних органах, судинах, які, на думку авторів, є оборотними. При цьому одноразове

введення відносно високої дози наночастинок призводило до більш виражених морфологічних змін у органах детоксикації (печінці, нирках), а багаторазове введення менших доз – до змін органів імуногенезу (селезінки, лімфатичних вузлів) і менше порушувало мікроморфологію внутрішніх органів [1]. В дослідженні інших авторів, через 48 годин після одноразового внутрішньоочеревинного введення щурам наночастинок $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в дозах 266–1406 мкмоль Fe/кг значних відмінностей морфології печінки, селезінки, нирок і легень при світловій мікроскопії не було виявлено, порівняно із контролем [34].

За даними літератури НЧОЗ мають значний вплив на органи імуногенезу. Так, С.-С. Shen та співавторами показано, що НЧОЗ із середнім гідродинамічним розміром 58,7 нм, які одноразово внутрішньовенно вводили ми-

шам лінії BALB/c в дозах 10, 30 і 60 мг Fe/кг за одну годину перед сенсibiliзацією овальбуміном, викликали порушення імунної відповіді на даний антиген [7]. Пізніше авторським колективом повідомлено, що одноразове внутрішньовенне введення даних наночастинок із розрахунку 0,2–10 мг Fe/кг також спричиняло дозозалежне пригнічення реакцій сповільненої гіперчутливості на введення овальбуміну [25].

Системні ефекти спостерігаються також при одноразовій інтратрахеальній інстиляції НЧОЗ щурам в дозах 1 та 5 мг/кг. При цьому встановлено затримку зростання маси тіла тварин порівняно із контролем, а також значне дозозалежне зниження відносної маси легень в дослідних групах і транзиторне зменшення відносної маси печінки і нирок. Введення нанозаліза призводило до фокального та

Таблиця 4.

Органи-мішені при внутрішньовенному та пероральному шляхах введення нанозаліза лабораторним тваринам згідно даних літератури

| Посилання | Шлях введення | Вид тварин | Сполука заліза | Модифікація поверхні | Розмір наночастинок | Разова доза | Основні органи-мішені | Інші органи, в яких зареєстровано накопичення |
|-----------|---------------|------------|--------------------------------|-------------------------------------|---|--|----------------------------|--|
| [37] | в/в | Щури | Fe_3O_4 | Декстран | 120–180 нм (4,3–4,8 нм) ³ | 18 мкмоль Fe/кг (1 мг Fe/кг) | Печінка, селезінка | Нирки, легені, головний мозок |
| [41] | в/в | Щури | Fe_3O_4 | Декстран | Близько 5–10 нм | 40 мкмоль Fe/кг (близько 2,2 мг Fe/кг) | Печінка, селезінка | Лімфатичні вузли, кістковий мозок |
| [26] | в/в | Миші | Fe_3O_4 | DMSA ¹ та флюорофор | 12 нм (за даними TEM ²) | 2 та 5 мг/кг | Печінка, селезінка, нирки | Серце, легені |
| [38] | в/в | Миші | Fe_3O_4 | Відсутня | 9 нм | 0; 102,4; 128; 160; 200; 250 мг/кг | Печінка, селезінка, легені | Серце, нирки, головний мозок |
| [21] | в/в | Миші | Оксид заліза | Олеїнова кислота і PEG ⁴ | 13,3±1,8, 28,7±3,2 та 52,1±2,5 нм (5, 15 і 30 нм відповідно) ³ | 5 мг/кг | Печінка, селезінка | Нирки, легені |
| | | | | декстран | 153,0±11,9 нм (2–4 нм) ³ | | | Нирки |
| [11] | в/в | Щури | Оксид заліза | PHEA ⁵ | 66,1 нм (8–10 нм) ³ | 1 мг/кг | Печінка, селезінка, легені | Інші органи |
| [36] | в/в | Миші | $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ | PPA ⁶ | – | 10 мг/мл | Печінка | Нирки |
| [6] | per os | Щури | Металічне залізо (порошок) | – | Від 5–30 нм до 6–9 мкм | 5 г/100 мл молока | Стінка кишечника | В інших органах не визначали |
| [31] | per os | Миші | Fe_3O_4 | – | Близько 20 нм (за даними TEM ²) | 600 мг/кг | Печінка, селезінка | Серце, легені, нирки, головний мозок, шлунок, тонкий кишечник, кістковий мозок |
| [14] | per os | Щури | Fe_2O_3 | – | Близько 30 нм | 500, 1000 і 2000 мг/кг | Кров> селезінка> печінка | Нирки> серце> кістковий мозок |
| | | | | | Близько 2,15 мкм | | Печінка, селезінка | – |

Примітки: ¹ DMSA – M-2,3-димеркаптосукцинова кислота; ² – TEM – трансмісійна електронна мікроскопія; ³ – у дужках розмір кристалічного ядра наночастинок; ⁴ PEG – поліетиленгліколь; ⁵ PHEA – полігідроксиетиласпартамід; ⁶ PAA – поліакрилова кислота.

інтерстиційного запального процесу в легенях шурів, яке наприкінці першого місяця спостереження призводить до розвитку помірно вираженого фіброзу, ступінь якого є дозозалежною [32]. Резорбтивні ефекти після інгаляційного введення наночастинок Fe₂O₃ шурам в дозі 8,5 мг/кг 2 рази на день протягом 3 днів досліджені Wang L. та співавторами. При цьому встановлено зростання вмісту заліза у печінці і легеневій тканині на 36 годину експерименту, що призводило до значного пошкодження цих органів, а також до зміни низки біохімічних показників сироватки крові [8].

Висновки:

1. НЧЗ при внутрішньошлунковому введенні в дозі 5000 мг/кг не викликають порушення динаміки маси тіла самок мишей протягом 14-денного терміну спостереження, порівняно із контролем.

2. Динаміка зміни маси тіла мишей після одноразового внутрішньовенного введення НЧЗ в дозах від 130 до 305 мг/кг має дозову залежність та є подібною для обох статей.

2.1. При всіх застосованих дозах, окрім найменшої – 130 мг/кг, спостерігається зниження маси тіла тварин на 3-тю добу відновного періоду з наступним її відновленням на 7-му і подальшим зростанням на 14-ту добу.

2.2. В цілому при всіх дозах для обох статей встановлено відставання у розвитку і наборі маси тіла, порівняно із контролем.

3. На основі зміни відносної маси органів встановлено потенційні органи-мішені, а саме тимус, нирки і шлунок при внутрішньошлунковому та тимус, серце, печінку, селезінку і нирки, при внутрішньовенному шляхах введення НЧЗ у дозах 130–280 мг/кг.

Перспективи подальших досліджень.

Доцільне проведення подальших досліджень із встановлення впливу НЧЗ на мікроскопічну морфологію внутрішніх органів лабораторних тварин.

Рецензент: д.мед.н., професор Ніженковська І. В.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кун С. М. Морфологические изменения в тканях и органах лабораторных крыс с перевиваемым раком печени РС-1 при внутрибрюшинном введении цитрат-стабилизированных наночастиц железа / С. М. Кун // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – Т. 9, №3. – С. 380–384.
2. Наволокин Н. А. Морфологические изменения внутренних органов и головного мозга при пролонгированном пероральном введении наночастиц железа / Н. А. Наволокин, С. М. Кун // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 760–762.
3. Нанонаука, нанофармакологія, нанофармація: перспективи, досліджень, впровадження у медичну практику / В.Ф. Москаленко, І. С. Чекман, В. П. Черних [та ін.] // *Клінічна фармація*. – 2010. – Т. 14, №1. – С. 1–5.
4. Наукові основи наномедицини, нанофармакології та нанофармації / Москаленко В.Ф., В. М. Лісовий, І. С. Чекман [та ін.] // *Вісник НМУ ім. О. О. Богомольця*. – 2009. – №2. – С. 17–31.
5. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман // *Монографія*. – К.: Задруга, 2011. – 424 с.
6. A morphological and microanalytical investigation into the uptake of particulate iron across the gastrointestinal tract of rats / J. S. McCullough, G. M. Hodges, G. R. Dickson [et al.] // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* – 1995. – Vol. 27, N 1. – P. 119–124.
7. A single exposure to iron oxide nanoparticles attenuates antigen-specific antibody production and T-cell reactivity in ovalbumin-sensitized BALB/c mice / C.-C. Shen, C.-C. Wang, M.-H. Liao [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2011. – Vol. 6. – P. 1229–1235.
8. Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats / L. Wang, L. Wang, W. Ding [et al.] // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2010. – Vol. 10, N 12. – P. 8617–8624.
9. Anaemia in low-income and middle-income countries / Y. Balarajan, U. Ramakrishnan, E. Ozaltin [et al.] // *Lancet*. – 2011. – Vol. 378, N 9809. – P. 2123–2135.
10. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study / E. Okon, D. Pouliquen, P. Okon [et al.] // *Lab. Invest.* – 1994. – Vol. 71, N 6. – P. 895–903.
11. Biodistribution of newly synthesized PHEA-based polymer-coated SPION in Sprague Dawley rats as magnetic resonance contrast agent / J. Park, W. Cho, H. J. Park [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 4077–4089.
12. Chen P. J. Stabilization or oxidation of nanoscale zerovalent iron at environmentally relevant exposure changes bioavailability and toxicity in medaka fish / P. J. Chen, S. W. Tan, W. L. Wu // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 46, N 15. – P. 8431–8439.
13. Chen P. J. The zerovalent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in early life stages of medaka fish / P. J. Chen, W. L. Wu, K. C. Wu // *Water. Res.* – 2013. – Vol. 47, N 12. – P. 3899–3909.
14. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment / S. P. Singh, M. F. Rahman, U. S. Murty [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 266, N 1. – P. 56–66.
15. Crane R. A. Nanoscale zero-valent iron: future prospects for an emerging water treatment technology / R. A. Crane, T. B. Scott // *J. Hazard. Mater.* – 2012. – Vol. 211–212. – P. 112–125.
16. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology / H. Li, Q. Zhou, Y. Wu [et al.] // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2009. – Vol. 72, N 3. – P. 684–692.
17. El-Temseh Y. S. Ecotoxicological effects on earthworms of fresh and aged nano-sized zero-valent iron (nZVI) in soil / Y. S. El-Temseh, E. J. Joner // *Chemosphere*. – 2012. – Vol. 89, N 1. – P. 76–82.
18. Geisser P. Iron therapy and oxidative stress / P. Geisser // *Met. Based Drugs*. – 1997. – Vol. 4, N 3. – P. 137–152.
19. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging / K. Briley-Saebo, A. Bjuernerud, D. Grant [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2004. – Vol. 316, N 3. – P. 315–323.
20. Hodge H.C. Tabulation of toxicity classes / H.C. Hodge, L.H. Sterner // *Am. industr. Hyg. Ass. Quart.* – 1943. – V. 10, №4. – P. 93.
21. In vivo clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals / L. Gu, R. H. Fang, M. J. Sailor [et al.] // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6, N 6. – P. 4947–4954.
22. Interaction of nanoparticles with lipid membrane / Y. Roiter, M. Ornatka, A. R. Rammohan [et al.] // *Nano Lett.* – 2008. – Vol. 8, N 3. – P. 941–944.
23. Intraperitoneal injection of magnetic Fe₃O₄-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice / P. Ma, Q. Luo, J. Chen [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2012. – Vol. 7. – P.4809–4818.
24. Iron Deficiency Anemia. Assessment Prevention and Control. A Guide for Programme Managers. – Geneva: WHO, 2001. – 114 p.
25. Iron oxide nanoparticles suppressed T helper 1 cell-mediated immunity in a murine model of delayed-type hypersensitivity / C.C. Shen, H. J. Liang, C. C. Wang [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2012. – Vol. 7. – P. 2729–2737.
26. Manufacture of IRDye800CW-coupled Fe₃O₄ nanoparticles and their applications in cell labeling and in vivo imaging / Y. Hou, Y. Liu, Z. Chen [et al.] // *J. Nanobiotechnology*. – 2010. – Vol. 8. – P. 25.
27. Morphological changes in the kidney, liver and spleen during prolonged administration of iron nanoparticles / N. A. Navolokin, G. N. Maslyakova, A. B. Bucharskya [et al.] // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2012. – Vol. 345. – N 012043.
28. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes / B. Wang, L. Zhang, S. C. Bae [et al.] // *PNAS*. – 2008. – Vol. 105, N 47. – P. 18171–18175.
29. Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells / C. R. Keenan,

R. Goth-Goldstein, D. Lucas [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 43, N 12. – P. 4555–4560.

30. Partial oxidation (“aging”) and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron / T. Phenrat, T. C. Long, G. V. Lowry [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 43, N 1. – P. 195–200.

31. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice / J. Wang, Y. Chen, B. Chen [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2010. – Vol. 5. P. 861–866.

32. Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in vivo and in vitro experiments / B. Szalay, E. Tátrai, G. Nyíró [et al.] // *J. Appl. Toxicol.* – 2012. – Vol. 32, N 6. – P. 446–453.

33. Pumera M. Nanotoxicology: the molecular science point of view / M. Pumera // *Chem. Asian. J.* – 2011. – Vol. 6, N 2. – P. 340–348.

34. Research article iron oxide magnetic nanoparticles: characterization and toxicity evaluation by in vitro and in vivo assays / A. M. Prodan, S. L. Iconaru, C. S. Ciobanu [et al.] // *Journal of Nanomaterials* – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 587021. – 10 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/587021>

35. Santamaria A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology / A. Santamaria // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 926. – P. 1–12.

36. Superparamagnetic iron oxide polyacrylic acid coated α -Fe₂O₃ nanoparticles do not affect kidney function but cause acute effect on the cardiovascular function in healthy mice / N. K. Iversen,

S. Frische, K. Thomsen [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 266, N 2. – P. 276–288.

37. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity / R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad [et al.] // *AJR.* – 1989. – Vol. 152, N 1. – P. 167–173.

38. The in vivo investigation of Fe₃O₄-nanoparticles acute toxicity in mice / S. Zhao, X. Lin, L. Zhang [et al.] // *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.* – 2012. – Vol. 24, N 3. – P. 229–236.

39. Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish / P. J. Chen, C.H. Su, C. Y. Tseng [et al.] // *Mar. Pollut. Bull.* – 2011. – Vol. 63, N 5–12. – P. 339–346.

40. Toxicity of nano-zero valent iron to freshwater and marine organisms / A. A. Keller, K. Garner, R. J. Miller [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 8. – P. e43983.

41. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging / R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg [et al.] // *Radiology.* – 1990. – Vol. 175, N 2. – P. 489–493.

42. Whole-body retention and distribution of orally administered radiolabelled zerovalent iron nanoparticles in mice / Hughes M. F., Long T. C., Boyes W. K. [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2013. – Vol. 7, N 6. – P. 1064–1069.

43. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia / Ed. by B. de Benoist, E. McLean, I. Egli and M. Cogswell. – 2008. – 48 p.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА НА ИЗМЕНЕНИЕ МАССЫ ТЕЛА И ОТНОСИТЕЛЬНУЮ МАССУ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ У МЫШЕЙ

Дорошенко А.М.

Национальный медицинский университет
имени А. А. Богомольца, Киев, Украина

Резюме. Железодефицитная анемия является одним из наиболее распространенных патологических состояний, а также социальной проблемой, которая распространена как в развитых странах, так и в развивающихся, и приводит к неблагоприятным медицинским последствиям, например, снижению работоспособности у взрослых, замедленному когнитивному развитию у детей, а также увеличению материнской смертности. Наночастицы нуль-валентного железа (НЧЖ) обладают высоким потенциалом в области разработки новых противоанемических препаратов в связи с повышенной биологической активностью наночастиц металлов. Однако, проблема токсичности наноматериалов является ключевым параметром для оценки соотношения “риск-польза”. В качестве одного из этапов исследования безопасности в данной работе оценены изменения основных морфометрических показателей, таких как масса тела и весовые коэффициенты внутренних органов, после однократного внутривенного или внутривенного введения НЧЖ мышам. Текущее состояние изучение влияния наножелеза на внутренние органы также обсуждается в статье.

Ключевые слова: нанофармакология, безопасность, наночастицы железа, органы-мишени, морфометрические показатели, масса тела, относительная масса внутренних органов.

EFFECT OF IRON NANOPARTICLES ON THE CHANGES OF BODY WEIGHT AND INTERNAL ORGANS' RELATIVE WEIGHT OF MICE

A. Doroshenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Summary. Iron deficiency anemia is one of the most wide-spread pathological states as well as social problem, which affects developed and developing countries and leads to unfavourable medical consequences, such as decreased working capacity in adults, retarded cognitive development in children, and increase in maternal mortality etc. Zerovalent iron nanoparticles (FeNPs) are possessed by high potential in the area of the novel antianemic preparations' development due to the enhanced biological activity of metal nanoparticles. On the other hand, the problem of nanomaterials' toxicity is a key parameter in order to assess “risk-benefit” ratio. As a step of biosafety evaluation changes of main morphometric indices such as body weight and weight coefficients of internal organs have been evaluated after single intragastric or intravenous introduction of FeNPs to mice. The current state of art of nanoiron influence on the internal organs is also discussed in the study.

Key words: nanopharmacology, safety, iron nanoparticles, target organs, morphometric parameters, body weight, relative weight of internal organs.