

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота
освітній ступінь – магістр

на тему: **«ВПЛИВ ЧАСТИНОК ОКСИДУ ЗАЛІЗА РІЗНОЇ
ДИСПЕРСНОСТІ НА ПОКАЗНИКИ ПРИРОДНОГО ІМУНІТЕТУ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання,
Спеціальності
091 Біологія

Герасімова Ольга Володимирівна

Керівники:

Дмитруха Н.М,
доктор біологічних наук

Білько Н. М.,
доктор медичних наук, професор

Рецензент: Демецька О. В., кандидат
біологічних наук, доцент

Магістерська робота захищена з оцінкою

Секретар ЕК _____

« ____ » червня 20__ року

ЗМІСТ

ВСТУП _____	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ _____	6
1.1 Нанотехнології: теоретичний базис, сфери використання в сучасному світі. Характеристика базових структур наночастинок _____	6
1.1.1. Поняття нанотехнологій, сфери їх використання в біології та медицині. _____	6
1.1.2. Наночастинки та їх основні компоненти. _____	7
1.2. Використання наночастинок металів та їх оксидів в медико-біологічних цілях _____	9
1.3. Механізми розвитку цитотоксичних процесів внаслідок впливу наночастинок сполук заліза та їх наслідки для організму _____	15
1.4. Основні напрямки використання наночастинок оксидів заліза в медико-біологічних цілях. _____	19
1.4.1. Магнітна гіпертермія. _____	19
1.4.2. Контраст при МРТ. _____	20
1.4.3. Таргетна доставка препаратів. _____	20
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ _____	22
2.1. Об'єкт та предмет дослідження _____	22
2.2. Методика експерименту _____	22
2.3. Обладнання та методи _____	23
2.3.1. Загальний аналіз крові. _____	23
2.3.2. Статистична обробка даних. _____	23
2.3.3. Оцінка адаптаційних можливостей організму _____	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ АНАЛІЗ _____	25
3.1. Модель гострої інтоксикації наночастинками оксиду заліза _____	25
3.2. Модель субхронічної інтоксикації наночастинками оксиду заліза _____	30
3.3. Оцінка адаптаційних можливостей організму після інтоксикації наночастинками оксиду заліза _____	35
3.3.1 Оцінка адаптивних реакцій при гострій інтоксикації. _____	35
3.3.2 Оцінка адаптивних реакцій при субхронічній інтоксикації. _____	36
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ _____	38
ВИСНОВКИ _____	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	41

ВСТУП

Стрімкий науково-технологічний прогрес на межі біології, хімії та фізики в другій половині ХХ століття – розвиток електронної мікроскопії, молекулярної біології, винайдення імуноферментного аналізу, – розширив можливості вчених та медиків щодо міркувань та появи нових гіпотез на тему «занурення» в клітину для досліджень, діагностики та терапевтичних заходів. Розвиток нових методів дослідження, таких, як електронна мікроскопія, надав біологам практичний апарат для роботи з об'єктами нанорозмірів (від 10^{-9} до 10^{-7} м), що створило можливості більш глибокого дослідження клітин, їх «препарування», вивчення механізмів функціонування клітинних структур та накопичення знань, які наразі є базисом для клітинної та молекулярної біології та медицини [17,26].

Розвиток молекулярної біології, що спричинив виокремлення її як повноцінної наукової галузі, актуалізував дослідження, пов'язані із застосуванням нанотехнологій в сфері медицини та біології. Переведення значної частини біологічних досліджень на молекулярний рівень в свою чергу спричинило потребу у неорганічних або композитних наномаркерах і стало однією з причин звернення уваги на металеві наночастинки як один із засобів для візуалізації зображень та моделювання таких біологічних процесів, як ендоцитоз (фагоцитоз як його окремий випадок) [7].

При виробництві маркерів та контрастів важливими характеристиками є їх біологічна інертність та безпечність. Тому їх підбір є одним з основних викликів перед біологами та хіміками, що проводять дослідження з використання наноматеріалів у біології та медицині. Для перевірки біобезпечності та біосумісності наночастинок вчені проводять дослідження *in vitro* – для симуляції впливу наночастинок на окремі тканини, – та *in vivo* – для отримання загальної картини впливу досліджуваних частинок на організм. Ці дослідження є одним з основних етапів перевірки біобезпечності

та біосумісності наночастинок без якого клінічне використання будь-яких наноматеріалів не допускається.

Оскільки використання наночастинок металів та їх сполук може призводити до їх накопичення в організмі, руйнування внаслідок біохімічних реакцій та утворення нових сполук, що мають цитотоксичні властивості, їх застосування в медико-біологічних цілях пов'язане із значними ризиками. Крім бажаних для певних медико-біологічних цілей властивостей наночастинок мають бути біологічно інертними, тому для їх використання в медицині критично важливим є підбір матеріалів з мінімальною цитотоксичністю порівняно з потенційними перевагами використання.

Дослідженнями проблеми потенційної токсичності наночастинок металів та їх оксидів займалися вчені з багатьох країн світу (V. Zavisova, M. Mahmoudi, M. Auffan та ін.). В Україні над перевіркою біобезпечності та біосумісності наночастинок, що використовуються у медико-біологічних цілях, займаються співробітники лабораторії промислової токсикології та гігієни праці при використанні хімічних речовин ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І.Кундієва НАМН України» (Трахтенберг І. М., Короленко Т. К., Дмитруха Н. М. та ін.) та інші дослідники (Романюк А.М., Чекман І. С., Рудна М.М., Дорошенко А. М. та ін.).

Актуальність теми обумовлена зростанням інтересу до використання наночастинок Fe_2O_3 в різних напрямках медичних та біологічних досліджень, у зв'язку з чим виникає необхідність оцінки залежності токсичного впливу наночастинок Fe_2O_3 на показники природного імунітету від їх дисперсності, отриманої дози, кількості отриманих доз та тривалості експозиції в організмі.

Метою роботи є вивчення впливу наночастинок оксиду заліза на показники системи природного імунітету.

Об'єктом дослідження є система природного імунітету щурів.

Предметом дослідження є зміни системи природного імунітету під дією наночастинок оксиду заліза різної дисперсності.

Для виконання поставленої мети було сформульовано наступні

завдання:

1. Моделювання гострої та субхронічної інтоксикації на групах щурів, шляхом введення їм наночастинок оксиду заліза;
2. Дослідження впливу розмірів наночастинок на можливий розвиток цитотоксичних процесів;
3. Оцінка адаптаційних можливостей організму щурів після інтоксикації наночастинками оксиду заліза.

Експериментальну частину роботи було виконано на базі лабораторії промислової токсикології та гігієни праці при використанні хімічних речовин ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І.Кундієва НАМН України»

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Нанотехнології: теоретичний базис, сфери використання в сучасному світі. Характеристика базових структур наночастинок

1.1.1. Поняття нанотехнологій, сфери їх використання в біології та медицині. Завдяки стрімкому розвитку нанотехнологій та молекулярної біології та паралельно з ним наприкінці ХХ – на початку ХХІ століття постали перспективи використання наноматеріалів в медико-біологічних цілях. В цей період в біологічних та медичних дослідженнях набуло поширення використання цілого спектру наноматеріалів – від карбонполімерів та інших моно- чи диелементних матеріалів до складних композитів та біочастинок. Серед біологічних наноматеріалів основну увагу дослідників привертають такі органічні матеріали, як ДНК та білки, використання яких в перспективі можливе в діагностиці, біологічних дослідженнях та терапевтичних цілях [17].

Концепцію нанотехнологій в сучасному розумінні було запропоновано американським науковцем-фізиком та Нобелівським лауреатом Річардом Фейнманом у 1959 році в ході щорічного зібрання Американського товариства фізиків в Каліфорнійському Технологічному Інституті, коли під час своєї доповіді «There's Plenty of Room at the Bottom» він висловився: «Чому ми не можемо записати всі 24 томи Британської Енциклопедії на голівці шпильки?» (ориг. «*Why can't we write the entire 24 volumes of the Encyclopedia Britannica on the head of a pin?*») [26]. Хоча ідеї, викладені Фейнманом в доповіді, тоді могли здатися фантастичними, а для широкого загалу на той час лекція пройшла майже непоміченою, саме він став основоположником концепції нанотехнологій та окреслив переваги та перспективи їх використання.

Завдання, запропоновані Фейнманом наприкінці його лекції, зокрема т.зв. «проковтування хірурга», та їх вплив простежуються перш за все в тому,

що більшість сучасних розробок в сфері нанотехнологій останнього десятиліття, придатних до практичного використання в медицині, дозволяє оперувати в буквальному сенсі під мікроскопом, з використанням мікроскопічних «рук», з потенційною перспективою зменшення до розмірів клітин. Хоча на даний момент такі конструкти відсутні, з урахування темпів досліджень в галузі нанотехнологій, можна припустити, що такі прототипи для медико-біологічного використання можуть бути створені вже в цьому десятилітті.

За відсутності таких прототипів медичним галузям доводиться спиратися на наявні та вивчені матеріали, особливо в таких сферах, як діагностика та терапія хвороб. Наночастинки металів та їх оксиди є однією з груп таких матеріалів, що, за деякими винятками, знайшли найбільш широке використання в різних сферах медицини.

1.1.2. Наночастинки та їх основні компоненти. Спільною характеристикою більшості використовуваних для медичних цілей наночастинок металів та їх сполук є їх форма (внаслідок частого об'єднання наночастинок у комплекси у водному чи колоїдному середовищі розміри можуть варіювати). Найбільш застосовуваною в медико-біологічних цілях формою наночастинок є куля, оточена гідратною оболонкою [43]. Це пояснюється тим, що куля є найбільш енергетично вигідною формою для структури заданого об'єму, внаслідок чого зменшується площа поверхні, тертя частинок в середовищі, і, як наслідок, збільшується їх біологічна проникність – а також витрати матеріалу на створення оболонки.

Переважає більшість наночастинок сферичної форми має не тільки основну, внутрішню, частину, яку називають ядром (англ. «*core*»), але і оболонку, або кору (англ. «*shell*») – зовнішній шар з різних матеріалів, причому його товщина може значно відрізнятися від розміру ядра, як показано на рис. 1.1 [18,23]. Характеристики наночастинок, зокрема, їх гідрофільність чи гідрофобність, поверхневий заряд оболонки та її товщина, залежать в першу чергу від речовин, використаних для формування кори

частинок та їх специфічних властивостей [12,35,40]. Наявність оболонки є критичним фактором для наночастинок, використовуваних в медико-біологічних цілях, оскільки наявність зовнішнього біологічно інертного шару зменшує ризик дисоціації ядра на окремі молекули, підвищує стабільність наночастинок та знижує їх токсичність. Крім того, використання біополімерів для формування оболонки дозволяє маскувати частинки, знижуючи рівень неспецифічної імунної відповіді на введення чужорідного подразника.

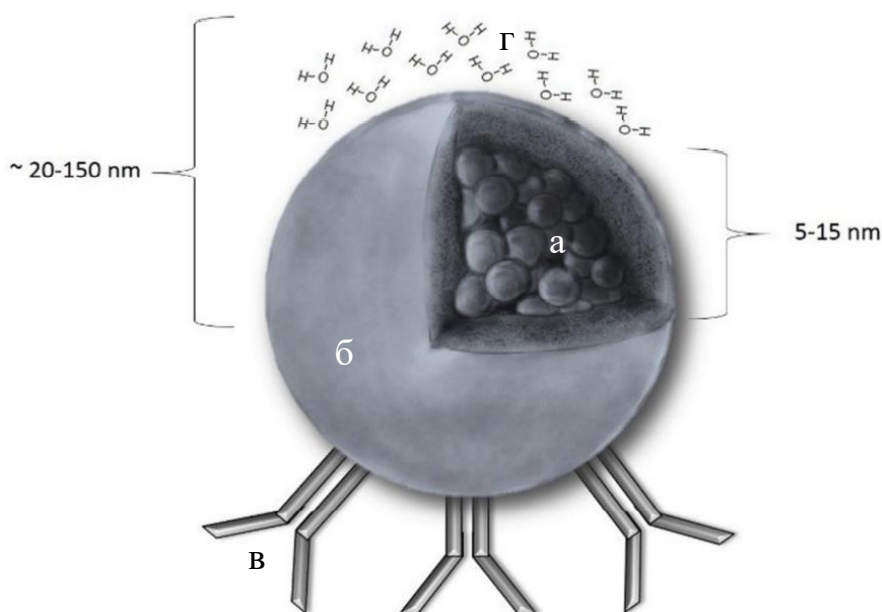


Рис. 1.1. Будова типової наночастинки: а – ядро, б – оболонка, в – модифікації оболонки (антитіла, медичні препарати, опсонізовані білки), г – гідратна оболонка. Адаптовано з [23].

Поширеним явищем є модифікування оболонки наночастинок, наприклад, для зміни їх заряду, імуногенних властивостей тощо. [41]. Наприклад, при використанні карбонового шару в якості оболонки, може проводитися приєднання полімерних «хвостів» за допомогою лінкерів або напряму до карбонових атомів, що змінюватиме співвідношення об'ємів ядра та оболонки [22,29]. Використання органічних полімерів в якості оболонки дозволяє також приєднувати додаткові компоненти – наприклад, медичні препарати, мітки для полегшення візуалізації частинок в тканинах тощо [51].

1.2. Використання наночастинок металів та їх оксидів в медико-біологічних цілях

Серед металовмісних наночастинок найбільший інтерес для досліджень викликають наночастинки металів перехідних груп та їх оксидів, - особливо ті, які виявляють магнітні властивості, та композитні матеріали з декількох металів та/або оксидів [32,37].

Специфіка застосування наночастинок як металів, так і їх оксидів в основному залежить від сфери та напрямку їх використання. Щоб запобігти виникненню різних патологічних станів, для клінічного застосування обирають максимально інертні частинки [8,34,43].

Біологічна стабільність та хімічна інертність наночастинок може досягатися як стабільністю самих частинок, так і використанням специфічних матеріалів для створення захисного шару на поверхні наночастинок. Покриття для постсинтетичної обробки наночастинок мають різний склад, однак за біохімічними характеристиками мають бути максимально інертними, для компенсації можливої токсичності отриманих наночастинок. Зокрема, можуть використовуватися як прості речовини (наночар золота чи карбонова оболонка), так і складні полімери (декстранові полімери, продукти бактеріального синтезу (сурфактин, рамноліпіди), поліетиленгліколь (ПЕГ))[28,29,35,36,39].

Серед використовуваних в медико-біологічних цілях наночастинок оксидів металів найбільш розповсюдженими є наночастинки різних оксидів заліза - $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, FeO , Fe_3O_4 – які через свої особливості є придатними до застосування в широкому спектрі клінічних досліджень та діагностичних заходів.

Наночастинки оксиду заліза як одні з дешевих та – порівняно з наночастинками інших оксидів та інших металів, – відносно легкоотримуваних, використовуються у багатьох галузях промисловості та медицини. Потенційна цитотоксичність наночастинок оксидів заліза

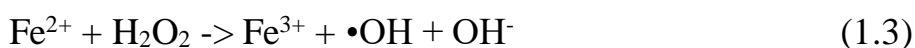
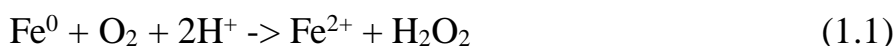
залежатиме як від використовуваних методів (зокрема копреципітації, мікрохвильового, сонохімічного чи гідротермального синтезу, або використання мікроемульсій з подальшим осадженням отриманих частинок та обробкою осаду), так і від умов проходження реакції (температура, іонна сила розчину, частота звукових хвиль – залежно від обраного методу), як і їх дисперсність. Також для посилення проникності або покращення взаємодії наночастинок з мішенями додатково можуть використовуватися різні покриття для створення стабільних оболонок [14,18,40,42].

Нижча цитотоксичність наночастинок оксидів заліза суттєво розширює спектр їх можливого застосування порівняно з частинками оксидів інших металів. Так, порівняння залежності цитотоксичного ефекту наночастинок оксидів заліза, міді та титану на самі клітини та їх складові від розміру частинок свідчить про те, що цитотоксичність частинок оксиду міді в 3-4 рази вища за всіма досліджуваними параметрами порівняно з частинками оксидів титану та заліза аналогічних розмірів. Зниження цитотоксичності наночастинок досягалося за допомогою обробки різними полімерними компонентами для створення додаткового шару, який, окрім того, запобігає опсонізації частинок та розвитку імунної реакції [36,45,47,53].

Токсичність нано- і мікрочастинок оксидів заліза є величиною, що залежить від багатьох факторів, таких, як розмір, концентрація частинок, шляхи надходження до організму, тривалість експозиції тощо [13]. Відповідно органоспецифічне ураження залежатиме від вище вказаних факторів, хоча загальна картина ураження в цілому на клітинному рівні характеризуватиметься зниженням мітохондріальної активності, підвищенням рівня реактивних форм кисню внаслідок зміни редокс-потенціалу утворених внаслідок дисоціації частинок іонів заліза, зміни ферментативної активності в клітині, виснаженні її ресурсів та в подальшому – до апоптозу клітин і, як наслідок, формування некротичних ділянок. Саме тому значна частина сучасних досліджень фокусується в першу чергу на виявленні полімерів, які не тільки знизять імовірність випадкової імунної

реакції на введені чужорідні елементи, а й максимально знизять можливі токсичні наслідки для клітин, які не є мішенями [16,39,47,53].

З усіх доступних для використання в дослідницьких та медико-біологічних цілях оксидів заліза найбільш стабільним є $\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_3$. Його хімічна стабільність також є причиною зниженої порівняно з оксидами інших металів (а також наночастинками Fe^0 , Fe^{2+}O , $\text{Fe}_3^{2+/3+}\text{O}_4$) цитотоксичності, оскільки обумовлена максимальним ступенем окиснення атомів металу; при застосуванні частинок сполук заліза з іншим ступенем окиснення під дією сильних окисників або вільних радикалів (H_2O_2 , H^+ , НАДФ^+ , НАДФН тощо) внаслідок реакцій:



- в клітинах відбувається генерація нових активних форм кисню, що призводить до розвитку оксидативного стресу [9,15,16].

Якщо класифікувати за окисно-відновним потенціалом метали та оксиди металів, наночастинки яких потенційно можуть бути використані в медико-біологічних цілях, можна виділити три групи:

1. Оксиди/метали, що індукують окисні реакції та/або каскади реакцій з кумулятивним токсичним ефектом;

2. Оксиди, що індукують відновні реакції з кумулятивним токсичним ефектом;

3. Стабільні оксиди, що не мають токсичного впливу на клітини (рис. 1.2).

Реакції, в яких задіяні сполуки першої групи, можна в загальному описати рівнянням



тоді як реакції за участі сполук другої групи описуватимуться рівнянням



де x – початковий ступінь окиснення атомів металу, n – зміна ступеня окиснення.

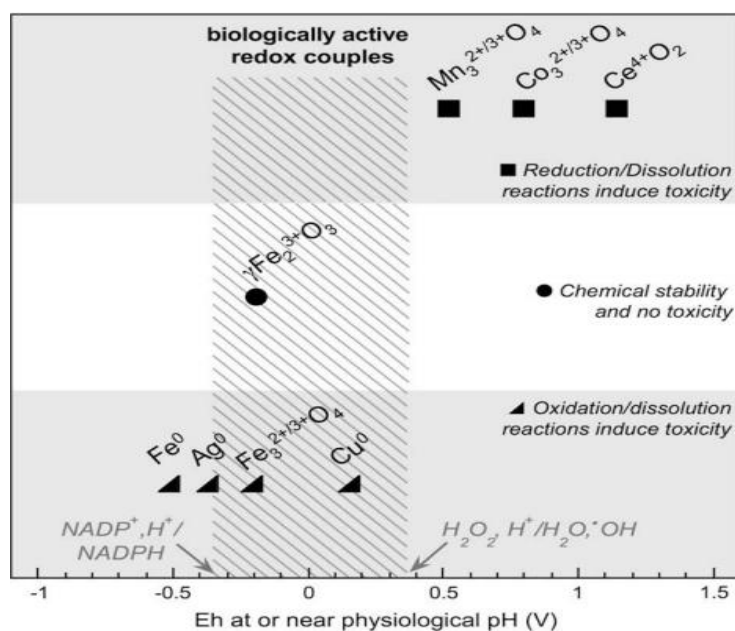
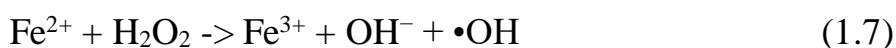


Рис.1.2. Розподіл металів та оксидів металів за їх біологічною активністю. Адаптовано з [16].

Окремим випадком є каскад реакцій Фентона/Габера-Вайса, результатом яких є каталізована залізом генерація гідроксид-радикалів з гідроген пероксиду та супероксиду за наступною схемою:



Наведений каскад реакцій є однією з основних причин розвитку оксидативного стресу в клітинах при їх інкубації з суспензією Fe^{2+}O , оскільки взаємодія наночастинок оксиду з перекисом водню призводить до активної генерації реактивних форм кисню, що в подальшому призводить до їх циклічного перетворення, перекисного окиснення біологічних речовин інших класів (білки, ліпіди, ДНК) та розвитку оксидативного стресу [31,47]. Надходження наночастинок оксидів заліза до клітини відбувається або пасивно, за допомогою дифузії, або опосередковано, шляхом ендоцитозу. Другий шлях є значно небезпечнішим за потенційними токсичними наслідками для клітини [45], оскільки в такому випадку в лізосомі

спостерігається дисоціація наночастинок в обмеженому об'ємі, що призводить до початку перекисного окиснення білків в самій органелі, руйнуванні її ліпідної мембрани утвореними продуктами реакції, що, в свою чергу, спричинить різке зростання концентрації активних форм кисню та продуктів перекисного окиснення в цитоплазмі, пошкодження внутрішньоклітинних структур та апоптоз самої клітини; або до поступової дифузії йонів заліза через мембрану везикули, і в такому випадку проміжок часу до загибелі клітини залежатиме тільки від її регенеративного потенціалу [27,39].

Основними мішенями йонів заліза є в першу чергу мітохондрії та ядро клітини через те, що пошкодження цих органел (а у випадку ядра – його вмісту) має найбільш несприятливі для виживання клітини наслідки [27].

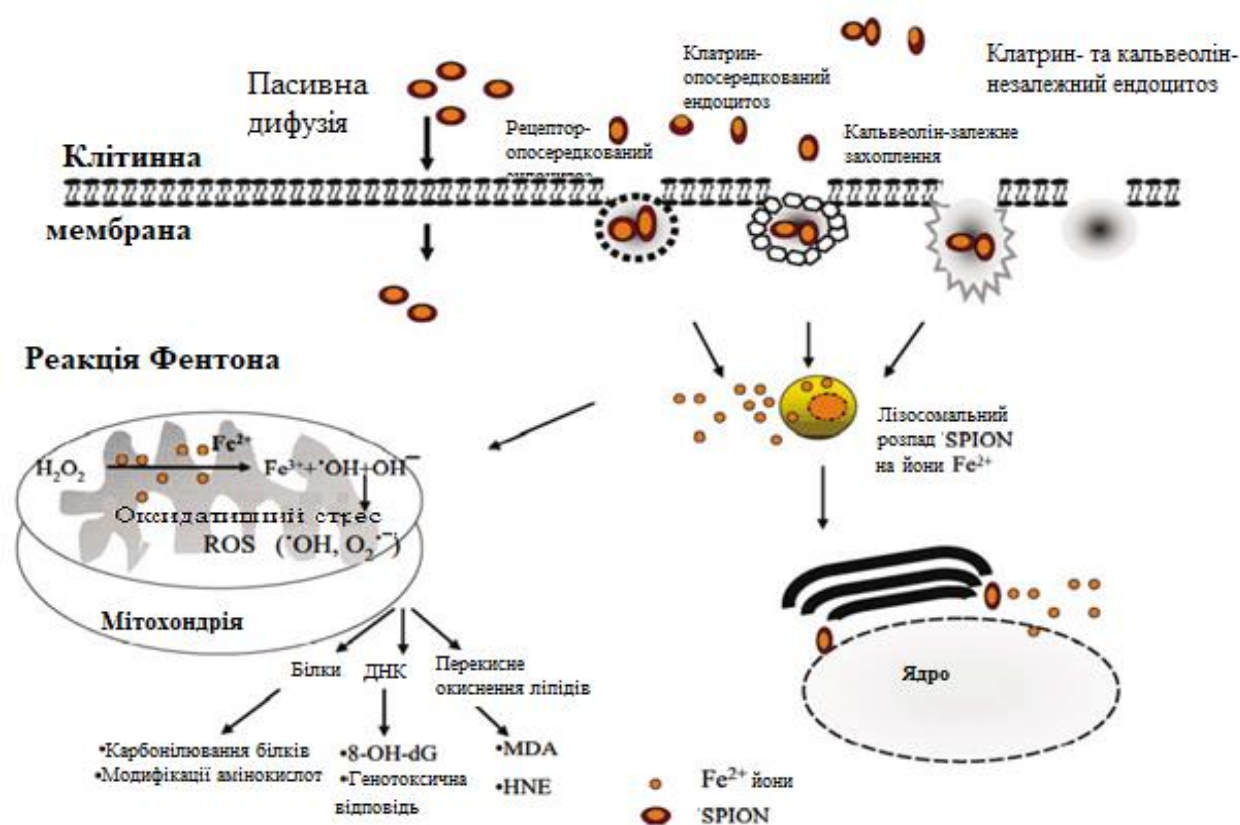


Рис. 1.3. Схема розвитку оксидативного стресу, індукованого дією наночастинок оксидів заліза. Адаптовано з [47].

Мітохондрії в даному процесі переважно виступають генератором гідроксил-радикалів за вже згадану вище реакцією Фентона (формула 1.7).

Утворені в них реактивні форми кисню відіграють основну роль в розвитку патологічних процесів всередині клітини [25].

Ще однією імовірною критичною мішенню при розвитку залізо-індукованих патологічних процесів є пероксисоми – однак ці органели містять ферменти, спрямовані безпосередньо на запобігання розвитку оксидативного стресу, зокрема, каталазу, основною функцією якої є утримання в пероксисомах H_2O_2 на рівні, достатньому для окиснення необхідних субстратів, але надто низькому для будь-якого оксидативного ушкодження [54]. Ураження пероксисом як активними формами кисню, так і продуктами перекисного окиснення біосполук з боку цитоплазми призведе до руйнування органел зовні, що суттєво знизить захисні можливості клітини від накопичення активних форм кисню, оскільки дисфункція деяких ферментів (зокрема, вже згаданої каталази, пероксидаз та інших ферментів – нейтралізаторів активних форм кисню) може стати причиною прискорення розвитку оксидативного стресу та загибелі клітини (рис.1.3).

1.3. Механізми розвитку цитотоксичних процесів внаслідок впливу наночастинок сполук заліза та їх наслідки для організму

Цитотоксичність наночастинок більшості металів, яка обмежує їх використання в біологічних та медичних цілях, пов'язана в першу чергу з їх каталітичними властивостями та втручанням утворених внаслідок поступової дисоціації частинок йонів металу в нормальні окисно-відновні процеси клітинних систем.

Численні дослідження токсичності наночастинок оксидів металів показали, що максимальний ступінь окиснення металу робить частинки його оксиду хімічно стабільними – принаймні, до руйнування кори та дисоціації ядра на молекули під дією рідин та електролітів організму. Даний процес може відбуватися як в міжклітинному просторі, так і всередині самих клітин (рис. 1.3).

При взаємодії заліза та його оксидів з клітинними редокс-системами та каталізі ним циклу Фентона/Габера-Вайса (формули 1.6-1.7), накопичення в клітині активних форм кисню деякий проміжок часу компенсується їх розпадом за участі супероксиддисмутази та каталаз; внаслідок залучення до каталітичних процесів більшої кількості заліза через деякий час концентрація ферментів буде недостатньою для розкладу всіх утворених продуктів реакції циклу, тому в цитоплазмі почнеться експоненційне зростання кількості активних форм кисню, включно з продуктами перекисних окиснень ліпідів, ДНК та білків – критично важливих для нормального функціонування клітини компонентів (табл. 1.1) [27,31,52].

Перевищення реакційної можливості антиоксидантної системи клітини призводять до зміни електролітного складу цитоплазми, перфорації її мембрани та вивільнення вмісту, з молекулами оксиду заліза включно, в міжклітинний простір з подальшим перенесенням до інших систем організму [13].

Таблиця 1.1

Мішені активних форм кисню в клітині

Мішень	Результат окиснення	Наслідки
Ліпіди	Пошкодження та розриви мембран	Перфорація та руйнування мембран, порушення в органелах критично важливих метаболітичних циклів, загибель клітин.
Білки	Порушення структури та функцій	Часткова десенсибілізація клітинних сигнальних систем, неадекватна відповідь на отримані сигнали, порушення пропускнуої здатності іонних насосів, інактивація ферментів тощо.
Нуклеїнові кислоти	Розриви ланцюгів, мутації внаслідок помилок зчитування та використання окиснених нуклеотидів	<ul style="list-style-type: none"> • Однонуклеотидні заміни в ланцюзі та передача мутації наступній генерації клітин – при синтезі ДНК з дефектними нуклеотидами; • Порушення синтезу білків внаслідок неправильного зчитування кодонів – при синтезі РНК з дефектними нуклеотидами.

Як вже згадувалось раніше (п. 1.2), проблема потенційної цитотоксичності наночастинок заліза є причиною проведення великої кількості досліджень в цьому напрямку. Серед проведених досліджень варто відзначити експерименти з вивчення взаємодії наночастинок сполук заліза з

клітинами мозку, еритроцитами, дендритними клітинами, фібробластами, клітинами гладеньких м'язів тощо (табл. 1.2) [21].

Таблиця 1.2

Дослідження потенційної цитотоксичності залізовмісних наночастинок на різних біологічних об'єктах

Досліджувані частинки сполук заліза	Біологічний об'єкт дослідження	Завдання та результати досліджень
1	2	3
<p>SPION (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) (з полімерними покриттями – декстран, модифікований полівініловий спирт)</p>	<p>Клітини нервової системи щурів та морських свинок: ендотеліальні EC219 та мікрогліальні N9, N11</p>	<p>1. Дослідження взаємодії SPION (з різними покриттями) з клітинами нервової системи залежно від використаних полімерів; 2. Відзначення ефективності декстранових полімерів та полівінілових спиртів для зменшення цитотоксичної дії оксиду заліза; 3. Відзначення амінополівінілових спиртів як ефективних покриттів для частинок, які мають бути захоплені шляхом ендцитозу, зроблено теоретичне припущення про можливість використання таких частинок як засобів для доставки терапевтичних агентів. [20]</p>
<p>Маггеміт ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) у колоїдній формі (магнітні рідини) з різними полімерними оболонками</p>	<p>Еритроцити мишей</p>	<p>1. Дослідження взаємодії наночастинок маггеміту у колоїдній формі в різних концентраціях з еритроцитами, визначення їх цитотоксичної дії залежно від використаних в якості оболонки полімерів; 2. Показано, що поглинання еритроцитами частинок $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ залежить від використаних полімерів (поглинання частинок було виявлено при використанні цитрату та мезо-2,3димеркаптосукцинової кислоти) [49].</p>

Продовження табл. 1.2

1	2	3
Fe@C (залізо-вуглецеві) наночастинки з інтактною та модифікованою карбоновою корою	Клітини меланому (НТВ-140, В16-F10), фібробласти дерми людини	Дослідження потенційної цитотоксичності ферум-карбонових наночастинок залежно від модифікації кори [29].
SPION без покриття та з золотою оболонкою	Фетальна сироватка бика	Дослідження опсонізації наночастинок за наявності чи відсутності захисного шару, інгібування опсонізації за наявності захисного шару [36].
Fe@C (залізо-вуглецеві) наночастинки	Дендритні клітини	Виявлення механізмів поглинання наночастинок клітинами, здатними до ендоцитозу [28].
γFe ₂ O ₃ з різними полімерними оболонками	Клітини гладеньких м'язів судин (з аорти щурів)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Вивчення потенційного впливу наночастинок заліза на серцево-судинну систему; 2. Демонстрація залежності кількості поглинутих клітинами наночастинок від використаних в якості покриття полімерів; 3. Демонстрація можливого цитотоксичного впливу на клітини (інгібування проліферації клітин, причини точно не встановлені) [50].

Отримані результати досліджень свідчать, що основними напрямками у дослідженнях наночастинок залізовмісних сполук є все ж таки вивчення матеріалів для створення на поверхні наночастинок захисного шару – перш за все, для уникнення опсонізації, тобто адсорбції на поверхні частинки білків самого організму та ендоцитозі такого кон'югату клітинами, що після втрати такої білкової оболонки внаслідок дії ферментів призведе до розвитку оксидативного стресу. Разом з тим специфікація наночастинок залізовмісних сполук та їх афінність до певних тканин визначається складом кори та її модифікаціями.

1.4. Основні напрямки використання наночастинок оксидів заліза в медико-біологічних цілях.

Однією з переваг наночастинок заліза, що робить їх придатними для практичного використання, є їх інертність. Іншою є наявність парамагнітних властивостей. Це дозволяє:

- керувати положенням наночастинок в організмі та змінювати його за допомогою зовнішнього магнітного поля;
- з використанням магнітної індукції генерувати тепло за допомогою ядер наночастинок, що призведе до зміни температури тканин організму;
- використовувати їх для транспорту речовин завдяки парамагнітним властивостям та їх руху в магнітному полі.

З огляду на викладене вище, SPION в медицині використовуються в наступних напрямках:

1. Магнітна гіпертермія;
2. Контрастні речовини при МРТ;
3. Таргетна доставка ліків/антитіл.

1.4.1. Магнітна гіпертермія. Магнітна гіпертермія – один з методів протиракової терапії, який полягає у насиченні зони пухлини намагніченими наночастинами та нагрівання цієї зони за допомогою зовнішнього магнітного поля [19,41]. Насичення пухлини магнітними частинками призводить до їх локалізації у приповерхневих шарах, не проникаючи достатньо глибоко, що не дозволяє впливати на більш глибокі частини пухлини, тому подібні методи використовуються тільки як допоміжні. Водночас нетривала генерація тепла підвищує сприйняття пухлиною інших методів терапії – променевої або хіміотерапії – в кілька разів. Більше тривале, генероване взаємодією магнітного поля і наночастинок підвищення температури має негативний вплив на сусідні – здорові – тканини, особливо після тривалої взаємодії. Внаслідок цього лікування онкологічних захворювань тільки за допомогою гіпертермії було визнане неефективним. Тому в лікуванні притримуються комбінації магнітної гіпертермії з іншими

методиками лікування, що прискорює знищення пухлини у порівнянні з використанням цих же методик без попередньої підготовки пухлини [46].

1.4.2. Контраст при МРТ. Магнітно-резонансна томографія використовується для отримання висококонтрастних зображень внутрішніх органів з метою виявлення їх патологій, встановлення діагнозу та моніторингу лікування. Контрастні реагенти, що вводяться в досліджувальну зону, використовуються в МРТ для отримання кращої чіткості зображення. Наночастинки парамагнітних матеріалів під дією зовнішнього магнітного поля мають здатність накопичуватись в досліджувальній зоні, дозволяючи отримати найдрібніші деталі зображення, що робить їх незамінними у використанні у якості контрастної речовини.

Найчастіше для візуалізації зображення серед металовмісних контрастних агентів, використовуються гадоліній- та залізовмісні, а також марганцеві контрасти. Всі металовмісні контрасти мають відповідати загальним вимогам – низькій цитотоксичності, здатності акумулюватись в клітинах досліджуваних органів, високій стабільності колоїдів наночастинок [38].

1.4.3. Таргетна доставка препаратів. Цільова доставка медичних препаратів прямо до ураженого органу чи тканини має на меті не тільки збільшення концентрації препарату в ураженій зоні, а й максимальне зменшення негативного впливу на організм завдяки локалізації препарату, що суттєво зменшує можливість негативних реакцій на організм в цілому. Таргетна доставка препаратів відповідно зменшує кількість потенційно токсичних проміжних метаболітів в крові, що, в свою чергу, суттєво знижує ризики розвитку побічних реакцій [30,43].

Аналогічно можна використовувати магнітні наночастинки для доставки антигенів – замість вакцин, для розвитку імунної відповіді та формування імунітету.

Основною проблемою при використанні будь-яких наночастинок металів – не має значення, з якою метою, – є їх ускладнене виведення з

організму. Наприклад, для сполук заліза для цього використовується покриття наночастинок хімічно інертними матеріалами (золото), або органічними сполуками, які подібні до продуктів синтезу самого організму. Це запобігає потраплянню в міжклітинний простір сполук заліза та їх цитотоксичної дії.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт та предмет дослідження

Об'єктом дослідження при виконанні роботи була система природного імунітету щурів, а предметом дослідження – зміни її клітинної компоненти під впливом наночастинок оксиду заліза Fe_2O_3 за різних умов введення та експозиції в організмі тварин. Досліджувані тварини (статевозрілі самці щурів лінії Вістар) утримувалися в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води.

Експерименти було проведено в ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І.Кундієва НАМН України» на базі лабораторії промислової токсикології та гігієни праці при використанні хімічних речовин. Всі процедури з тваринами проводилися відповідно до положень чинного законодавства України [4] та «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» [24], і були схвалені Комітетом з біоетики НАН України [5].

2.2. Методика експерименту

В ході досліджень для вивчення токсичної дії наночастинок на клітини лейкоцитарного ряду периферичної крові для дослідження показників стану імунної системи та її адаптаційного потенціалу було змодельовано дві експериментальні ситуації – гостра інтоксикація після однократного введення наночастинок та субхронічна інтоксикація внаслідок 30-кратного введення наночастинок, покликани імітувати постефекти використання залізовмісних контрастів для МРТ та проведення сеансів магнітної гіпертермії для терапії онкологічних захворювань відповідно.

Для моделювання гострої інтоксикації наночастинками Fe_2O_3 було використано групи щурів масою 220-260 г, яким вводили однократно колоїдні розчини частинок розмірами 19 нм та 400 нм з концентрацією заліза

10 мг/мл. Дози об'ємом 0,5 мл вводили наркотизованим ефіром та зафіксованим на спині щурам інтратрахеально; контрольній групі аналогічно вводили фізіологічний розчин NaCl 0,9%. Розмір груп – n=10 для обох піддослідних та контрольної груп.

При моделюванні субхронічної інтоксикації було використано групи щурів масою 160-180 г та колоїдні розчини НЧ Fe₂O₃ з розмірами частинок 19нм, 75 нм та 400 нм; концентрація заліза в розчинах становила 0,112 мг/л. Розчини частинок вводили щурам в очередину 5 разів на тиждень у дозі 0,001 моль/л (0,112 мг заліза) на 100 г маси тіла тварини; контрольній групі аналогічно вводили 0,1% розчин желатини (стабілізатора НЧ). Розмір груп – n=10 для трьох піддослідних та контрольної груп.

Кров у дослідних та контрольних тварин забирали на 21 день після останнього введення наночастинок, після декапітації під ефірним наркозом; для другої моделі додатково відбирали проби крові з хвостової вени.

2.3. Обладнання та методи

2.3.1. Загальний аналіз крові. Загальний аналіз крові, визначення клітинного складу крові, лейкоцитарної формули та інших параметрів крові визначали за допомогою гематологічного аналізатора ELITE 3 (Чехія). Даний прилад визначає вміст гемоглобіну в цільній крові спектрофотометричним методом (за молярним коефіцієнтом поглинання метгемоглобіну), а підрахунок кількості формених елементів крові проводить з використанням кондуктометричного методу в модифікації Культера. Цей метод використовується для диференційного підрахунку клітин в електропровідній рідині шляхом детекції кількості електричних імпульсів при проходженні через апертуру (отвір малого діаметру) детектора, з розподілом їх на популяції за амплітудою зафіксованих імпульсів.

2.3.2. Статистична обробка даних. Обробку отриманих первинних даних та їх статистичний аналіз було виконано за допомогою пакету функцій

Microsoft Excel, із розрахуванням середнього арифметичного значення, середнього відхилення та похибки середнього арифметичного; для перевірки статистичної достовірності даних було використано критерій Стьюдента.

2.3.3. Оцінка адаптаційних можливостей організму. Оцінку адаптаційних можливостей організму було проведено на основі лейкоцитарної формули та загальної кількості лейкоцитів у крові відповідно до таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристика адаптаційних реакцій організму людини

Показники	Типи адаптаційних реакцій					
	фізіологічні			нефізіологічні		
	реакція тренування (РТ)	реакція спокійної активації (РСА)	реакція підвищеної активації (РПА)	реакція переактивації (РП)	гострий стрес (ГС)	хронічний стрес (ХС)
лейкоцити, $\times 10^9$	норма	4,0 – 8,0	> 8,0	норма	> 8,0	<8, >8 і норма
лімфоцити, %	21 - 27	28 – 33	> 33, 40 – 45	> 40, або > 45	< 20	< 20
нейтрофіли п/я, %	норма	норма	норма	норма	> норми	норма і >
нейтрофіли с/я, %	норма	норма	норма	< норми	> норми	> норми
моноцити, %	норма	норма	норма	норма	норма і >	норма і >
еозинофіли, %	норма	норма	норма	норма	0	0, норма і >

Реакції тренування, спокійної та підвищеної активації належать до фізіологічних реакцій організму, для яких наявні достатні резервні можливості відновлення; натомість реакції переактивації, гострого та хронічного стресу є нефізіологічними та вказують на розвиток патологічних процесів в організмі.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При надходженні в організм різних хімічних речовин, що мають токсичні властивості, однією з перших мішеней для них стає кров, що проявляється як в цитотоксичній дії на клітини крові, так і в ураженні органів кровотворення. Одним з найбільш поширених токсичних ефектів є розлади гемопоєзу, що проявляються у вигляді зниження загальної кількості морфологічно нормальних клітин та збільшення частки незрілих морфологічних форм клітин крові у порівнянні з нормою.

Численні дослідження показали що сполуки важких металів проявляють виражені гематотоксичні властивості [1,10,11]. Основними механізмами їх гематотоксичної дії є порушення нормальних процесів диференціації та проліферації клітин, пригнічення процесу синтезу клітинноспецифічних біосполук, мембрано- та цитотоксична дія, що призводить до зниження тривалості життя клітин крові та їх морфофункціональних змін [6].

3.1. Модель гострої інтоксикації наночастинками оксиду заліза

Після однократного інтратрахеального введення колоїдних розчинів Fe_2O_3 спостерігалися незначні зміни у лейкоцитарній формулі периферичної крові (табл. 3.1). Для частинок оксиду заліза обох розмірів, введених щурам у вигляді колоїдних розчинів, спостерігалось зниження абсолютної кількості лейкоцитів після введення наночастинок в обох дослідних групах порівняно з контрольною; при цьому у тварин було виявлено зростання частки моноцитів та зменшення часток лейкоцитів інших ліній, що може бути результатом активації клітин моноцитарного ряду та підвищення фагоцитарної активності в організмі [3,33,48], особливо у тварин, що отримували Fe_2O_3 400 нм (мал. 3.1).

Таблиця 3.1

Показники лейкоцитарного ряду клітин периферичної крові щурів після однократного інтратрахеального введення колоїдних розчинів Fe_2O_3 з частинками 19 нм і 400 нм ($M \pm m$).

Показники	Групи щурів		
	Контроль	Fe_2O_3 19 нм	Fe_2O_3 400нм
Кількість лейкоцитів, $10^9/\text{л}$	16,72 \pm 0,77	13,36 \pm 1,08*	13,83 \pm 2,03
Кількість лімфоцитів, $10^9/\text{л}$	7,88 \pm 0,66	5,71 \pm 0,40*	7,04 \pm 1,15
Відсоток лімфоцитів, %	40,38 \pm 2,15	44,11 \pm 3,26	37,69 \pm 4,02
Кількість моноцитів, $10^9/\text{л}$	1,81 \pm 0,33	2,58 \pm 0,53	2,83 \pm 0,81
Відсоток моноцитів, %	10,26 \pm 0,62	14,03 \pm 1,00*	17,50 \pm 4,58*
Кількість гранулоцитів, $10^9/\text{л}$	9,25 \pm 0,84	5,88 \pm 0,32 *	6,71 \pm 0,01 *
Відсоток гранулоцитів, %	48,67 \pm 3,22	48,51 \pm 6,80	47,28 \pm 4,20

Примітка. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

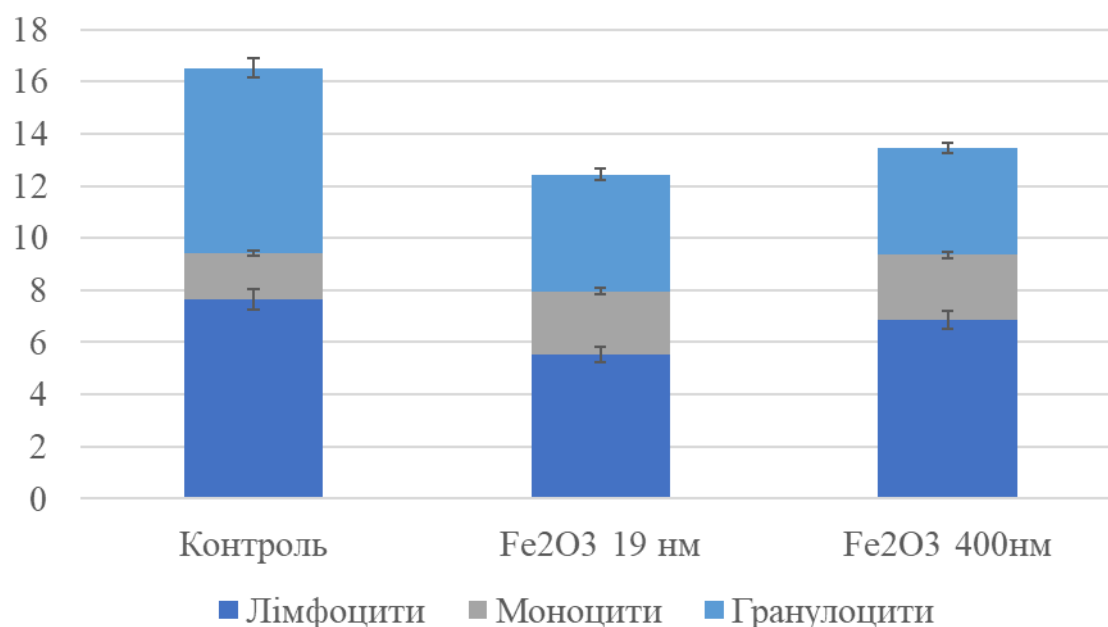


Рис. 3.1. Зміна кількості клітин лейкоцитарної формули, $10^9/\text{л}$, у щурів, на яких було змодельовано гостру інтоксикацію наночастинками оксиду заліза.

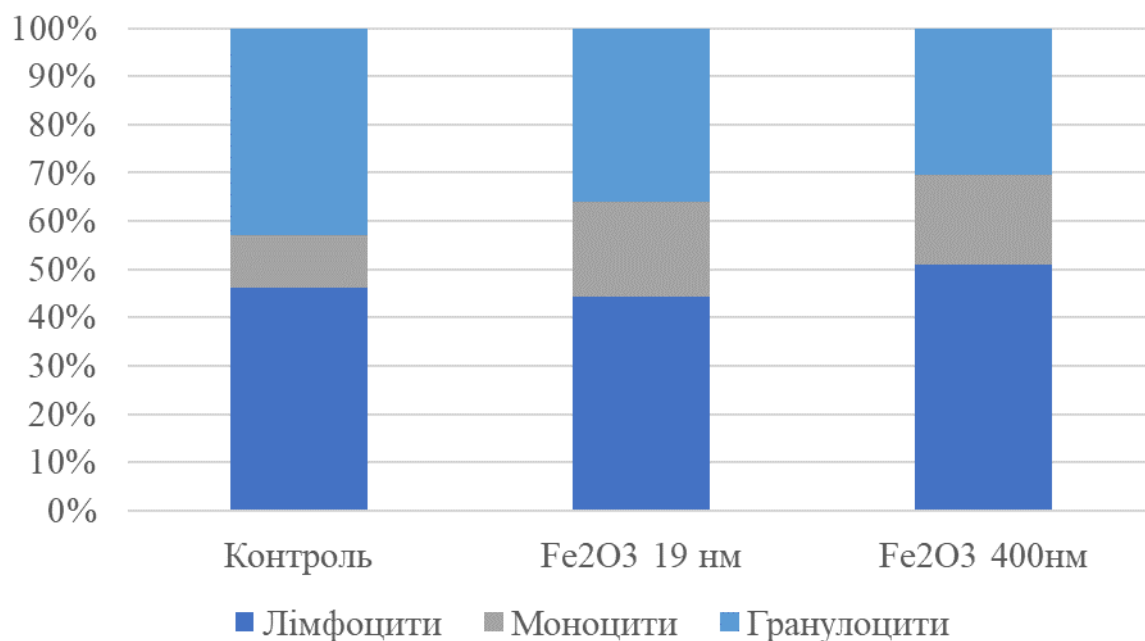


Рис. 3.2. Відсотковий розподіл основних груп лейкоцитів у щурів, на яких було змодельовано гостру інтоксикацію наночастинками оксиду заліза.

Зниження загальної кількості лейкоцитів у крові дослідних тварин може бути результатом комплексної дії кількох факторів – цитотоксичної дії на клітини периферичної крові та ураження кровотворних органів, що призводить до порушення нормальних процесів диференціації та дозрівання лейкоцитів. Зростання частки моноцитів у крові натомість свідчить про активацію фагоцитарної функції, завдяки чому стає можливим захоплення наночастинок з кровотоку для подальшої їх елімінації з організму (таблиці 3.2, 3.3, рис. 3.3, 3.4)

Таблиця 3.2

Зміна абсолютної кількості ($10^9/\text{л}$) показників лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи, %

Показники	Групи щурів	
	Fe ₂ O ₃ 19 нм	Fe ₂ O ₃ 400нм
Лейкоцити	-24,70	-18,58
Лімфоцити	-27,71	-10,20
Моноцити	38,07	41,48
Гранулоцити	-36,99	-42,48

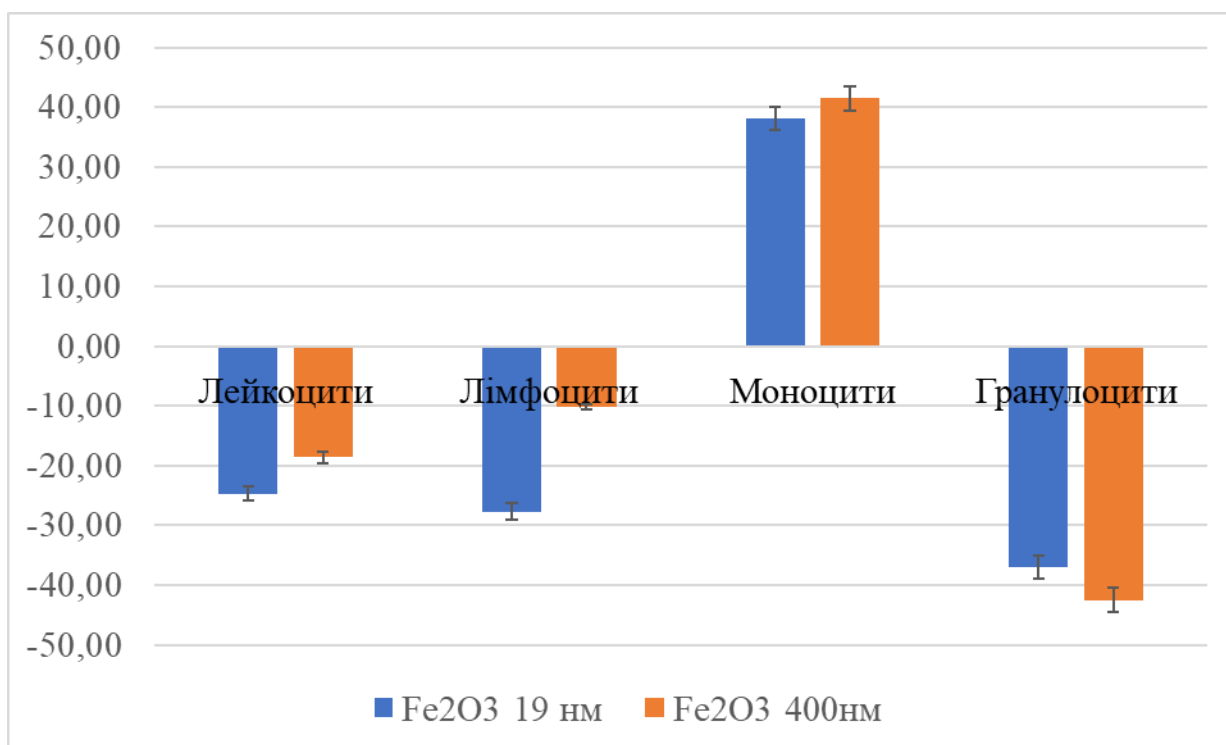


Рис. 3.3. Зміна абсолютної кількості ($10^9/\text{л}$) показників лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи, %

Таблиця 3.3

Зміна показників формули лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи, %

Показники	Групи щурів	
	Fe ₂ O ₃ 19 нм	Fe ₂ O ₃ 400нм
Лейкоцити	-24,70	-18,58
Лімфоцити	-4,00	10,30
Моноцити	83,35	73,77
Гранулоцити	-16,32	-29,35

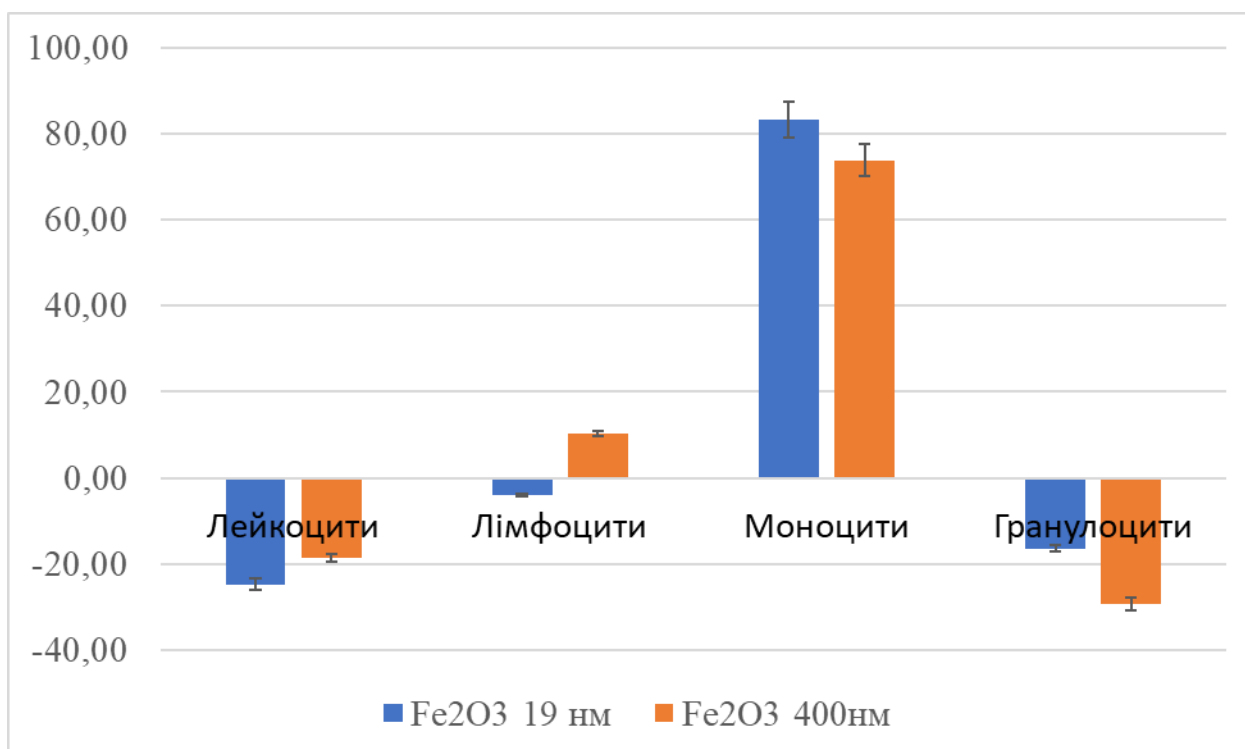


Рис. 3.4. Зміна показників формули лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи, %

Отримані дані свідчать про те, що при однократному введенні наночастинок Fe_2O_3 прояв їх цитотоксичної дії є обернено пропорційним до розміру введених щурам частинок, хоча загальний токсичний вплив на систему природного імунітету відрізняється за механізмом свого розвитку. З огляду на викладене, можна стверджувати, що біобезпечність залізовмісних наночастинок є критерієм, що безпосередньо залежить від їх розміру.

3.2. Модель субхронічної інтоксикації наночастинками оксиду заліза

При моделюванні хронічної інтоксикації частинками оксиду заліза різних розмірів (19, 75 та 400 нм) у щурів дослідних груп спостерігали суттєві зміни у складі периферичної крові порівняно з аналогічними показниками контрольної групи.

Так, у дослідних щурів, яким вводили Fe_2O_3 19 нм, спостерігалось достовірне зниження відносної кількості лейкоцитів, моноцитів та еозинофілів порівняно з показниками контрольної групи тварин. Кількість лімфоцитів та нейтрофілів у крові дослідних щурів цієї групи суттєво не відрізнялась від значень у контрольних тварин. У щурів, яким вводили частинки Fe_2O_3 75 нм, було виявлено достовірне збільшення відносної кількості моноцитів, паличкоядерних нейтрофілів та еозинофілів, незначне зниження загальної кількості лейкоцитів та частки лімфоцитів, що може вказувати на активацію клітин природного імунітету та розвиток запальної реакції за механізмом, подібним до розвитку алергічних реакцій. Після введення колоїдного розчину Fe_2O_3 з частинками 400 нм було виявлено суттєве підвищення в лейкоцитарній формулі часток моноцитів і сегментоядерних нейтрофілів, що свідчило про активацію моноцитарно-макрофагальної системи та фагоцитарної функції (табл. 3.4, рис. 3.5, 3.6).

В цілому дана картина може свідчити про розвиток запальних реакцій та активацію клітин природного імунітету [3,6,33,48].

Таблиця 3.4

Показники лейкоцитарного ряду клітин периферичної крові щурів після однократного інтратрахеального введення колоїдних розчинів Fe_2O_3 ($M \pm m$).

Показники	Групи щурів			
	Контроль	Fe_2O_3 19 нм	Fe_2O_3 75 нм	Fe_2O_3 400 нм
1	2	3	4	5
Лейкоцити, $10^9/\text{л}$	11,88±0,99	5,74±0,38*	9,71±0,97+	11,77±0,94
Лімфоцити, %	60,15±3,83	64,31±3,06	55,43±2,03	61,73±3,83
Лімфоцити, $10^9/\text{л}$	7,15±0,46	3,69±0,18	5,38±0,20	7,03±0,45

Продовження табл. 3.4

1	2	3	4	5
Моноцити, %	5,98±0,33	4,95±0,40	7,84±0,60*	7,25±0,57*
Моноцити, 10 ⁹ /л	0,71±0,04	0,28±0,02	0,76±0,06*	0,85±0,07*
Нейтрофіли с/я, %	26,65±4,01	23,67±1,15	27,56±1,94	31,42±1,64*
Нейтрофіли с/я, 10 ⁹ /л	3,17±0,48	1,36±0,07	2,68±0,19	3,58±0,19*
Нейтрофіли п/я, %	2,80±0,31	2,71±0,41	3,34±0,19*	2,53±0,42
Нейтрофіли п/я, 10 ⁹ /л	0,33±0,04	0,16±0,02	0,32±0,02*	0,30±0,05
Еозинофіли, %	2,35±0,31	1,72±0,41*	3,95±0,60*	2,00±0,68
Еозинофіли, % 10 ⁹ /л	0,28±0,04	0,10±0,02*	0,38±0,06*	0,24±0,08

Примітка. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем

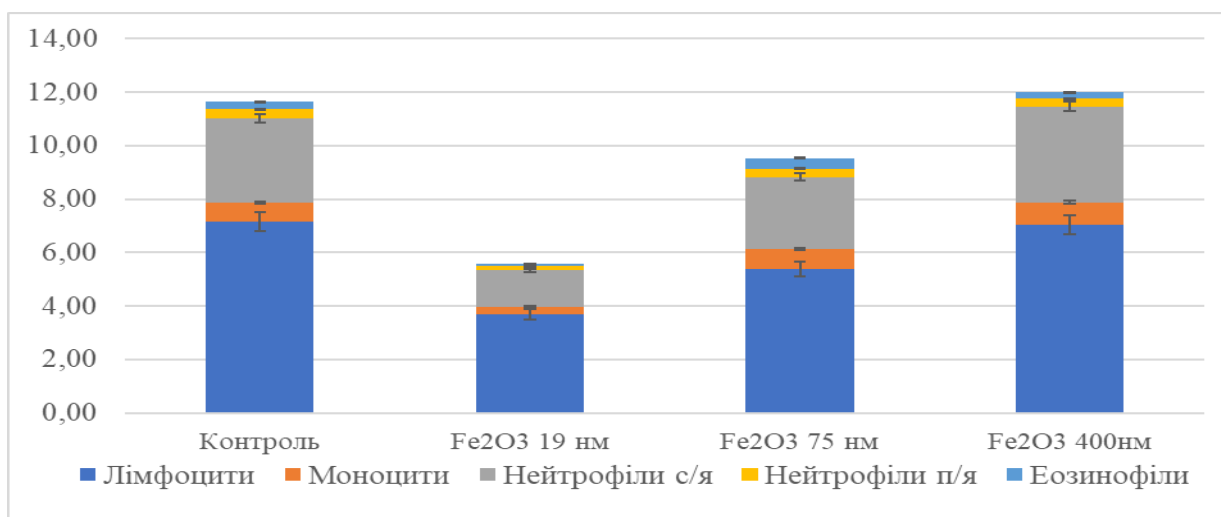


Рис. 3.5. Зміна кількості клітин лейкоцитарної формули, 10⁹/л, у щурів, на яких було змодельовано субхронічну інтоксикацію наночастинками оксиду заліза.

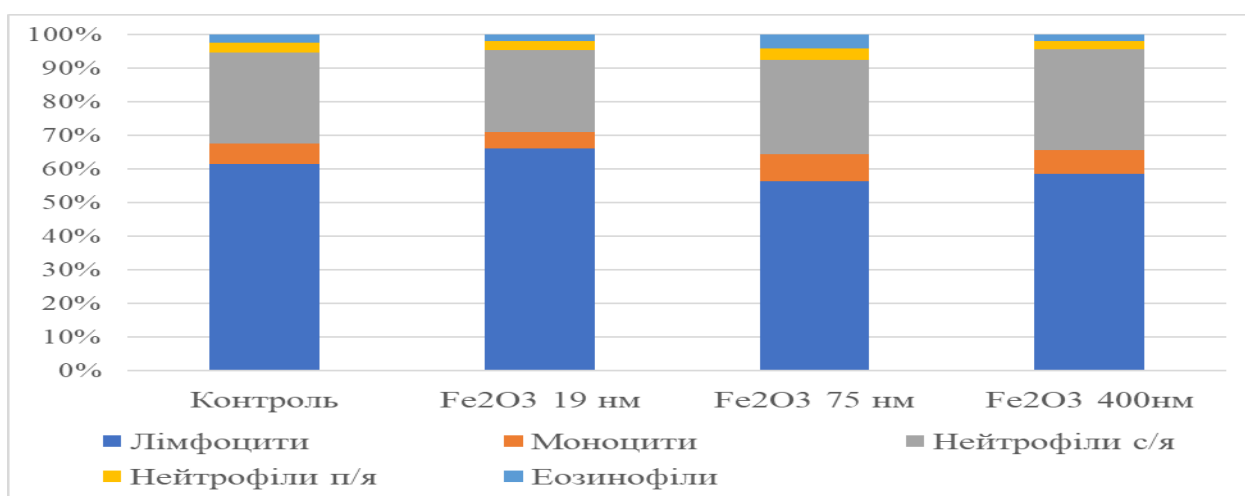


Рис. 3.6. Відсотковий розподіл основних груп лейкоцитів у щурів, на яких було змодельовано субхронічну інтоксикацію наночастинками оксиду заліза.

Значне зниження загальної кількості білих клітин крові при

моделюванні субхронічної інтоксикації наночастинками оксиду заліза малої дисперсності (19нм) є свідченням їх тривалої цитотоксичної дії на органи кровотворення та порушення нормального процесу диференціації та дозрівання лейкоцитів. Водночас при моделюванні інтоксикації наночастинками середньої (75 нм) та великої (400нм) на тлі зниження загальної кількості лейкоцитів спостерігалось зростання частки моноцитів – що свідчить про активацію фагоцитарної функції клітин та захоплення наночастинок оксиду заліза для подальшої їх елімінації (таблиці 3.5, 3.6, рис. 3.7, 3.8).

Таблиця 3.5

Зміна абсолютної кількості ($10^9/\text{л}$) показників лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи, %

Показники	Групи щурів		
	Fe ₂ O ₃ 19 нм	Fe ₂ O ₃ 75 нм	Fe ₂ O ₃ 400нм
Лімфоцити	-48,34	-24,68	-1,62
Моноцити	-60,01	7,16	20,11
Нейтрофіли с/я	-57,09	-15,48	13,09
Нейтрофіли п/я	-53,24	-2,50	-10,48
Еозинофіли	-64,64	37,38	-15,68
Лейкоцити	-53,24	-2,50	-10,48

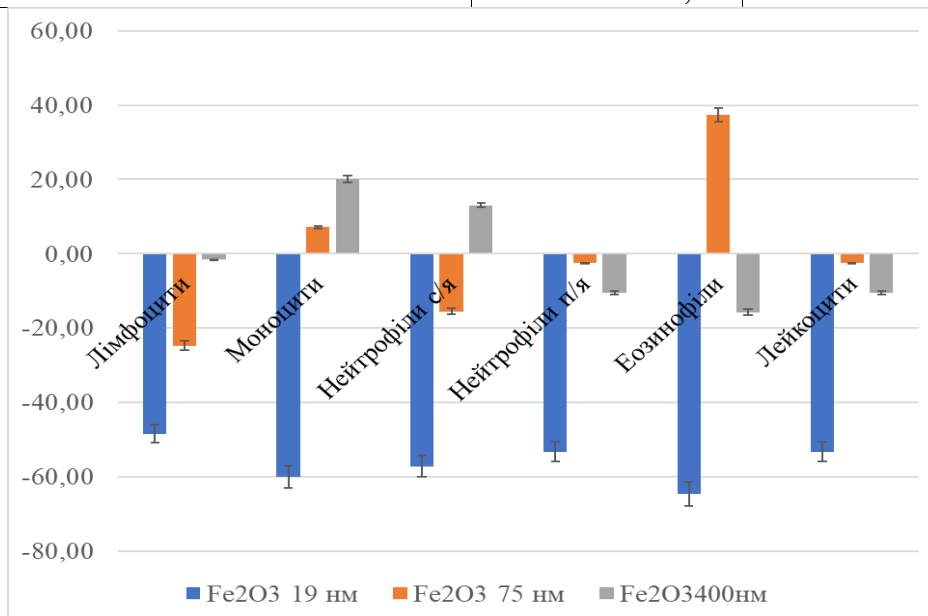


Рис. 3.7. Зміна абсолютної кількості ($10^9/\text{л}$) показників лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи. %

Таблиця 3.6

Зміна показників формули лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи,
%

Показники	Групи щурів		
	Fe ₂ O ₃ 19 нм	Fe ₂ O ₃ 75 нм	Fe ₂ O ₃ 400нм
Лімфоцити	6,92	-7,85	-0,70
Моноцити	-17,22	31,10	21,24
Нейтрофіли с/я	-11,18	3,41	14,15
Нейтрофіли п/я	-3,21	19,29	-9,64
Еозинофіли	-26,81	68,09	-14,89

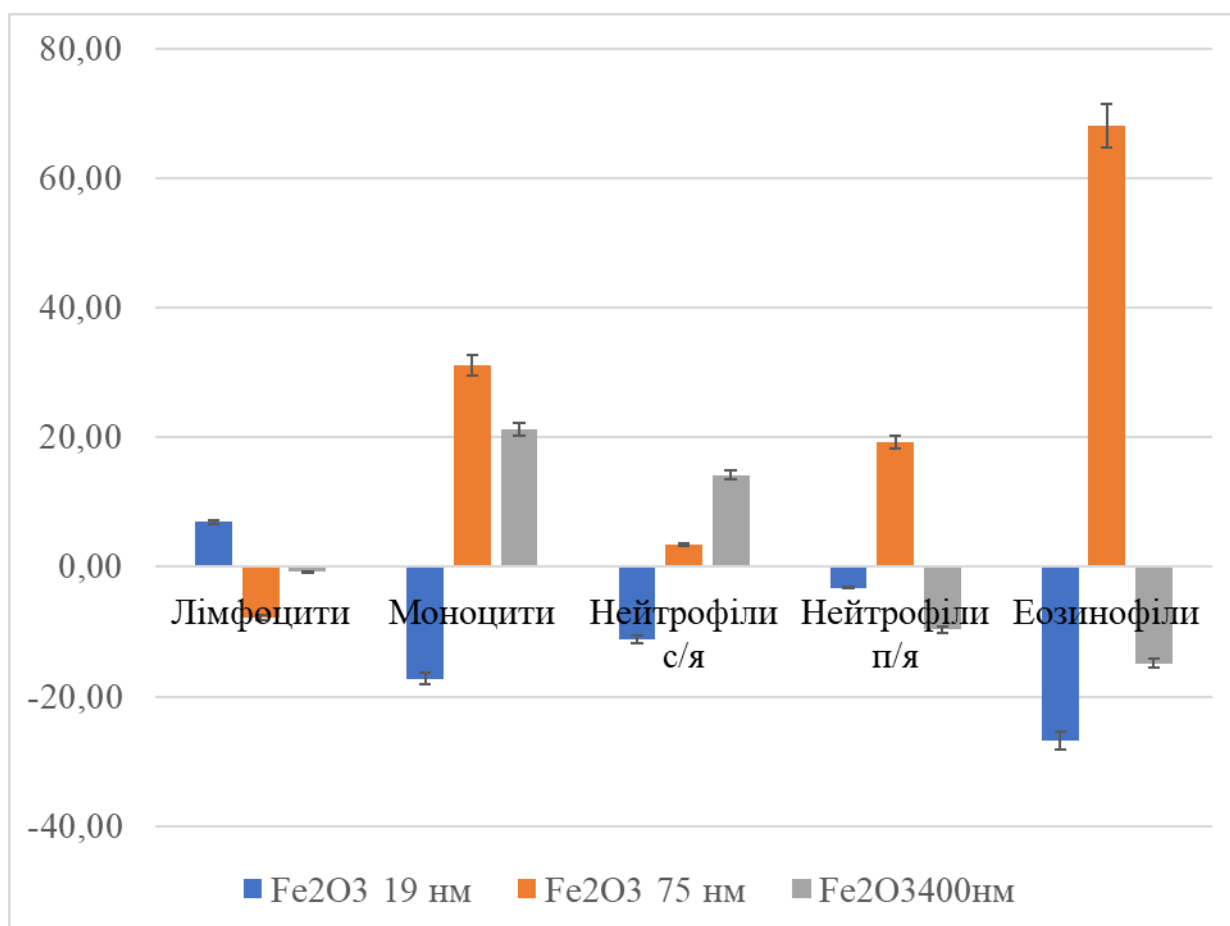


Рис. 3.8. Зміна показників формули лейкоцитарного ряду відносно контрольної групи, %

Отримані дані свідчать про те, що при багатократному введенні наночастинок Fe₂O₃ протягом тривалого періоду часу прояв їх цитотоксичної

дії є обернено пропорційним до розміру введених щурам частинок, хоча загальний токсичний вплив на систему природного імунітету, як і при моделюванні гострої інтоксикації, відрізняється за механізмом свого розвитку. З огляду на це, можна стверджувати, що біобезпечність залізовмісних наночастинок є критерієм, що безпосередньо залежить від їх розміру.

3.3. Оцінка адаптаційних можливостей організму після інтоксикації наночастинками оксиду заліза

Реакції стресу в організмі є відповіддю на подразнювальні чинники. Кров та система гомеостазу, як і деякі інші системи організму, є однією з найбільш чутливих до різних факторів, що здатні індукувати стресові реакції. Залежно від ступеня впливу подразника та відповіді організму на нього такі реакції поділяють на фізіологічні, тобто такі, після яких організм здатен повернутися до нормального стану за рахунок власних фізіологічних резервів; та нефізіологічні, які вичерпують всі доступні резерви внаслідок інтенсивності або тривалості дії подразника, внаслідок чого починається виснаження організму, порушення нормальних його фізіологічних функцій та розвиток патологічного процесу [2].

Оцінка адаптаційних можливостей організму на основі лейкоцитарної формули та загальної кількості лейкоцитів дозволяє відстежувати зміни в стані організму достатньо швидко, на відміну від біохімічних аналізів.

3.3.1 Оцінка адаптивних реакцій при гострій інтоксикації. При однократному введенні подразника (в даному випадку, наночастинок оксиду заліза Fe_2O_3) у дослідних тварин спостерігалось формування реакції переактивації у при введенні частинок розміром 19нм.

Формування загальної реакції переактивації при введенні наночастинок оксиду заліза малої дисперсності може бути пов'язане перш за все з тим, що їх малий розмір дозволяє їм легше проникати в тканини, а також з тим, що частинки малих розмірів значно легше дисоціюють на молекули та йони, що призводить до розвитку окисно-відновних реакцій в клітинах, збільшенню рівня реактивних форм кисню та, як наслідок, прояву цитотоксичної дії наночастинок і розвитку патологічних процесів.

При однократному введенні частинок оксиду заліза розміром 400 нм, у дослідних щурів спостерігалось формування реакції підвищеної активації,

яка є останньою реакцією відповіді на стрес, що може бути обернутою з поверненням фізіологічного стану організму до нормального.

Відмінність реакції при порівнянні двох дослідних груп залежить від дисперсності введених дослідним тваринам частинок – токсична дія частинок оксиду заліза залежить від швидкості їх дисоціації, яка, в свою чергу, обернено пропорційна розмірам частинок.

Значна різниця в розмірах частинок є однією з причин різниці у прояві відповіді організму на стрес-подразник. Так, частинки малої дисперсності дисоціюють швидше, однак їх загальна кількість на одиницю введеного тваринам об'єму була вищою, що збільшувало імовірність їх нейтралізації за допомогою моноцитарно-макрофагальної системи. Натомість загальна кількість частинок великої дисперсності була меншою – як і швидкість їх дисоціації на окремі молекули, завдяки чому загальна інтоксикація організму, імовірно, була нижчою.

3.3.2 Оцінка адаптивних реакцій при субхронічній інтоксикації.

Тривала дія довільно вибраного стрес-фактора певної інтенсивності чинить виснажувальну дію на досліджуваний організм. Розвиток нефізіологічних адаптаційних реакцій у відповідь на подразник залежатиме перш за все від таких факторів, як тривалість та інтенсивність дії. При цьому при дії стресору протягом тривалого часу спостерігатиметься те, що називають кумулятивним ефектом або ефектом накопичення – після досягнення певної фізіологічної межі та вичерпання тих резервних ресурсів організму, які дозволяють обернути дію стресора та відновити нормальний фізіологічний стан, залучатимуться власні ресурси організму, що призведе до їх перерозподілу за пріоритетністю (першим за пріоритетністю буде підтримання базових функцій життєдіяльності, однак наступним після нього стане формування відповіді на стресор та його нейтралізація) [2].

У щурів всіх трьох дослідних груп спостерігалось формування адаптаційної реакції хронічного стресу, що закономірно було пов'язано з

тривалою дією стресора, в даному випадку – колоїдних розчинів наночастинок оксиду заліза різної дисперсності.

Детальний аналіз ступеня вираженості хронічного стресу у різних груп щурів дещо ускладнено через те, що така оцінка має бути комплексною, з урахуванням параметрів різних систем організму, а не тільки крові, однак за наявними даними можна припустити, що ступінь прояву реакції хронічного стресу при субхронічній інтоксикації наночастинками оксиду заліза є величиною, залежною від дисперсності цих часток.

Як було виявлено при аналізі даних з груп щурів з гострою інтоксикацією, при введенні частинок меншої дисперсності в організмі значно швидше розвиваються нефізіологічні адаптивні реакції, що свідчить про швидше виснаження вільних резервних ресурсів організму, спрямованих на компенсацію розвитку патологічних процесів. У групі щурів з субхронічною інтоксикацією, яким вводили наночастинки оксиду заліза тієї ж дисперсності (19 нм) спостерігалось суттєве зниження загальної кількості лейкоцитів при незначних відхиленнях лейкоцитарної формули від показників контрольної групи. Такі дані можуть опосередковано свідчити про те, що у щурів цієї дослідної групи на тлі хронічної стресової реакції компенсація патологічних процесів відбувалася за рахунок тих ресурсів, які за нормальних умов використовувалися організмом для оновлення та регенерації тканин.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Попри велику привабливість застосування в медико-біологічних цілях наночастинок металів та їх оксидів, головним обмежувальним критерієм їх використання є вимога їх хімічної стабільності та інертності разом з можливістю керувати рухом частинок в організмі. Саме тому наночастинок заліза та його оксидів викликають особливий інтерес завдяки найбільшій стабільності серед інших сполук металів та їх парамагнітним властивостям, що дало можливість дослідникам пропонувати їх зокрема в якості інструментів комбінованої терапії онкологічних захворювань.

Незважаючи на привабливість наночастинок Fe_2O_3 для використання у медицині та біології внаслідок їх відносної дешевизни, доступності технології виробництва та парамагнітних властивостей, відкритим залишається питання про їх потенційну цитотоксичність та патологічний вплив на різні системи організму. Саме тому для дослідження їх впливу на імунну систему було обрано наночастинок Fe_2O_3 різної дисперсності та було змодельовано дві ситуації, в яких розвивається залізна інтоксикація двох типів:

1. Гостра – для імітації постфектів залізовмісних контрастів МРТ;
2. Субхронічна – для імітації постфектів магнітної гіпертермії при терапії онкологічних захворювань.

Перевірка моделей проводилася на самцях щурів лінії Вістар з використанням наночастинок Fe_2O_3 трьох фракцій: 19 нм, 75 нм, 400 нм; всі дослідження проводилися з дотриманням норм чинного законодавства України та міжнародних конвенцій з біоетики. В ході досліджень було зафіксовано суттєві зміни клітинної складової імунної системи у дослідних тварин, що свідчить про токсичну дію молекулярних форм оксиду заліза, індукування оксидативного стресу, розвиток запальних реакцій, подібних до алергічних, активацію моноцитарно-макрофагальної системи.

Крім того, на основі отриманих даних було проведено оцінку

адаптивних реакцій організмів дослідних тварин. Однократне введення наночастинок оксиду заліза провокувало розвиток реакції гострого стресу у випадку частинок малої дисперсності – та реакції підвищеної активації у випадку частинок великої дисперсності, що також свідчить про нижчу токсичність частинок великої дисперсності при нечастому застосуванні.

Тривале введення наночастинок оксиду заліза натомість викликало розвиток хронічного стресу незалежно від дисперсності частинок – однак при цьому спостерігалася обернена залежність ступеня виснаженості ресурсів організму від розмірів використовуваних частинок. Так, найбільший токсичний ефект при аналізі моделі субхронічної інтоксикації мали частинки малої дисперсності – що пов'язано з великою швидкістю їх дисоціації на молекулярні форми та, імовірно, також дифузним поширенням молекул оксиду заліза в організмах дослідних тварин.

ВИСНОВКИ

1. Дослідження клітинної складової імунної системи у двох експериментальних моделях показали, що подібність патологічних змін лейкоцитарної формули периферичної крові за гострої та субхронічної інтоксикації можуть бути результатом цитотоксичної дії наночастинок оксиду заліза Fe_2O_3 за різними механізмами залежно від дисперсності частинок (19 нм, 75 нм, 400 нм).

2. В ході досліджень було встановлено залежність ступеня вираженості токсичної дії наночастинок на клітини лейкоцитарного ряду та адаптаційного потенціалу організму від дисперсності частинок Fe_2O_3 , тривалості експозиції в організмі та введених доз. При інтоксикації частинками малої дисперсності спостерігалось суттєве зниження загальної кількості клітин, що свідчило про їх цитотоксичну дію, натомість при інтоксикації частинками середньої та великої дисперсності спостерігалися суттєві зміни клітинного складу, що свідчило про розвиток запальних реакцій, активацію моноцитарно-макрофагальної системи та фагоцитарної функції.

3. Оцінка адаптаційних можливостей дослідних тварин в обох моделях показала, що найбільшу токсичність та виснажувальну дію мають наночастинок малої дисперсності внаслідок пришвидшеної їх дисоціації до молекулярних форм, тоді як частинки великої дисперсності є більш стабільними через свої розміри, а індукований ними хронічний стрес викликаний в першу чергу їх накопиченням в організмі та генерацією подібної до алергічних реакції, що призводить до активації систем імунітету для елімінації чужорідного подразника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бакало Л. В., Дмитруха Н. М., Андрусина І. М. та ін. Накопичення заліза в печінці та зміни біохімічних показників сироватки крові щурів за введення колоїдних розчинів Fe_2O_3 з різними розмірами частинок. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2017; 3(78):48–55.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С. Антистрессорные реакции и активационная терапия. М: ИМЕДИС, 1988. 565 с.
3. Лагутіна О. С. Експериментальна оцінка впливу колоїдних розчинів Fe_2O_3 з частинками різних розмірів на показники імунної системи. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2016; 4: 56-63.
4. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. Офіційний вісник України. 2012; 24:82. (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 01.03.2012 № 249).
5. Резніков О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики. Ендокринологія. 2003;8(1):142–145.
6. Романюк А.М., Рудна М.М., Рудна В.М., Кузенко Є.В. Вплив несприятливих факторів довкілля (солі важких металів) на імунну систему (огляд літератури). Вісник Сумського державного університету. Серія Медицина. 2012; 2: 36-41.
7. Трахтенберг І.М., Дмитруха Н.М., Козлов К.П., Апихтіна О.Л., Короленко Т.К., Краснокутська Л.М. Сучасні підходи щодо профілактики інтоксикацій важкими металами. Таврический медико-биологический вестник. 2012; 15(1):253-257.
8. Трахтенберг, І. М., Дмитруха Н. М. Наночастинки металів, методи отримання, сфери застосування, фізикохімічні та токсичні властивості. Український журнал з проблем медицини праці. 2013; 4: 62-74.
9. Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М. Принципи, методи і показники

експериментальної оцінки безпечності наночастинок металів. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2016; 4: 5-17.

10. Нариси з токсикології важких металів. Випуск V – Залізо: за заг. ред. акад. НАМНУ І. М. Трахтенберга. Київ : ВД «Авіцена», 2017. 88 с.

11. Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М., Короленко Т. К., Легкоступ Л. А., Лагутіна О. С., Козлов К. П., Бакало Л. В. Експериментальне дослідження впливу наночастинок оксиду заліза на організм щурів за умови однократного інтратрахеального введення. Український журнал з проблем медицини праці. 2020. 16: 251–260.

12. Чекман І.С., Дорошенко А.М. Клініко-фармакологічні властивості наночастинок заліза. Укр. мед. часопис. 2010; 3(77): 44–50.

13. Чекман І. С., Дорошенко А. М. Взаємодія наночастинок оксиду заліза з клітиною та компонентами біомембрани. Український медичний часопис. 2012; 1: 31-37.

14. Чекман І. С., Горчакова Н. О., Сирова Г. О., Мітюшова О. О. Поліфункціональні магнітні наночастинки: застосування у медицині. Український медичний часопис. 2012; 5(91): 40-42.

15. Auffan, M., Achouak, W., Rose, J., Roncato, M.-A., Chaneac, C., Waite, D. T. et al. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42(17): 6730–6735.

16. Auffan M., Rose J., Wiesner M.R., Bottero J.Y. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ Pollut.* 2009 Apr; 157(4): 1127-33.

17. Bayda S., Adeel M., Tuccinardi T., Cordani M., Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules.* 2020 Jan; 25(1): 112.

18. Bumajdad A., Ali S., Mathew A. Characterization of iron hydroxide/oxide nanoparticles prepared in microemulsions stabilized with cationic/non-ionic surfactant mixtures. *J Colloid Interface Sci.* 2011 Mar 15; 355(2):282-92.

19. Carrey, J., Mehdaoui B., Respaud M. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization. *J. Appl. Phys.* 2011; 109(083921).
20. Cengelli F., Maysinger D., Tschudi-Monnet F., Montet X., Corot C., Petri-Fink A., Hofmann H., Juillerat-Jeanneret L. Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jul; 318(1): 108-16.
21. Costa C., Brandão F., Bessa M.J., Costa S., Valdiglesias V., Kiliç G. et al. In vitro cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on neuronal and glial cells. Evaluation of nanoparticle interference with viability tests. *J Appl Toxicol.* 2016 Mar; 36(3): 361-72.
22. Davydov V., Rakhmanina A., Kireev I. et al. Solid state synthesis of carbon-encapsulated iron carbide nanoparticles and their interaction with living cells. *Journal of Materials chemistry. B.* 2014 Jul; 2(27): 4250-4261.
23. Dulińska-Litewka J., Łazarczyk A., Hałubiec P., Szafranski O., Karnas K., Karewicz A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Current and Prospective Medical Applications. *Materials (Basel).* 2019 Feb 19;12(4): 617.
24. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986. 53 p.
25. Fernández-Bertólez N., Costa C., Brandão F., Duarte J.A., Teixeira J.P., Pásaro E., Valdiglesias V., Laffon B. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity induced by oleic acid-coated iron oxide nanoparticles in human astrocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2019; 60: 816-829.
26. Feynman, R.Ph. There's Plenty of Room at the Bottom. An invitation to enter a new field of physics. Offprint from: *Engineering and Science Magazine*, February 1960.
27. Gaharwar U.S., Meena R., Rajamani P. Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes. *J Appl Toxicol.* 2017 Oct; 37(10): 1232-1244.

28. Goya G., Marcos-Campos I., Fernández-Pacheco R., Sáez B., Godino J., Asín L. et al. Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biology International*. 2008; 32: 1001-1005.

29. Grudzinski I.P., Bystrzejewski M., Cywinska M.A., Kosmider A., Poplawska M., Cieszanowski A., Ostrowska A. Cytotoxicity evaluation of carbon-encapsulated iron nanoparticles in melanoma cells and dermal fibroblasts. *J Nanopart Res*. 2013;15(8): 1835.

30. Istrate C.M., Holban A.M., Grumezescu A.M., Mogoantă L., Mogoşanu G.D., Savopol T. et al. Iron oxide nanoparticles modulate the interaction of different antibiotics with cellular membranes. *Rom J Morphol Embryol*. 2014; 55(3): 849-56.

31. Könczöl M., Ebeling S., Goldenberg E., Treude F., Gminski R., Gieré R. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF- κ B. *Chem Res Toxicol*. 2011 Sep 19; 24(9): 1460-75.

32. Kumar C.S., Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Aug 14; 63(9): 789-808.

33. Lartigue L., Wilhelm C., Servais J., Factor C., Dencausse A., Bacri J.C., Luciani N., Gazeau F. Nanomagnetic sensing of blood plasma protein interactions with iron oxide nanoparticles: impact on macrophage uptake. *ACS Nano*. 2012 Mar 27; 6(3): 2665-78.

34. Magdolenova Z., Drlickova M., Henjum K., Rundén-Pran E., Tulinska J., Bilanicova D. et al. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2015 May;9 Suppl 1:44-56.

35. Mahmoudi M., Simchi A., Milani A.S., Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2009 Aug 15; 336(2): 510-8.

36. Mahmoudi M., Shokrgozar M.A., Bonakdar S. et al. Interaction of bare and gold-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles with fetal bovine serum. *J*

Iran Chem Soc. 2011 Dec 4; 8(4): 944–950.

37. Mody V.V., Siwale R., Singh A., Mody H.R. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci.* 2010; 2(4): 282-289.

38. Nakamura H., Ito N., Kotake F., Mizokami Y., Matsuoka T. Tumor-detecting capacity and clinical usefulness of SPIO-MRI in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2000; 35(11): 849-55.

39. Naqvi S., Samim M., Abdin M., Ahmed F.J., Maitra A., Prashant C., Dinda A.K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine.* 2010 Nov 16; 5: 983-9.

40. Natarajan, S., Harini, K., Gajula, G.P. et al. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: diverse synthetic approaches, surface modifications, cytotoxicity towards biomedical and industrial applications. *BMC Materials* 2019;1, 2.

41. Périgo E. A., Hemery G., Sandre O., Ortega D., Garaio E., Plazaola F., Teran F. J. Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Applied Physics Reviews* 2015.

42. Petri-Fink A., Chastellain M., Juillerat-Jeanneret L., Ferrari A., Hofmann H. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials.* 2005 May; 26(15): 2685-94.

43. Piñón-Segundo, E., Mendoza Muñoz, N., Quintanar, D. Nanobiomaterials in Clinical Dentistry. Elsevier Inc; 2013. Chapter 23, Nanoparticles as Dental Drug-Delivery Systems; 475-495.

44. Sangeetha J., Thomas S., Arutchelvi J., Doble M., Philip J. Functionalization of iron oxide nanoparticles with biosurfactants and biocompatibility studies. *J Biomed Nanotechnol.* 2013 May; 9(5): 751-64.

45. Saptarshi S.R., Duschl A., Lopata A.L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnol.* 2013;11(26)

46. Seabra A. B., Pasquôto T., Ferrarini A. C. F., da Cruz Santos M., Haddad P. S., de Lima R. Preparation, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity

evaluations of thiolated-and S-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: implications for cancer treatment. *Chemical research in toxicology*. 2014; 27(7): 1207-1218.

47. Singh N., Jenkins G.J., Asadi R., Doak S.H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*. 2010;1.

48. Skachkova O., Antonuk S., Orel V., Khranovska N., Inomistova M. The influence of iron oxide nanoparticles on the viability of the generated human dendritic cells. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*. 2018; 23(2): 5-9.

49. Soler M.A., B ao S.N., Alc antara G.B., Tib urcio V.H., Paludo G.R., Santana J.F. et al. Interaction of erythrocytes with magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007 Mar; 7(3): 1069-71.

50. Song Zhang, Xiangjian Chen, Chunrong Gu, Yu Zhang, Jindan Xu, Zhiping Bian et al. The effect of iron oxide magnetic nanoparticles on smooth muscle cells. *Nanoscale Research Letters*. 2009; 4: 70-77.

51. Teske S.S., Detweiler C.S. The biomechanisms of metal and metal-oxide nanoparticles' interactions with cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12(2): 1112-1134.

52. Valdiglesias V., Kili  G., Costa C., Fernandez-Bertolez N., Pasaro E., Teixeira J. P., Laffon B. Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2015; 56: 125-148.

53. Zavisova V., Koneracka M., Kovac J., Kubovcikova M., Antal I., Kopcansky P. et al. The cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different modifications evaluated in vitro. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2015; 380: 85-89.

54. Zehua Yu, Hongwei Liu, Xinxin Hu, Wei Song, Rutao Liu. Investigation on the toxic interaction of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with catalase. *Journal of Luminescence*. 2015; 159: 312-316.