

СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК ЗАЛІЗА ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЇХ БІОБЕЗПЕЧНОСТІ

¹Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ);

²Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)

Робота виконана за фінансової підтримки Проєкту ЦКПФД НАН України «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій» – 2012-2014 рр. «Розроблення та створення високоефективного протианемійного препарату нового покоління на основі наночастинок заліза для профілактики і лікування залізодефіцитної анемії та анемії хронічних захворювань», Недержавної реєстрації 0112U003421.

Вступ. Залізодефіцитна анемія (ЗДА) сьогодні є однією із важливих соціальних проблем світового масштабу. Близько 2 мільярдів людей на нашій планеті страждають на ЗДА [3, 6, 10, 14]. Згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров'я ЗДА є одним із найбільш розповсюджених патологічних станів, що зустрічаються в клінічній практиці, віднесена до третьої за важливістю серед хвороб, пов'язаних з дефіцитом харчування, займає дев'яте місце за значущістю [3, 14].

Особливе занепокоєння викликають основні групи ризику захворюваності на ЗДА: діти з перших років життя, жінки репродуктивного віку та вагітні жінки [1, 3, 5, 14].

За сучасними уявленнями ЗДА – це захворювання, яке виникає внаслідок дефіциту заліза в організмі при порушенні його надходження, засвоєння або патологічних втратах, і якому притаманні зниження рівня гемоглобіну в одиниці об'єму крові, зменшення середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитах, кількісні та якісні зміни останніх, зниження вмісту заліза в сироватці крові, клінічні прояви анемічної гіпоксії, сидеропенії та метаболічної інтоксикації [3].

Наслідками тривалого дефіциту заліза в організмі можуть бути: затримка та порушення фізичного, нервово-психічного, психомоторного, статевого розвитку; синдром хронічної втоми; патологічні зміни імунного статусу, дискоординація та погіршення роботи ендокринної, серцево-судинної та нервової систем; погіршення роботи шлунково-кишкового тракту [1, 3, 6].

З метою забезпечення надання ефективної медичної допомоги хворим на ЗДА сучасний ринок лікарських препаратів представлений значним арсеналом протианемічних препаратів, що характеризуються різним вмістом в них заліза та наявністю допоміжних компонентів, які впливають на фармакокінетику лікарських форм. За формою заліза існуючі препарати розділяють на дві групи: препарати солей заліза та препарати залізовмісних комплексів. Однак, усі вони зазвичай є недостатньо

ефективними та характеризуються низкою недоліків, основними з яких є низький рівень засвоєності, висока частота проявів побічних ефектів, серед яких нудота, анорексія, металевий присмак у роті, запори, диспепсичні розлади, значна тривалість курсу прийому препаратів (до 2-3 місяців) для досягнення терапевтичного ефекту [7, 10, 12].

Тому розробка і створення нових класів біобезпечних та біосумісних протианемічних препаратів сьогодні є надзвичайно актуальним завданням.

Значними перспективами на цьому шляху характеризуються наночастинок заліза, з огляду на їх унікальні фізико-хімічні властивості [13]. Виражений біологічний вплив наночастинок металів на молекулярному рівні дозволяє прогнозувати цільовий механізм дії та зниження ефективної терапевтичної дози протианемічного препарату при застосуванні в його складі наночастинок заліза як біологічно-активної субстанції. Це сприятиме досягненню швидкої терапевтичної ефективності протианемічного препарату, високій його терапевтичній безпечності та пролонгованому збереженню протианемічного ефекту.

Мета дослідження – синтез наночастинок заліза, їх фізико-хімічна характеристика та оцінка параметрів біобезпечності.

Об'єкт і методи дослідження. Наночастинок заліза (FeNP) синтезували за оригінальним протоколом, розробленим в Інституті біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України методом хімічної конденсації у водному середовищі шляхом відновлення хлориду заліза (III) борогідридом натрію.

Концентрація отриманої водної дисперсії наночастинок заліза складала 10,0 мг/мл за металом.

Розмір і форму синтезованих наночастинок заліза визначали методом трансмісійної електронної мікроскопії (трансмісійний електронний мікроскоп JEM-1230, «JEOL LTD», Японія).

Хімічний склад наночастинок заліза аналізували шляхом рентгеноструктурного мікроаналізу методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії (енергодисперсійний спектрометр IETEM 250 з детектором X-Max 80, Oxford Instruments Analytical, Великобританія для трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1230, «JEOL LTD», Японія).

Біобезпечність синтезованої субстанції наночастинок в тестах *in vitro* визначали з використанням показнику цитотоксичності, мутагенності, молекулярно-генетичного (показник генотоксичності), фізіологічного («стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини») та біохімічних (АТФ-азна і

лактатдегідрогеназна активність) маркерів згідно протоколів Методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджених Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України (протокол № 8 від 26.09.2013 р.) [4].

Біобезпечність наночастинок в тестах *in vivo* визначали за показником LD50 при пероральному та внутрішньовенному шляхах введення згідно [2, 11].

Показники LD50 при пероральному та внутрішньовенному шляхах введення визначали з використанням білих мишей лінії BALB/c обох статей масою 18–22 г віком 2–2,5 місяці [2]. Тварини, під час експерименту, утримувались у стандартних умовах віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Контрольним тваринам вводили розчинник – воду для ін'єкцій.

Реєстрацію і підрахунок загиблих тварин в кожному з рівнів доз субстанції наночастинок заліза здійснювали протягом 14 діб. На основі отриманих даних проводили пробіт-аналіз за D. J. Finney [8, 9] із застосуванням комп'ютерної програми BioStat 2009 for Windows (v5. 8. 4).

Дослідження на тваринах проводили 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.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерних програм BioStat 2009 for Windows (v5. 8. 4) та Microsoft Office Excel 2007. Для визначення достовірності відмінностей між середніми величинами застосовували параметричний критерій Стьюдента (*t*). Зміни показників вважали достовірними з рівнем значимості понад 95% ($p < 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення. З метою розроблення і створення

високоєфективного протианемічного препарату для профілактики і лікування залізодефіцитної анемії методом хімічної конденсації у водному середовищі шляхом відновлення хлориду заліза (III) синтезована стерильна висококонцентрована водна дисперсія наночастинок заліза.

Аналіз розміру і форми синтезованих наночастинок заліза, проведений методом трансмісійної електронної мікроскопії, засвідчив, що синтезовані наночастинки мали сферичну форму та середній розмір 40 нм (**рис. 1**).

Результати рентгеноструктурного мікроаналізу хімічного складу синтезованих наночастинок заліза, проведеного методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії, наведені на **рис. 2**.

Отримані дані засвідчили, що у складі наночастинок вміст заліза (Fe) становить 100% (**рис. 2**). Присутність у структурі частинки кисню не фіксується. Це є свідченням того, що синтезовані наночастинки є частинками нуль-валентного заліза (Fe⁰NP). Оксиди та гідроксиди заліза при мікроаналізі хімічного складу наночастинок не виявлялись.

Наступним етапом характеристики синтезованої субстанції було визначення параметрів її біобезпечності, оскільки висока біологічна безпечність та біосумісність потенційної фармацевтичної субстанції є необхідною умовою її подальших доклінічних і клінічних випробувань.

Біобезпечність синтезованої субстанції наночастинок заліза в тестах *in vitro* оцінювали за показниками цитотоксичності, мутагенності, генотоксичності, «стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини», та біохімічних маркерів (АТФ-азна і лактатдегідрогеназна активність) згідно вимог до паспорту безпеки наноматеріалу [4].

Так, в зразках тестових еукаріотичних клітин лінії СНО-K1, оброблених синтезованими наночастинками заліза у широкому концентраційному діапазоні, не було зафіксовано цитотоксичного впливу дослідженого наноматеріалу.

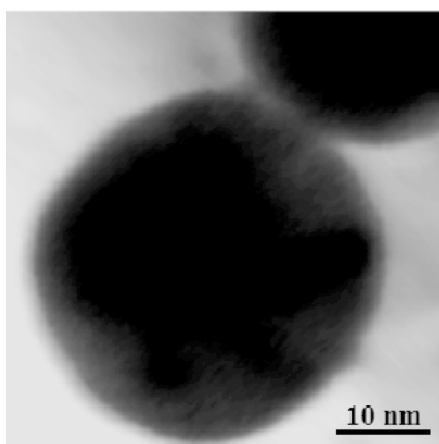


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення наночастинок заліза (FeNP), синтезованих методом хімічної конденсації у водному розчині.

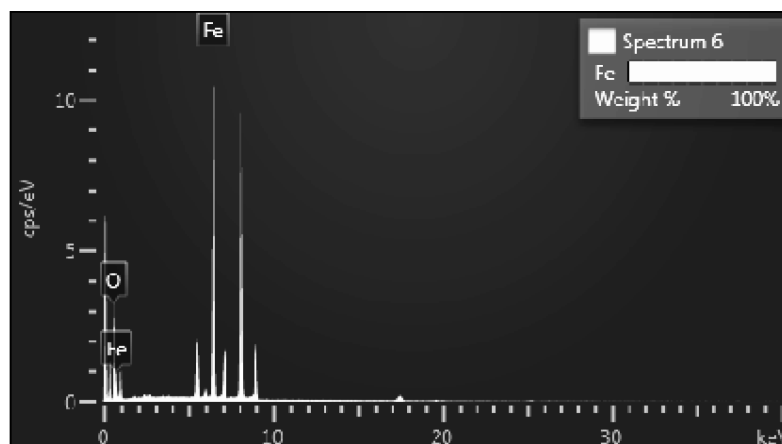


Рис. 2. Рентгеноструктурний мікроаналіз хімічного складу синтезованих наночастинок заліза (FeNP).

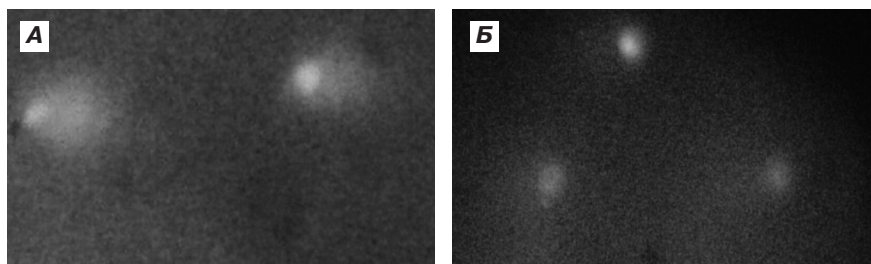


Рис. 3. Електрофоретичні зображення: А- ДНК, пошкодженої N-нітрозометилсечовиною (позитивний контроль – відомий генотоксикант); Б – ДНК, не пошкоджена під впливом наночастинок заліза.

Генотоксичного впливу синтезованих наночастинок заліза на тестові клітини також виявлено не було. Взаємодія синтезованих наночастинок з тестовими еукаріотичними клітинами не призводила до появи первинних ДНК-пошкоджень, порівняно із впливом N-нітрозометилсечовини, яка є відомим генотоксикантом (рис. 3, А). Типові електрофоретичні зображення ДНК клітин, оброблених наночастинок заліза представлені на рис. 3, Б.

Показник пошкоджень ДНК («індекс ДНК-комет» (I_{НК})) під впливом дослідженої субстанції наночастинок заліза в різних концентраціях, сягав значень, близьких до I_{НК} негативного контролю (нативні клітини).

Біобезпечність наночастинок заліза за показником «стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини» визначали за характером впливу синтезованої субстанції *in vitro* на пробіотичні культури *Lactobacillus acidophilus* AH200, *Bifidobacterium bifidum* L, *Escherichia coli* M-17. Отримані дані засвідчили відсутність токсичного впливу синтезованих наночастинок заліза за дослідженим фізіологічним маркером: статистично достовірного зменшення кількості КУО пробіотичних культур у присутності наночастинок заліза не спостерігалось.

Визначення особливостей впливу наночастинок заліза на біохімічні маркери безпеки наночастинок металів (АТР-азну активність сумарної мембранної фракції тестових еукаріотичних клітин лінії СНО-К1 та лактатдегідрогеназну активність їх цитозольної фракції) не виявило токсичного впливу наночастинок заліза в обох випадках.

Синтезовані наночастинок заліза характеризувались як біобезпечні в тестах на мутагенність з використанням поліхроматофільних еритроцитів кісткового мозку тварин.

Таким чином, встановлено, що синтезована експериментальна субстанція наночастинок нульвалентного заліза в умовах *in vitro* виявилася біобезпечною за визначеними маркерами.

Дослідження параметрів LD₅₀ синтезованих наночастинок заліза при пероральному та внутрішньовенному шляхах введення субстанції засвідчили наступне. Після одноразового внутрішньовенного введення Fe⁰NP протягом 14 діб спостереження в контрольній та дослідній групах не загинула жодна тварина (табл. 1).

LD₅₀ синтезованої субстанції при даному шляху введення перевищує 5000 мг/кг, що дозволяє віднести Fe⁰NP до практично нетоксичних речовин, тобто V класу токсичності за Hodge H. C. і Sterner L. H [9]. Лише протягом перших 3 годин у мишей дослідної групи спостерігалось транзиторне прискорення моторно-евакуаторної функції кишечника, а також чорне

забарвлення фекалій. В подальшому відмінностей в загальному стані, руховій активності, харчовій поведінці та наборі маси тіла тварин дослідної та контрольної груп протягом 14 діб спостереження виявлено не було.

На відміну від внутрішньошлункового введення, летальність мишей після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок мала дозозалежний характер (табл. 2).

Так, одразу після введення токсичних (летальних) доз наночастинок заліза у мишей розвивалися прояви інтоксикації, провідними симптомами яких були колапс, судоми, прояви набряку легень. На піку вказаних проявів частина тварин гинула. При цьому спостерігалась статеву чутливість дослідних тварин до дослідженої субстанції.

Таблиця 1

Летальність самок мишей після одноразового внутрішньошлункового введення наночастинок заліза протягом 14 діб спостереження

Групи тварин	Рівень дози, мг/кг	Загальна кількість тварин у групі	Кількість тварин, що загинула	
			абс.	%
Контрольна	0	n=5	0	0
Дослідна	5000	n=5	0	0

Таблиця 2

Загальна летальність самців і самок мишей (комбінований розрахунок) після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок заліза в залежності від рівня дози протягом 14 діб спостереження

Рівень дози, мг/кг	Самки і самці мишей, n=96		
	Кількість тварин, що загинула		Загальна кількість тварин
	абс.	%	
0	0	0	n = 16
180	3	18,75	n = 16
205	5	31,25	n = 16
230	8	50	n = 16
255	13	81,25	n = 16
280	15	93,75	n = 16

Таблиця 3

Значення середньосмертельної дози наночастинок заліза після одноразового внутрішньовенного та внутрішньошлункового введення мишам, мг/кг

Шлях введення	Внутрішньовенний			Внутрішньо-шлунковий
	Самки, n=64	Самці, n=56	Обидві статі, n=96	
Стать:				Самки, n=10
LD ₅₀	207,5 ± 10,6	231,4 ± 8,1	220,3 ± 7,1	>5000
Клас токсичності	IV	IV	IV	V

Примітка: LD₅₀ ± стандартна похибка.

У таблиці 3 наведені зведені розрахунки значень середньосмертельної дози (LD₅₀) наночастинок заліза після одноразового внутрішньовенного та внутрішньошлункового введення мишам.

Отримані значення LD₅₀ свідчать, що при внутрішньовенному способі введення синтезовані наночастинок належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) за Hodge H. C. і Sterner L. H.

Таким чином, фізико-хімічна характеристика та оцінка критеріїв біобезпечності в тестах *in vitro* та *in vivo* свідчать, що синтезовані сферичні наночастинок нуль-валентного заліза характеризуються низьким рівнем потенційної небезпеки: виявлена відсутність генотоксичної, цитотоксичної, мутагенної дії, негативного впливу на ключові біохімічні параметри та на загальний фізіологічний стан живого організму. Це дозволяє рекомендувати синтезовану субстанцію наночастинок заліза для подальших доклінічних досліджень.

Висновки.

1. Розроблено та реалізовано протокол колоїдно-хімічного синтезу у водному середовищі сферичних наночастинок нуль-валентного заліза розміром 40 нм.

2. Синтезована субстанція наночастинок заліза охарактеризована як біобезпечна в тестах *in vitro* за показниками цитотоксичності, генотоксичності, мутагенності, біохімічних маркерів та фізіологічного маркеру «стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини».

3. За показником LD₅₀ синтезовані наночастинок належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) при внутрішньовенному та до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) при внутрішньошлунковому шляхах введення мишам лінії BALB/c за класифікацією Hodge H. C. і Sterner L. H.

Перспективи подальших досліджень. В аспекті вивчення терапевтичної ефективності синтезованих наночастинок заліза як діючої речовини при створенні протианемічних препаратів актуальними є дослідження, спрямовані на визначення характеру впливу наночастинок в моделі залізодефіцитної анемії *in vivo*.

Колектив авторів висловлює щиру подяку кандидату біологічних наук Щербатюку Миколаю Миколайовичу за допомогу у проведенні електронно-мікроскопічних досліджень

Література

1. Безруков В. В. Вплив залізодефіцитної анемії вагітних на фізичний та психомоторний розвиток дітей раннього віку / В. В. Безруков // Буковинський медичний вісник. – 2002. – Т. 6, №2 – С. 135-137.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2002. – 527 с.
3. Марушко Ю. В. Залізодефіцитні стани у дітей на сучасному етапі / Ю. В. Марушко, О. О. Лісоченко // Здоров'я України. – 2008. – № 10/1. – С. 25-27.
4. Методичні рекомендації «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджені Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України (протокол № 8 від 26. 09. 2013). – Київ, 2013. – 108 с.
5. Anaemia in low-income and middle-income countries / Y. Balarajan, U. Ramakrishnan, E. Ozaltin [et al.] // Lancet. – 2011. – Vol. 378, №9809. – P. 2123–2135.
6. Crichton R. R. Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences / R. R. Crichton // John Wiley & Sons, Chichester, U. K., 2009. – 488 p.
7. Crichton R. R., Danielson B. G., Geisser P. Iron therapy with special emphasis on intravenous administration / R. R. Crichton, B. G. Danielson, P. Geisser. – Bremen : UNI-MED Verlag AG, 2005. – 96 p.
8. Finney D. J. Probit Analysis. – 3rd edition, chapt. 3 and 4. / D. J. Finney. – Cambridge : Cambridge University Press, 1971. – 333 p.
9. Hodge H. C., Sterner L. H. Tabulation of toxicity classes / H. C. Hodge, L. H. Sterner // Am. industr. Hyg. Ass. Quart. – 1943. – Vol. 10(4). – P. 93.
10. Iron Deficiency Anemia. Assessment Prevention and Control. A Guide for Programme Managers. – Geneva : WHO; 2001. – 132 p.
11. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects Test No. 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France : 2008. – 27 p.
12. Qunibi W. Y. The efficacy and safety of current intravenous iron preparations for the management of iron-deficiency anaemia: a review / W. Y. Qunibi // Arzneimittelforschung. – 2010. – Vol. 60(6a). – P. 399–412.
13. Characterization of zero-valent iron nanoparticles / Y. -P. Sun, X. Li, J. Cao, W. Zhang [et al.] // Advances in Colloid and Interface Science. – 2006. – Vol. 120, № 1–3. – P. 47–56.
14. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia / Ed. by B. de Benoist, E. McLean, I. Egli, M. Cogswell. – 2008. – 48 p.

УДК 615.07

СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК ЗАЛІЗА ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЇХ БІОБЕЗПЕЧНОСТІ

Резніченко Л. С., Дибкова С. М., Дорошенко А. М., Чекман І. С., Ульберг З. Р.

Резюме. Методом хімічної конденсації у водному середовищі за розробленим оригінальним протоколом синтезована стерильна висококонцентрована водна дисперсія сферичних наночастинок нуль-валентного заліза 40 нм. Синтезовані наночастинок охарактеризовані як біобезпечні за показниками цитотоксичності, генотоксичності, мутагенності, фізіологічним та біохімічними маркерами. Встановлено, що за показниками LD₅₀ наночастинок заліза належать до IV класу токсичності при внутрішньовенному та до V класу токсичності при внутрішньошлунковому шляхах введення за класифікацією Hodge H. C. і Sterner L. H.

Ключові слова: наночастинок заліза, синтез, фізико-хімічна характеристика, біобезпечність, цитотоксичність, генотоксичність, мутагенність, LD₅₀.

УДК 615.07

СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА И ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ БИОБЕЗОПАСНОСТИ

Резніченко Л. С., Дибкова С. М., Дорошенко А. М., Чекман І. С., Ульберг З. Р.

Резюме. Методом химической конденсации в водной среде согласно разработанного оригинального протокола синтезирована стерильная высококонцентрированная водная дисперсия сферических наночастиц нуль-валентного железа 40 нм. Синтезированные наночастицы охарактеризованы как биобезопасные по показателям цитотоксичности генотоксичности, мутагенности, физиологическому и биохимическим маркерам. Установлено, что по показателям LD₅₀ наночастицы железа принадлежат к IV классу токсичности при внутривенном и к V классу токсичности при внутрижелудочном путях введения согласно классификации Hodge H. C. и Sterner L. H.

Ключевые слова: наночастицы железа, синтез, физико-химическая характеристика, биобезопасность, цитотоксичность, генотоксичность, мутагенность, LD₅₀.

UDC 615.07

Synthesis of Iron Nanoparticles and their Biosafety Characterization

Rieznicenko L. S., Dybkova S. M., Doroshenko A. M., Chekman I. S., Ulberg Z. R.

Abstract. Iron deficiency anemia is one of the most wide-spread pathological states as well as social problems in the world. Pregnant women, children and elderly persons are particularly vulnerable. For the iron deficiency anemia' prevention and treatment modern pharmaceutical market proposes considerable series of antianemic preparations, which differ in iron form and concentration characteristics as well as in presence of the additives. Unfortunately, in most cases all types of these preparations are possessed by some disadvantages and drug side effects among which low bioavailability, nausea, anorexia, metal taste in mouth, constipation, protracted course of therapy (2–3 months) for achievement of therapeutic efficiency are the most widespread.

So, search and development of new class antianemic preparations for effective struggle with iron deficiency anemia is very actual problem today.

Iron nanoparticles are possessed by high potential in this area according to the expressed biological activity of metal nanoparticles on the molecular level.

Synthesis of iron nanoparticles, their physico-chemical characterization and estimation of the biosafety parameters was the main goal of this work.

The original protocol for iron nanoparticles' colloidal-chemical synthesis in water medium has been developed. The shape and size of synthesized iron nanoparticles has been defined by the method of transmission electron microscopy. It has been determined that synthesized nanoparticles have spherical form and average particles' size 40 nm. Chemical composition' X-ray microanalysis of the synthesized iron nanoparticles has been specified by the method of energy-dispersive X-ray spectroscopy. 100% of Fe content has been revealed in the nanoparticles. The presence of oxygen in the structure of the particles has not been fixed. This is an indication that the synthesized nanoparticles are particles of zero-valent iron (Fe⁰NP).

Synthesized iron nanoparticles have been characterized according to the biosafety level using *in vitro* and *in vivo* tests.

According to the Guidelines «Safety assessment of medical nanopreparations» parameters of cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, biochemical markers (ATP-ase and lactate dehydrogenase activities) and physiological marker «microflora state of the human gastrointestinal tract» have been used for biosafety level estimation *in vitro*. The synthesized Fe⁰NP have been characterized as biosafe and biocompatible: they were noncytotoxic, nongenotoxic, nonmutagenic and biosafe according to the used physiological and biochemical markers.

The parameters of LD₅₀ of the synthesized Fe⁰NP for the intragastric as well as intravenous routes of administration have been determined. LD₅₀ for the Fe⁰NP intragastric administration was greater than 5000 mg/kg. LD₅₀ for the Fe⁰NP intravenous administration was 220,3 ± 7,1 for both sexes of BALB/c mice.

It was revealed that synthesized iron nanoparticles belong to IV toxicity class (low toxic substances) for intravenous and V toxicity class (practically non-toxic substances) for intragastric routes of administration according to the Hodge H. C. and Sterner L. H. toxicological classification.

Key words: iron nanoparticles, synthesis, physico-chemical characterization, biosafety, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, LD₅₀.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 26. 05. 2014 р.