

УДК 636.064: 636.084:616.155.194.8:615.273.2

DOI: 10.31073/vet_biotech37-07

РЄЗНІЧЕНКО Л.С., канд. біол. наук, e-mail: lrieznichenko@gmail.com

Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України

Інститут ветеринарної медицини НААН

ДОРОШЕНКО А.М., канд. мед. наук, e-mail: andrew.m.doroshenko@gmail.com

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

ОЦІНКА БЕЗПЕЧНОСТІ НАНОЧАСТИНОК ЗАЛІЗА – СУБСТАНЦІЇ З ПРОТИАНЕМІЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ – ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ ЩУРАМ

В статті наведені результати визначення безпечності наночастинок заліза – субстанції з протианемічними властивостями – за умов їх перорального введення при лікуванні модельної залізодефіцитної анемії щурів. Показано, що після 10-денного введення наночастинок заліза в дозі 12 мг/кг/добу маркерні біохімічні показники крові (концентрація загального білірубіну, креатиніну, сечовини, активність аланінамінотрансферази, лужної фосфатази і лактатдегідрогенази) дослідних тварин не перевищували межі норми. Дослідження тканин внутрішніх органів – основних мішеней потенційного токсичного впливу наноматеріалів (печінки, селезінки і нирок) патологічних змін не виявило.

Ключові слова: *наночастинки заліза, протианемічна субстанція, пероральне введення, біохімічні маркери крові, органи-мішені, безпечність.*

Вступ. Завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям і високій біологічній активності наночастинок металів сьогодні є одними з лідерів серед речовин, на основі яких розробляються нові високоефективні засоби терапії і діагностики різних захворювань людини і тварин [1–4].

Зокрема, активно створюються лікарські препарати і діагностикуми на основі наночастинок заліза і їх оксидів [5–7]. Серед напрямків, в яких знаходять своє застосування наночастинок заліза, особливе місце посідає розробка лікарських засобів протианемічної дії [7, 8]. Адже відомо, що залізодефіцитна анемія є надзвичайно поширеним захворюванням, на яке за даними ВООЗ страждає близько чверті населення землі, при цьому найбільш уразливими категоріями є жінки репродуктивного віку і діти [9]. Гостро та з важкими наслідками дефіцит заліза переносять і сільськогосподарські тварини [10, 11]. На цьому тлі протианемічні препарати на основі наночастинок заліза можуть стати ефективним вирішенням проблеми як в гуманній, так і в ветеринарній медицині.

Водночас, висока біологічна активність наночастинок, разом із сподіваннями щодо ефективного подолання соціально-значущих захворювань, робить надзвичайно актуальним питання їх безпечності для організму людини і тварин. Підтвердженням цього є здатність наночастинок металів певної природи і розміру накопичуватися в органах і тканинах із високим ризиком прояву токсичного впливу [12]. До основних органів – потенційних мішеней акумуляції наночастинок металів, в тому числі і наночастинок заліза та їх оксидів, відносять печінку, селезінку і нирки [13, 14].

Таким чином, оцінка безпечності субстанцій з потенційною терапевтичною ефективністю є необхідною ланкою комплексу досліджень, спрямованих на визначення перспективності застосування таких речовин при створенні нових лікарських засобів.

Метою роботи було визначення безпечності наночастинок заліза – експериментальної субстанції з протианемічними властивостями – за умов їх перорального введення щурам при лікуванні модельної залізодефіцитної анемії.

Матеріал і методи досліджень. Показники безпечності визначали для сферичних наночастинок заліза (НЧЗ) середнього розміру 40 нм із 100% вмістом феруму у складі частинки. Експериментальна субстанція НЧЗ була синтезована методом хімічної конденсації у водному розчині в ІБКХ ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України.

Субстанція наночастинок була охарактеризована як безпечна в дослідженнях *in vitro* згідно критеріїв і норм Методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджених Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України (протокол №8 від 26.09.2013 р.) [15].

Досліди проводили на 60 самках щурів *Wistar* з модельованою залізодефіцитною анемією (ЗДА). Тварин отримували з віварію ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології імені академіка М. Д. Стражеска» НАМН України. Для розвитку ЗДА тварин із початковою масою 60–90 г утримували на залізодефіцитній дієті протягом 4 місяців. Контрольних умовно-здорових тварин утримували на дієті з нормальним вмістом заліза [16, 17].

Усі досліди 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. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» 2006 р.

Середня маса тварин на початку експерименту становила 220 ± 20 г.

Безпечність експериментальної субстанції НЧЗ досліджували за умов внутрішньошлункового введення наночастинок тваринам із модельною ЗДА в терапевтичній дозі 12,0 мг/кг на день [18].

Як препарат порівняння в оцінці безпечності субстанції наночастинок використовували заліза (III) гідроксид полімальтозний комплекс.

Дослідні тварини були розподілені на 4 групи:

Група 1 – контрольні умовно-здорові тварини (n=15, під час експерименту вводили еквівалентні об'єми води для ін'єкцій – розчинника субстанції НЧЗ);

Група 2 – контрольні тварини із модельною ЗДА без введення НЧЗ або препарату порівняння (n=15, під час експерименту вводили еквівалентні об'єми води для ін'єкцій);

Група 3 – тварини із модельною ЗДА, яким протягом 10 діб вводили експериментальну субстанцію НЧЗ у дозі 12 мг/кг/добу (n=15);

Група 4 – тварини із модельною ЗДА, яким протягом 10 діб вводили препарат порівняння (заліза (III) гідроксид полімальтозний комплекс, доза – 12 мг/кг/добу) (n=15).

Відбір біологічного матеріалу (кров, органи) здійснювали після завершення 10-денного курсу експериментального протианемічного лікування наночастинок заліза. Матеріали для аналізу отримували після евтаназії тварин із застосуванням хлороформного наркозу шляхом декапітації.

Як маркери безпечності аналізували зміни концентрацій загального білірубіну, креатиніну, сечовини, а також активності аланінамінотрансферази (АлАТ), лужної фосфатази (ЛФ) і лактатдегідрогенази (ЛДГ) в крові дослідних тварин.

Біохімічні показники у сироватці крові визначали із використанням наборів стандартних діагностиків для клініко-діагностичних та біохімічних лабораторій виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна) згідно протоколів виробника. Оптичну щільність розчинів вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-3 (Росія) та спектрофотометру СФ-46 («Ломо», Росія).

Разом із оцінкою змін маркерних біохімічних показників крові досліджували макроскопічну будову, відносну масу та морфологію тканин внутрішніх органів – основних мішеней потенційного токсичного впливу наноматеріалів (печінки, селезінки і нирок).

Для аналізу макроскопічної будови внутрішніх органів тварин вилучали печінку, селезінку і нирки. Органи промивали у фізіологічному розчині, надлишкову вологу прибирали за допомогою фільтрувального паперу та зважували на електронних вагах.

Відносні маси органів розраховували шляхом визначення співвідношення абсолютного значення маси органу до маси тіла даної тварини за формулою:

$$M_r = (m_a/m_b) \times 100, \text{ де}$$

M_r – відносна маса органу; m_a – абсолютна маса органу тварини (г); m_b – абсолютна маса тіла тварини (г); 100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки.

Для мікроскопічного дослідження шматочки органів та тканин фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, за стандартизованою методикою зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та заливали у парафін тип 6 (Richard-Allan Scientific, США) [19]. За допомогою ротаційного мікротому Leica RM-2125RT виготовляли парафінові зрізи. Гістологічні зрізи товщиною 4–5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, вивчали та фотографували за допомогою системи аналізу зображень на основі мікроскопу Olympus BX51 при збільшенні $\times 40$ – $\times 400$, використовували програмне забезпечення QuickPHOTO MICRO 3.0.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel з використанням критерію Стюдента [20].

Результати досліджень та їх обговорення. Як було нами показано раніше, досліджувана субстанція наночастинок заліза виявляє виражену протианемічну дію при лікуванні модельної залізодефіцитної анемії самок щурів *Wistar* [18]. Після десятиденного курсу перорального введення наночастинок у дозі 12 мг/кг/добу у дослідних тварин спостерігалась нормалізація концентрації гемоглобіну, відсоток насичення трансферину та сироваткового заліза крові більш виражена порівняно із терапевтичною дією препарату порівняння.

Разом з тим, висока терапевтична активність не може бути єдиною передумовою для використання нових речовин при створенні лікарських препаратів. Обов'язковою вимогою є максимальна безпечність біологічно-активної субстанції.

Для оцінки потенційного токсичного впливу експериментальної субстанції НЧЗ на організм в сироватці крові дослідних тварин визначали концентрації загального білірубину, креатиніну, сечовини, а також активність АлАТ, ЛФ і ЛДГ.

Аналіз отриманих результатів засвідчив, що середні значення досліджених біохімічних показників у щурів, яким вводили НЧЗ або препарат порівняння, знаходились у межах норми (табл. 1).

Таблиця 1

Біохімічні показники у сироватці крові щурів із залізодефіцитною анемією після 10 днів перорального введення наночастинок заліза, n=5

Групи тварин	Креатинін, мкмоль/л	Сечовина, ммоль/л	Білірубін загальний, мкмоль/л	АлАТ, ОД/л	ЛДГ, ОД/л	ЛФ, ОД/л
Контроль (умовно здорові тварини)	47,7±2,96	8,03±0,6	1,75±0,3	55,0±3,8	2428±170	58,1±7,2
Щури із ЗДА	44,0±2,3	6,45±0,43	4,21±1,9	67,0±3,8	2683±152	82,3±22,6
ЗДА+НЧЗ в дозі 12 мг/кг	42,0±1,7	6,53±0,55	2,67±0,3	59,3±3,2	2578±146	67,4±17,1
ЗДА + препарат порівняння	48,3±2,0	7,73±0,41	4,47±0,9*	68,7±2,0*	2397±95	65,4±10,3

Примітка: * – вірогідність різниці щодо групи I ($p<0,05$).

Згідно отриманих даних, НЧЗ за умови перорального введення щурам не спричиняли підвищення концентрації сечовини та креатиніну в сироватці крові порівняно з контролем, що свідчить про їх безпечність для нирок – одного з ключових органів – мішеней токсичного впливу наноматеріалів [21].

Досліджувана субстанція НЧЗ була також охарактеризована як безпечна для нирок і печінки за показниками концентрації загального білірубину і активності ЛФ, АлАТ і ЛДГ. Значення цих біохімічних маркерів не перевищували верхню межу норми для щурів. Концентрація загального білірубину і активність АлАТ достовірно відрізнялись від значень контролю лише в групі тварин, яким вводили препарат порівняння ($p<0,05$). Проте, зазначені параметри знаходились в діапазоні нормальних значень для щурів даного віку і статі, а саме: для загального білірубину – до 16 мкмоль/л, АлАТ – 40–94 ОД/л [22]. Отже, достовірна відмінність цих показників від контрольних значень для групи препарату порівняння, найбільш вірогідно, не є ознакою його токсичного впливу.

Таким чином, за біохімічними маркерами крові досліджена субстанція НЧЗ при пероральному введенні щурам із ЗДА в терапевтичній дозі 12 мг/кг/добу характеризується як безпечна.

Аналіз макроскопічної будови і відносної маси органів-мішеней дослідних тварин також не виявив проявів токсичного впливу НЧЗ.

Так, під час розтину серозні оболонки були блискучими, гладенькими, вільна рідина в плевральних і черевній порожнинах не спостерігалась.

Печінка була звичайних розмірів, капсула її гладенька, блискуча, тканина печінки однорідна, щільно-еластична, на розрізі брунатно-червонуватого

кольору. Змін відносної маси печінки через 1 добу після 10-денного введення НЧЗ у терапевтичній дозі, порівняно із контролем, не спостерігалось (табл. 2).

Таблиця 2

Відносні маси внутрішніх органів щурів із залізодефіцитною анемією через добу після 10 пероральних введеннь наночастинок заліза, n=5

Групи	Печінка	Селезінка	Нирка більша	Нирка менша
Контроль (умовно здорові тварини)	2,66±0,17	0,48±0,03	0,32±0,02	0,31±0,02
Щури із ЗДА	2,52±0,08	0,37±0,04	0,30±0,01	0,29±0,01
ЗДА + препарат порівняння	2,74±0,14	0,42±0,03	0,30±0,003	0,29±0,004
ЗДА + НЧЗ в дозі 12 мг/кг	2,77±0,15	0,56±0,11	0,30±0,01	0,28±0,01

Нирки були звичайної форми і розмірів. Відносна маса нирок після введення НЧЗ достовірно не відрізнялась від контрольних значень (табл. 2). Тканина нирок еластичної консистенції, без ознак патологічних змін з чіткою межею між кірковою та мозковою речовиною. Миски не розширені, слизова оболонка їх гладка, блідо-рожевого кольору.

Макроскопічна структура селезінки мала нормальні розміри, еластичну консистенцію без ознак гемоциркуляторних порушень, атрофії чи гіпертрофії. Відносна маса селезінки щурів дослідних груп достовірно не відрізнялась від контролю, що також попередньо є свідченням відсутності токсичного впливу НЧЗ на органи-мішені (табл. 2).

На гістологічних препаратах, отриманих від тварин з усіх груп, цитоархітектоніка печінки в цілому була не змінена, мала часточкову будову. Часточки приблизно однакових розмірів, розмежовані тонкими прошарками сполучної тканини. Центральна зона клітин зайнята округлими, добре структурованими ядрами з 1–2 ядерцями. Гепатоцити формували балочні структури, орієнтовані переважно радіально. Між балками розміщувались кровоносні синусоїди, що впадали у повнокровні центральні вени (рис. 1 А, Б).

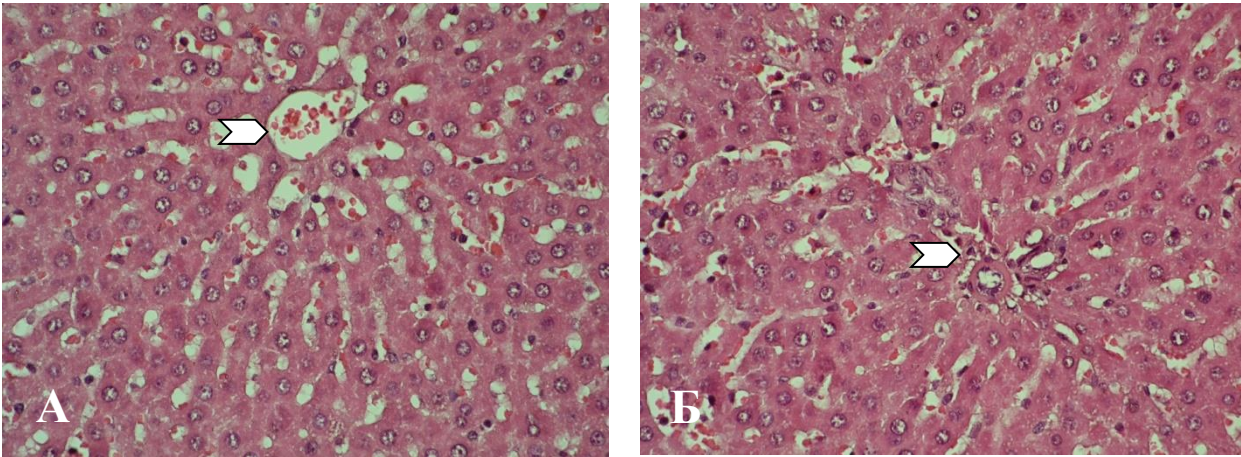


Рис. 1. Печінка щурів, які отримували курс лікування залізодефіцитної анемії із застосуванням наночастинок заліза.

Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$: А – збережена балочна будова, ядра гепатоцитів з 1–2 ядерцями, помірна кількість купферівських клітин, повнокровна центральна вена; Б – периферія печінкової дольки, в центрі – портальний тракт.

Капсула селезінки представлена волокнистими елементами. Від неї в товщу пульпи відходили численні трабекули. Лімфатичні фолікули білої пульпи представляли собою масивні круглі чи овоїдні скупчення лімфоцитів та ретикулярних клітин, в окремих з них розрізнялись реактивні центри (рис. 2А). Червона пульпа помірно повнокровна, складалась з венозних синусів, заповнених еритроцитами, макрофагами, лімфоцитами. В цитоплазмі макрофагів в усіх досліджуваних зразках містилась певна кількість гранулярного жовтувато-коричневого пігменту – гемосидерину (рис. 2Б) – залізовмісного білку, в якому залізо міцно зв'язане і є малодоступним для постачання цього металу для метаболічних процесів.

Морфологічна структура нирок не порушена. Численні клубочки в кірковій речовині приблизно однакових розмірів, целюлярність не збільшена, гломерулярна базальна мембрана не потовщена. Канальці проксимальної частини нефрону були встелені високими епітеліальними клітинами та мали вузький вільний просвіт. Кубічні епітеліальні клітини дистальних звивистих та збиральних каналців мали чіткі межі, слабкоеозинофільну гомогенну цитоплазму (рис. 3А). Стінки кровоносних судин не потовщені, в отворі їх – значна кількість еритроцитів. У однієї тварини з групи 2 (група з модельною ЗДА) в просвіті каналців спостерігались базофільні циліндри (рис. 3Б).

Отже, при проведенні світлової мікроскопії основних органів-мішеней – печінки, селезінки і нирок – на фоні експериментального курсу протианемічного лікування щурів із ЗДА за допомогою НЧЗ структурних змін,

які б свідчили про токсичний вплив наночастинок, порівняно із контрольними тваринами, не виявлено.

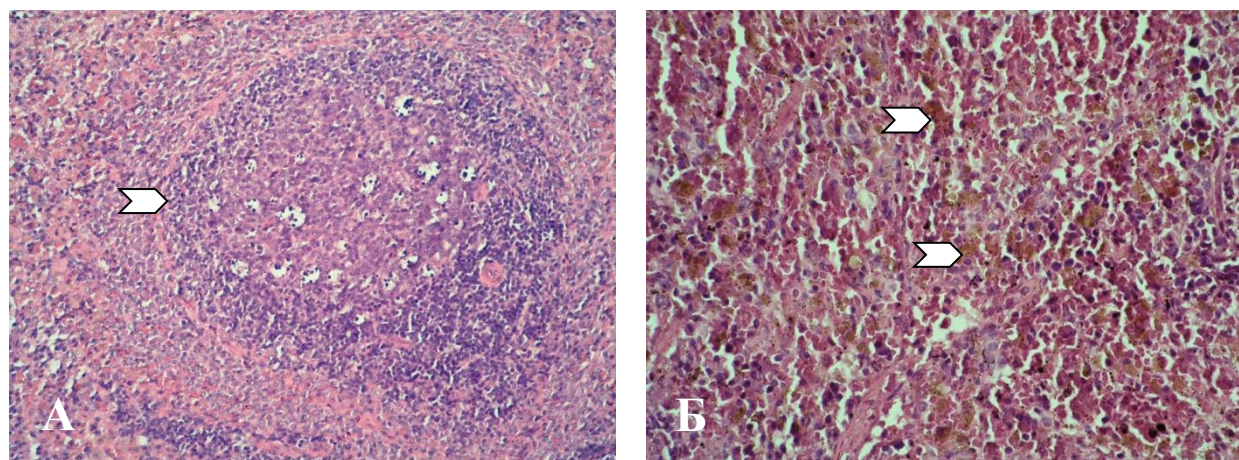


Рис. 2. Селезінка щурів, які отримували курс лікування залізодефіцитної анемії із застосуванням наночастинок заліза. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 100$: А – біла пульпа. Лімфатичний фолікул з реактивним центром, $\times 200$; Б – Червона пульпа. Велика кількість гранул гемосидерину в цитоплазмі макрофагів.

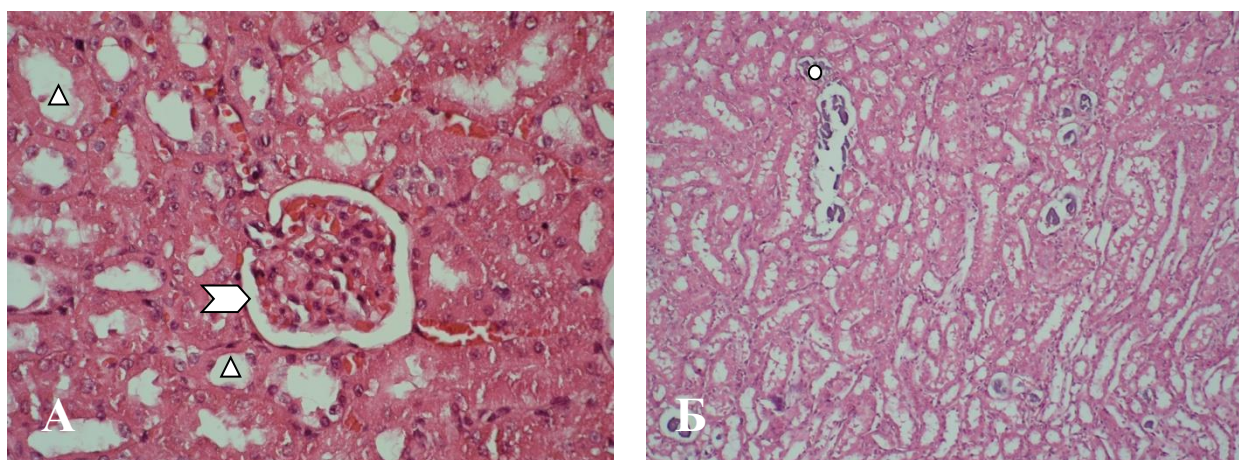


Рис. 3. Нирка щурів, які отримували курс лікування залізодефіцитної анемії із застосуванням наночастинок заліза. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 100$: А – кіркова речовина. Ниркове тільце звичайних розмірів. Проксимальні та дистальні звивисті канальці без особливостей, $\times 400$; Б – зовнішня зона мозкової речовини. В просвіті канальців – базofilний матеріал.

Таким чином, отримані дані щодо характеру впливу НЧЗ при пероральному введенні протягом 10 діб в застосованій дозі 12 мг/кг/добу на маркерні біохімічні показники крові і основні органи-мішені свідчать про безпечність дослідженої субстанції в зазначених умовах експерименту.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Показана безпечність наночастинок заліза – субстанції з протианемічними властивостями – за умов її перорального введення при лікуванні модельної залізодефіцитної анемії щурів.

2. Встановлено, що після 10-денного перорального введення наночастинок заліза в дозі 12 мг/кг/добу маркерні біохімічні показники крові (концентрація загального білірубину, креатиніну, сечовини, активність аланінамінотрансферази, лужної фосфатази і лактатдегідрогенази) дослідних тварин не перевищували межі норми.

3. Дослідження макроскопічної будови, відносної маси та морфології тканин внутрішніх органів – основних мішеней потенційного токсичного впливу наноматеріалів (печінки, селезінки і нирок) не виявило патологічних змін після десятиденного курсу перорального введення наночастинок заліза дослідним тваринам.

4. Наведені дані щодо безпечності протианемічної субстанції НЧЗ свідчать про її значний потенціал при створенні нових засобів профілактики і лікування залізодефіцитної анемії.

З огляду на те, що наночастинки заліза поряд із вираженою протианемічною активністю характеризуються відсутністю токсичного впливу на організм дослідних тварин, перспективи подальших досліджень полягають у розробці і створенні нового класу високоефективних безпечних протианемічних препаратів для потреб ветеринарної і гуманної медицини.

Подяка. Автори глибоко вдячні канд. мед. наук, ст. наук. сп. В.М. Непомнящому, завідувачу лабораторії патоморфології ДУ «Інститут нефрології Національної академії медичних наук України», за допомогу у морфологічних дослідженнях органів щурів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine / M. Rai, A.P. Ingle, S. Birla et al. // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2016. – Vol. 42(5). – P. 696–719.
2. Effects of nanocopper on copper availability and nutrients digestibility, growth performance and serum traits of piglets / A. Gonzales-Eguia, C.M. Fu, F.Y. Lu, T.F. Lien // *Livestock Science.* – 2009. – Vol. 126(1–3). – P. 122–129.
3. Hill E.K. Current and future prospects for nanotechnology in animal production / E.K. Hill, J. Li // *Journal of Animal Science and Biotechnology.* – 2017. – <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0157-5>.
4. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review / P.S. Swain, S.B.N. Rao, D. Rajendran et al. // *Animal Nutrition.* – 2016. – 2(3). – P. 134–141.
5. Theranostics aspects of various nanoparticles in veterinary medicine / D.P. Bai, X.Y. Lin, Y.F. Huang, X.F. Zhang // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19(11). – 3299. <https://doi.org/10.3390/ijms19113299>.

6. Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine / F.S. Youssef, H.A. El-Banna, H.Y. Elzorba, A.M. Galal // *Int J Vet Sci Med.* – 2019. – 7(1). – P. 78–93.
7. Garces V. et al. Bacteria-carried iron oxide nanoparticles for treatment of anemia / V. Garces, A. Rodríguez-Nogales, A. González et al. // *Bioconjugate Chem.* – 2018. – Vol. 29, Is. 5. – P. 1785–1791.
8. Treatment of anemia progression via magnetite and folate nanoparticles in vivo / H.H. Elsayed, A.M. Al-Sherbini, E.E. Abd-Elhady, K.A. El Aziz. Ahmed // *ISRN Nanotechnology.* – 2014. – Article ID 287575.
9. Abbaspour N. Review on iron and its importance for human health / N. Abbaspour, R. Hurrell, R. Kelishadi // *J. Res. Med. Sci.* – 2014. – Vol. 19, No. 2. – P. 164–174.
10. Применение суиферровита для профілактики залізодефіцитної анемії поросят / В.К. Пономарєв, Т.А. Стручкова, В.И. Сорокин, О.В. Симонова // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* – 2014. – С. 102–104.
11. Iron supplementation in suckling piglets: an ostensibly easy therapy of neonatal iron deficiency anemia / M. Szudzik, R.R. Starzyński, A. Jończy, et al. // *Pharmaceuticals.* – 2018. – Vol. 11. – 128. <https://doi.org/10.3390/ph11040128>.
12. Health concerns of various nanoparticles: a review of their in vitro and in vivo toxicity / M. Ajdary, M.A. Moosavi, M. Rahmati, et al. // *Nanomaterials (Basel).* – 2018. – Vol. 8(9). – 634. <https://doi.org/10.3390/nano8090634>.
13. 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.
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, No. 1. – P. 56–66.
15. 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.
16. Reeves P.G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet / P.G. Reeves, F.H. Nielsen, Jr. G.C. Fahey // *J. Nutr.* – 1993. – Vol. 123(11). – P. 1939–1951.
17. Kamei A. Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study / A. Kamei, Y. Watanabe, T. Ishijima et al. // *Physiol Genomics.* – 2010. – 42(2). – P. 149–156.
18. Резніченко Л.С. Наночастинки заліза як ефективний засіб профілактики і лікування залізодефіцитної анемії тварин / Л.С. Резніченко, С.М. Дибкова, А.М. Дорошенко // *Ветеринарна біотехнологія.* – 2019. – Вип.35. – С. 116–128.
19. Микроскопическая техника / [Под ред. – Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова]. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
20. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов. / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
21. Gaharwar U.S., Meena R., Rajamani P. Biodistribution, clearance and morphological alterations of intravenously administered iron oxide nanoparticles in male wistar rats / U.S. Gaharwar, R. Meena, P. Rajamani // *International Journal of Nanomedicine.* – 2019. – Vol. 14. – P. 9677–9692.

22. Baseline hematology and clinical chemistry values for Charles-River Wistar rats – (CRL: (WI)BR) as a function of sex and age / [Charles River Laboratories]. – Wilmington: Charles River Techn. Bull., 1998. – 4 p.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА – СУБСТАНЦИИ С АНТИАНЕМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ – ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ / Резниченко Л.С., Дорошенко А.М.

В статье представлены результаты определения безопасности наночастиц железа – субстанции с антианемическими свойствами – в условиях их перорального введения при лечении модельной железodefицитной анемии крыс. Показано, что после 10-дневного введения наночастиц железа в дозе 12 мг/кг/сутки маркерные биохимические показатели крови (концентрация общего билирубина, креатинина, мочевины, активности аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы) подопытных животных не превышали границы нормы. Исследование тканей внутренних органов – основных мишеней потенциального токсического влияния наноматериалов (печени, селезенки, почек) патологических изменений не выявило.

Ключевые слова: наночастицы железа, антианемическая субстанция, пероральное введение, биохимические маркеры крови, органы-мишени, безопасность.

SAFETY ASSESSMENT OF THE IRON NANOPARTICLES – A SUBSTANCE WITH ANTIANEMIC PROPERTIES – UNDER THE ORAL ADMINISTRATION TO RATS / Rieznichenko L.S., Doroshenko A.M.

Introduction. *Safety assessment of the nanomaterials with potential therapeutic efficacy is a necessary part of studies aimed to determine the prospects for the use of such substances in the development of new drugs.*

The goal of the work *was to determine the safety of iron nanoparticles - an experimental substance with antianemic properties - under their oral administration to rats during the treatment of model iron deficiency anemia.*

Materials and methods. *Synthesized spherical iron nanoparticles with an average particles size 40 nm were used in this study. The safety of the nanoparticles was studied under their oral administration to female Wistar rats during the treatment of model iron deficiency anemia. Potential toxic influence of the substance was estimated after the 10-days treatment course of the nanoparticles oral administration at a dose of 12 mg/kg. Iron(III)-hydroxide polymaltose complex (IPC) was used as comparison drug. Blood parameters (concentration of total bilirubin, creatinine, urea, alanine aminotransferase activity, alkaline phosphatase activity and lactate dehydrogenase activity) were analysed using standard biochemical kits. Together with the assessment of changes in the blood biochemical markers the macroscopic structure, relative mass and tissue morphology of the main target organs (liver, spleen and kidneys) were studied.*

Results of research and discussion. *It was shown that after 10 days of iron nanoparticles' oral administration at a dose of 12 mg/kg/day the studied biochemical blood markers (concentration of total bilirubin, creatinine, urea, ALT activity, alkaline phosphatase activity and LDH activity) in experimental animals did not exceed the control level. The study of the liver,*

spleen and kidneys tissues (the main targets for potential toxic influence of nanomaterials) did not reveal the pathological changes.

Conclusions and prospects for further research. Based on the obtained data it was revealed high safety of the studied iron nanoparticles (an experimental substance with antianemic properties) when administered orally for 10 days at a dose of 12 mg/kg/day during the treatment of model iron deficiency anemia.

The prospects for further research are development of a new class of high effective and safe antianemic preparations for human and veterinary medicine.

Keywords: iron nanoparticles, antianemic substance, oral administration, blood biochemical markers, target organs, safety.

REFERENCES

1. Rai, M., Ingle, A.P., Birla, S., Yadav, A., & Santos, C.A. (2016). Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit. Rev. Microbiol.*, 42(5), 696-719.
2. Gonzales-Eguia, A., Fu, C.M., Lu, F.Y., & Lien, T.F. (2009). Effects of nanocopper on copper availability and nutrients digestibility, growth performance and serum traits of piglets. *Livestock Science*, 126(1-3), 122-129.
3. Hill, E.K., & Li, J. (2017). Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. – <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0157-5>.
4. Swain, P.S., Rao, S.B.N., Rajendran, D., Dominic, G., & Selvaraju, S. (2016). Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. *Animal Nutrition*, 2(3), 134-141.
5. Bai, D.P., Lin, X.Y., Huang, Y.F., & Zhang, X.F. (2018). Theranostics aspects of various nanoparticles in veterinary medicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 3299; <https://doi.org/10.3390/ijms19113299>.
6. Youssef, F.S., El-Banna, H.A., Elzorba, H.Y., & Galal, A.M. (2019). Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *Int J Vet Sci Med.*, 7(1), 78-93.
7. Garcés, V., Rodríguez-Nogales, A., González, A., et al. (2018). Bacteria-carried iron oxide nanoparticles for treatment of anemia. *Bioconjugate Chem*, 29, 5, 1785-1791.
8. Elsayed, H.H., Al-Sherbini, A.M., Abd-Elhady, E.E., & El Aziz. Ahmed, K.A. (2014). Treatment of anemia progression via magnetite and folate nanoparticles in vivo. *ISRN Nanotechnology*, Article ID 287575.
9. Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci.*, 19, 2, 164-174.
10. Ponomaryov, V.K., Struchkova, T.A., Sorokin, V.I., & Simonova, O.V. (2014). Primeneniye suiferrovita dlya profilaktiki zhelezodefitsitnoy anemii porosyat [Use of suiferrovit for prevention and treatment iron deficiency anemia in piglet]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 102-104 [in Russian].
11. Szudzik, M., Starzyński, R.R., Jończy, A., Mazgaj, R., Lenartowicz, M., & Lipiński, P. (2018). Iron supplementation in suckling piglets: an ostensibly easy therapy of neonatal iron deficiency anemia. *Pharmaceuticals*, 11, 128; <https://doi.org/10.3390/ph11040128>.
12. Ajdary, M., Moosavi, M.A., Rahmati, M., et al. (2018). Health concerns of various nanoparticles: a review of their in vitro and in vivo toxicity. *Nanomaterials (Basel)*, 8(9), 634, <https://doi.org/10.3390/nano8090634>.

13. Park, J., Cho, W., Park, H. J., et al. (2013). Biodistribution of newly synthesized PHEA-based polymer-coated SPION in Sprague Dawley rats as magnetic resonance contrast agent. *Int. J. Nanomedicine*, 8, 4077-4089.
14. Singh, S.P., Rahman, M.F., Murty, U.S., et al. (2013). Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 266, 1, 56-66.
15. [Guidelines "Safety assessment of medical nanopreparations" approved by the Scientific Expert Council of the State Expert Centre of the Ministry of Health of Ukraine] (protocol No.8, 09.26.2013). Kyiv, 2013.
16. Reeves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey, Jr.G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 123(11), 1939-1951.
17. Kamei, A., Watanabe, Y., Ishijima, T., et al. (2010). Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiol Genomics*, 42(2), 149-156.
18. Rieznichenko, L.S., Dybkova, S.M., & Doroshenko, A.M. (2019). Iron nanoparticles as an effective means for prevention and treatment of iron deficiency anemia in animals. *Veterinarna biotehnologiya - Veterinary biotechnology*, 35, 116-128 [in Ukrainian].
19. Sarkisova, D.S., & Perova, Yu.L. (1996). (Eds.). *Mikroskopicheskaia tekhnika [Microscopic technique]*. M.: Medicine [in Russian].
20. Lakin, G.F. (1990). *Biometriya: uchebnoye posobiye dlya biologicheskikh spetsialnostey VUZov [Biometrics: a textbook for the biological specialties of universities]*. M.: Vysshaya shkola [in Russian].
21. Gaharwar, U.S., Meena, R., & Rajamani, P. (2019). Biodistribution, clearance and morphological alterations of intravenously administered iron oxide nanoparticles in male wistar rats. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9677-9692.
22. Baseline hematology and clinical chemistry values for Charles-River Wistar rats – (CRL: (WI)BR) as a function of sex and age / [Charles River Laboratories]. (1998). *Wilmington: Charles River Techn. Bull.*