

УДК 537.622:615.03:616-091.8

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ТЕСТИРОВАНИЕ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИГИДРИТА *IN VIVO*

© 2020 г. С. В. Столяр^{1,2,3}, В. П. Ладыгина², А. В. Болдырева^{2,*}, О. А. Коленчукова³,
А. М. Воротинов¹, М. Ш. Баирмани^{4,5}, Р. Н. Ярославцев^{1,2}, Р. С. Исааков¹

¹Институт физики имени Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук –
обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Сибирский федеральный университет”, Красноярск, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Астраханский государственный университет”, Астрахань, Россия

⁵Зеленый университет Аль-Касым, Биотехнологический колледж, Аль-Касым, Ирак

*E-mail: lamp15@bk.ru

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

При культивировании микроорганизмов *Klebsiella oxytoca*, получен золь, содержащий биогенные наночастицы ферригидрита. В статье приводятся данные по изучению его физических свойств и влияния на организм лабораторных животных в модели экспериментальной гемолитической анемии по показателям функциональной активности эритроцитов и морфологическому описанию органов.

DOI: 10.31857/S0367676520110290

ВВЕДЕНИЕ

Ферригидрит $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ или оксигидроксид Fe^{3+} по сравнению с гидроксидами и оксидами Fe^{3+} является соединением с наибольшей метастабильностью. Благодаря этому ферригидрит играет огромную роль в метаболизме живых организмов. Он формируется в ядре белкового комплекса – ферритина, представляющего собой капсулу из белка – апоферритина. Размер наночастиц ферригидрита лежит в диапазоне от 2 до 8 нм. Несмотря на то, что ферригидрит характеризуется антиферромагнитным порядком с температурой Нееля ~ 350 К, наличие дефектов, обусловленных наноразмерным состоянием, приводит к появлению у антиферромагнитной частицы нескомпенсированного магнитного момента [1–5]. Последнее открывает перспективы использования наночастиц ферригидрита в различных экологических [6, 7] и биомедицинских приложениях [8, 9]. Для лечения железодефицитной анемии используются железосодержащие комплексы, покрытые полисахаридами. Фармацевтические железо-полисахаридные комплексы состоят из наночастиц гидроксида железа размером несколько нанометров. Наночастицы ферригидрита, синтезируемые *Klebsiella oxytoca*, встроены в полисахаридную

матрицу, поэтому также могут оказаться перспективным препаратом при железодефицитной анемии. Перспектива практического использования наночастиц ферригидрита требует изучения механизмов взаимодействия наночастиц с клетками организма, путей их преобразования и выведения, а также возможные токсические эффекты.

Цель данной работы заключается в изготовлении биогенных наночастиц ферригидрита в результате культивирования микроорганизмов *Klebsiella oxytoca*, изучении их физических свойств, а также в исследовании влияния золя ферригидрита на организм лабораторных животных при моделировании гемолитической анемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используемые микроорганизмы *Klebsiella oxytoca* были выделены из сапропеля озера Боровое (Красноярский край). Микроорганизмы культуры *Klebsiella oxytoca* были высеяны на среду Lovley на цитрате железа. Для выделения ферригидрита из осадка и получения золя бактериальная биомасса была отделена от надосадочной жидкости, далее клетки бактерий разрушались ультразву-

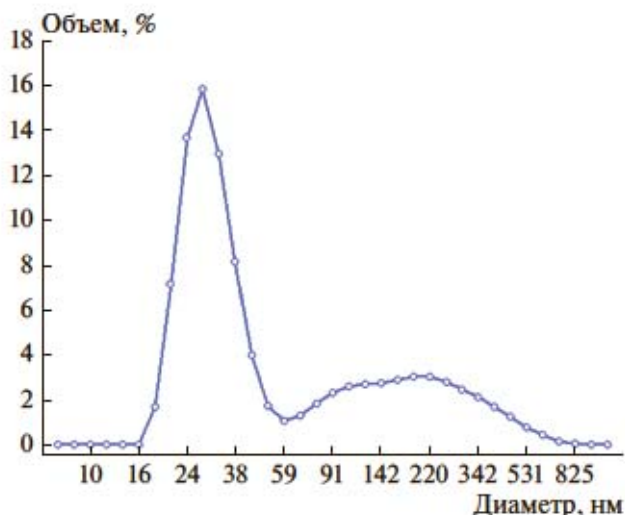


Рис. 1. Распределение гидродинамического диаметра агрегатов золь ферригидрита.

ком. Полученный осадок промывали дистиллированной водой.

Спектры магнитного резонанса измеряли на спектрометре Bruker ELEXSYS 560, работающем в X-диапазоне (характерная частота СВЧ излучения ~ 9.4 ГГц) в диапазоне температур 100–300 К. Размер наночастиц определяли методом динамического рассеяния света (ДРС, DLS) на приборе Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd, HeNe лазер, $\lambda = 632.8$ нм, Центр коллективного пользования (ЦКП) ФИЦ КИЦ СО РАН, г. Красноярск).

Для исследования влияния наночастиц на организм лабораторных животных использовали золь ферригидрита, концентрация железа в котором составляла 2.4 г/л. Концентрацию железа измеряли на атомно-абсорбционном спектрометре Perkin Elmer A Analyst 400 ЦКП ФИЦ КИЦ СО РАН. Дозировка стабилизированной суспензии ферригидрита была выбрана из расчета лечебной дозы коммерческого препарата ферранимала 75 (ООО Фирма «А-БИО», Россия), представляющего собой коллоидный раствор комплекса гидроксиды трехвалентного железа в декстране.

Влияние препаратов изучали на половозрелых самцах крыс породы Вистар, массой тела 220 ± 40 г, из которых были сформированы 3 группы: 1 (8 крыс) — интактные животные; 2 (8 крыс) — многократное введение ферранимала-75; 3 (8 крыс) — многократное введение стабилизированной суспензии ферригидрита. У всех животных вызывалась токсическая гемолитическая анемия на первые сутки после начала эксперимента, путем внутривенного введения солянокислого фенолгидроина в дозе 6 мг/100 гр массы тела.

В момент наступления анемии (4 сут) начинали воздействие препаратами (в одной дозировке 75 мг/кг Fe(III), внутримышечно, в заднебедренную группу мышц), которое продолжалось в тече-

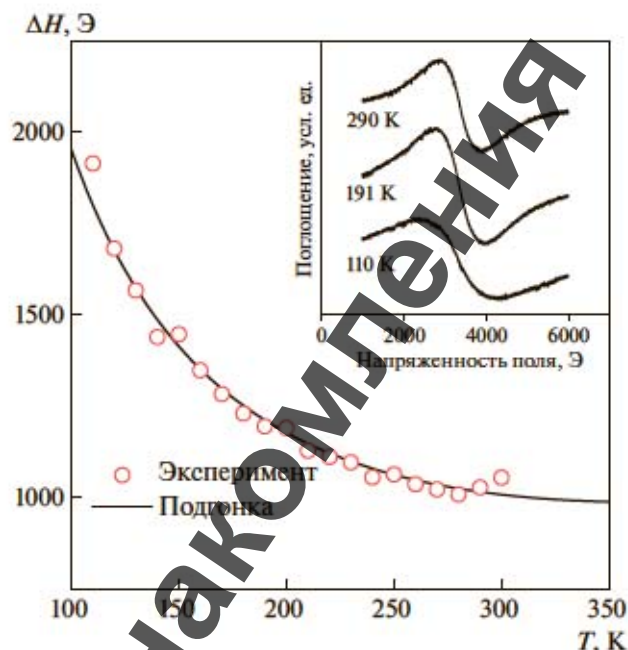


Рис. 2. Температурная зависимость ширины линии ферромагнитного резонанса наночастиц ферригидрита. На вставке спектры ФМР для трех температур.

ние 30 сут, каждые 8 сут. На 1, 4, 8, 15 и 30 сут определялись такие функциональные показатели эритроцитов, как насыщение гемоглобина кислородом и способность крови к переносу кислорода на приборе ABL-800 FLEX (Radiometр, Дания).

По окончании эксперимента всех животных подвергали эвтаназии. Материалом для гистологического исследования служили образцы печени и селезенки, из которых готовили гистологические препараты по стандартными методом с окрашиванием для обзорных целей гематоксилином и эозином и на соединения железа [III] — по Перлсу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения гидродинамического радиуса наночастиц в золях показаны на рис. 1. Распределение наночастиц имеет полимодальный вид с модальными значениями 28.2, 105.7 и 220.2 нм. Фактически, диаметр наночастиц ферригидрита, определенный с помощью просвечивающей электронной микроскопии, составляет 2–7 нм. Регистрируемые по динамическому рассеянию наночастицы представляют собой агрегаты. Агрегация магнитных наночастиц в коллоидных растворах обусловлена электростатическим и магнитостатическим взаимодействиями. Доля наноразмерных агрегатов с гидродинамическим диаметром порядка 28 нм составляет 65%, а доля крупных образований — 35%.

На рис. 2 приведена температурная зависимость ширины линии ферромагнитного резонанса $\Delta H(T)$ высушенного золь наночастиц. На вставке на рис. 2 приведены кривые резонансного поглощения для

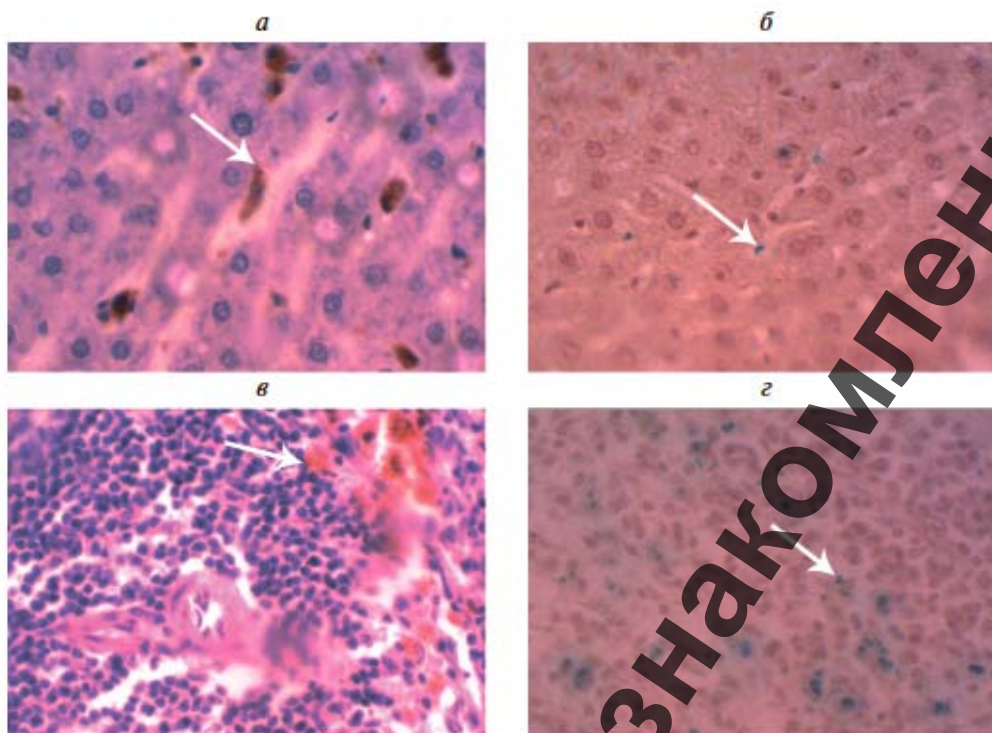


Рис. 3. Гистологические препараты органов крысы. Окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$. (а) Печень крысы 2 группы. Отмечается отложение гемосидерина. Окраска гематоксилином и эозином. (б) Печень крысы 3 группы. Видны единичные частицы, окрашенные в синий цвет. Окраска по Перлсу. (в) Селезенка крысы 2 группы. Отмечается отложение гемосидерина в красной и белой пульпе. Окраска гематоксилином и эозином. (г) Печень крысы 3 группы. Видны наночастицы ферригидрита, окрашенные в синий цвет в красной и белой пульпе органа.

трех температур. Интенсивность сигнала ФМР практически линейно уменьшалась во всем измеряемом диапазоне температур, свидетельствуя о том, что наночастицы находятся в разблокированном, SP состоянии.

Согласно результатам [10], в порошках хаотически ориентированных частиц ферромагнетиков и ферритов, ширина линии поглощения оказывается немонотонной функцией температуры: $\Delta H(T) = \Delta H_s(T) + \Delta H_u(T)$, где $\Delta H_s(T)$ – вклад в уширение, обусловленный суперпарамагнетизмом наночастиц, $\Delta H_u(T)$ – вклад в уширение обусловленный разбросом направлений полей анизотропии частиц (неоднородное уширение). $\Delta H_s(T)$ и $\Delta H_u(T)$ являются функциями ланжевеновского параметра $x = MV\omega/\gamma kT$, где M – намагниченность, V – объем частицы, k – постоянная Больцмана, T – температура, ω – частота, γ – гиромагнитное отношение. $\Delta H_s(T) = \omega\alpha(x - L_1)/(\sqrt{3x\gamma L_1})$; $\Delta H_u(T) = 3\omega\epsilon L_2/\gamma L_1$, где $\alpha = 0.01$ – параметр затухания, $\epsilon = K\gamma/M\omega$, K – константа анизотропии, $L_{1,2}$ – функции Ланжевена. Кривая, проведенная на рис. 2 характеризуется двумя подгоночными параметрами: KV и MV . В нашем случае $KV = 1.25 \cdot 10^{-14}$ эрг и $MV = 2.37 \cdot 10^{-17}$ ед. Полученная величина анизотропии находится в хорошем согласии с величинами KV для ферригидритов различ-

ного происхождения. Так, для ферритина $KV = 2.5 \cdot 10^{-14}$ эрг [11], для ферригидрита, полученного методом химического осаждения $KV = 2 \cdot 10^{-14}$ эрг [12].

Исследование влияния золя ферригидрита, при экспериментальном моделировании гемолитической анемии у крыс показало его большую эффективность относительно коммерческого препарата ферранимал-75. Так, во 2 и 3 группах, на четвертые сутки после введения фенолгидрозина отмечено снижение исследуемых показателей в 1.65 раза ($p = 0.036$) относительно контрольной группы. На 15 сут после введения золя ферригидрита и коммерческого препарата во 2 группе происходила стабилизация показателей и возвращение их к контрольному диапазону при этом, у крыс 3 группы исследуемые показатели были выше контроля в 1.2 раза ($p = 0.04$).

Морфологические изменения, обнаруженные при изучении печени крыс 1 группы, включают в себя, нарушение гемодинамики и развитие альтернативных процессов в паренхиматозных клетках органа. Балочное строение органа сохранено, гепатоциты в состоянии зернистой дистрофии. Окраска по Перлсу отрицательная.

При исследовании печени животных 2 группы, отмечались дистрофические процессы и отложе-

ние гемосидерина в паренхиме органа (рис. 3а). Балочное строение печени сохранено, гепатоциты в состоянии зернистой дистрофии. Окраска по Перлсу положительная.

В печени у крыс 3 группы отмечается сохранение балочного строения органа. Гепатоциты находились в состоянии умеренной зернистой дистрофии. Окраска по Перлсу положительная и показывает частичное распределение наночастиц железа в паренхиме органа (рис. 3б).

Микроморфология селезенки у крыс 1 группы не нарушена. Паренхима органа представлена хорошо различимой красной и белой пульпой. Окраска по Перлсу отрицательная.

При исследовании селезенки 2 опытной группы основные структурные элементы органа в виде белой и красной пульпы хорошо различимы. Фолликулы средних и крупных размеров. В красной и белой пульпе отмечается отложение гемосидерина в виде зерен (рис. 3в), дающих положительную реакцию на железо при окраске по Перлсу.

В селезенке крыс 3 группы, отмечалось распространение наночастиц как в паренхиме, так в строме органа, дающих положительную реакцию при окраске по Перлсу (рис. 3г). В селезенке отмечается увеличение площади красной пульпы, по отношению к белой. Фолликулы имели разные размеры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе были исследованы наночастицы биогенного ферригидрита, синтезированные в результате культивирования бактерий *Klebsiella oxytoca*. Из температурных зависимостей ширины линии ФМР определены величины, характеризующие анизотропию и намагниченность: $KV = 1.25 \cdot 10^{-14}$ эрг и $MV = 2.37 \cdot 10^{-17}$ едм соответственно.

Изучение функциональной активности эритроцитов показало быстрое восстановление контрольных параметров при воздействии золя ферригидрита в отличие от коммерческого препарата ферримала-75.

Результаты гистологического исследования показывают разное накопление железа. Коммерческий препарат обладает хронической токсичностью, и характеризуются накоплением железа в печени и селезенке в виде гемосидерина. При введении в организм золя ферригидрита от-

мечается частичное отложение гемосидерина в печени, что указывает на быструю элиминацию из органа и отложение в селезенке, свидетельствующие о компенсаторном усилении гемопоэза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 19-42-240012 р_а “Магнитный резонанс в наночастицах ферригидрита: эффекты, связанные со структурой “ядро-оболочка”. Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-1263.2020.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silva N.J.O., Amaral V.S., Carlos L.D. // Phys. Rev. B. 2005. V. 71. № 18. Art. № 184408.
2. Sehra M.S., Singh V., Song X. et al. // J. Phys. Chem. Sol. 2010. V. 71. № 9. P. 1362.
3. Balaev D.A., Krasikov A.A., Dubrovskiy A.A. et al. // J. Appl. Phys. 2016. V. 120. № 18. Art. № 183903.
4. Балаев Д.А., Красиков А.А., Дубровский А.А. и др. // Физ. тв. тела. 2016. Т. 58. № 2. С. 280; Balaev D.A., Krasikov A.A., Dubrovskiy A.A. et al. // Phys. Sol. St. 2016. V. 58. № 2. P. 287.
5. Столяр С.В., Баюков О.А., Гуревич Ю.Л. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2007. Т. 71. № 9. С. 1320; Stolyar S.V., Bayukov O.A., Gurevich Yu.L. et al. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2007. V. 71. № 9. P. 1286.
6. Casentini B., Gallo M., Baldi F. // J. Environ. Chem. Eng. 2019. V. 7. № 1. Art. № 102908.
7. Столяр С.В., Баюков О.А., Ладыгина В.П. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2017. Т. 81. № 5. С. 660; Stolyar S.V., Bayukov O.A., Ladygina V.P. et al. // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2017. V. 81. № 5. P. 608.
8. Инжеваткин Е.В., Коленчукова О.А., Добрецов К.Г. и др. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2020. Т. 169. № 5. С. 614.
9. Stolyar S.V., Balaev D.A., Ladygina V.P. et al. // J. Supercond. Nov. Magn. 2018. V. 31. № 8. P. 2297.
10. Poperechny I.S., Raikher Y.L. // Phys. Rev. B. 2016. V. 93. № 1. Art. № 14441.
11. Wajnberg E., El-Jaick L.J., Linhares M.P. et al. // J. Magn. Reson. 2001. V. 153. № 1. P. 69.
12. Столяр С.В., Ярославцев Р.Н., Исхаков Р.С. и др. // ФТТ. 2017. Т. 59. № 3. С. 555; Stolyar S.V., Yaroslavtsev R.N., Iskhakov R.S. et al. // Phys. Sol. St. 2017. V. 59. № 3. P. 555.