

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В.А. Кратасюк
подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Возможность применения наночастиц железа, выделенных из культуры бактерий *Klebsiella oxytoca*, для лечения анемии у крыс

06.04.01 Биология

06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель	_____	д. б. н., профессор	О. А. Коленчукова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		Е. А. Бирюкова
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	д.б.н., доцент	Е. В. Инжеваткин.
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Возможность применения наночастиц железа, выделенных из культуры бактерий *Klebsiella oxytoca*, для лечения анемии у крыс» содержит 51 страницу текстового документа и 50 использованных источников.

Цель работы: оценить влияние наночастиц ферригидрита на организм крыс в модели гемолитической анемии, при сравнении с коммерческим препаратом.

Проводился анализ функциональной активности эритроцитов, лейкоцитарной формулы, результатов гистологического исследования печени, селезенки и легких у группы крыс, с моделью гемолитической анемии, при лечении суспензией ферригидрита и препаратом Феранимал-75.

В ходе исследования было обнаружено, что влияние суспензии ферригидрита на организм крыс сопоставима с препаратом Феранимал-75. Данный результат позволяет рассматривать наночастицы ферригидрита как возможный препарат для лечения анемии.

Ключевые слова: ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АНЕМИЯ, НАНОЧАСТИЦЫ ЖЕЛЕЗА, ФЕРРИГИДРИТ, KLEBSIELLA OXYTOCA, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ, ЛЕЙКОЦИТАРНАЯ ФОРМУЛА, ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Железо	6
1.1 Содержание и функции в организме	6
1.2 Обмен железа	8
2 Анемия	11
2.1 Распространенность заболевания	11
2.2 Классификация и симптоматика анемий	11
2.3 Генетические нарушения обмена железа	14
2.4 Морфологические изменения органов и тканей при анемии	15
2.5 Современные методы лечения и тенденция усовершенствования препаратов	16
2.6 Особенности моделирования анемии	18
3 Наночастицы	21
3.1 Перспективы использования современной медицине	21
3.2 Токсичность наночастиц железа	23
3.3 Биосинтез наночастиц	25
3.3.1 <i>Klebsiella oxytoca</i> как источник наночастиц	26
4 Материалы и методы исследования	29
4.1 Получение и выделение наночастиц	29
4.2 Объекты исследования	29
4.3 Исследование функциональных показателей крови	30
4.4 Анализ лейкоцитарной формулы	31
4.5 Подготовка гистологических препаратов	31
4.6 Статистическая обработка результатов	32
5 Результаты исследования	33
5.1 Функциональная активность эритроцитов Ошибка! Закладка не определена.	
5.2 Анализ лейкоцитарной формулы Ошибка! Закладка не определена.	
5.3 Гистологическое исследование Ошибка! Закладка не определена.	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	34
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	36

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения в обмене железа являются наиболее распространенными нарушениями гомеостаза у населения. Высокая частота встречаемости отражает сочетание необходимости железа для всех живых организмов и его относительно ненадежный баланс в организме [1]. В следствии этого, анемия является часто встречаемым заболеванием. В отчете ВОЗ за 2005 г., анемии было подвержены 1,62 млрд человек, что соответствовало 24,8% населения [2].

Препараты железа, для коррекции его недостатка, чаще всего, вводятся двумя путями: перорально и внутривенно. При пероральном введении препарата часто наблюдаются его недостаточное всасывание в кишечнике, а также развитие оксидативного стресса, который приводит к значительным повреждениям клеток слизистой оболочки кишечника [3]. Внутривенное введение периодически вызывает ответную аллергическую реакцию и требует введения через капельницу, что является достаточно продолжительным процессом и доставляет пациенту дискомфорт [4]. На данный момент, стратегии разработки новых терапевтических препаратов направлены в сторону уменьшения размеров частиц железа для их большей биодоступности и, как следствие, лучшей усвояемости и минимизации побочных эффектов [5].

В частности, для лечения железодефицитной анемии иногда используются железосодержащие комплексы, покрытые полисахаридами, которые состоят из наночастиц гидроксида железа размером в несколько нанометров. Наночастицы ферригидрита, синтезируемые *Klebsiella oxytoca*, встроены в полисахаридную матрицу, поэтому также могут оказаться перспективным препаратом при лечении анемии [6]. Таким образом, *K. oxytoca* и продуцируемые ей наночастицы имеют широкие перспективы для дальнейших исследований в области экологии, биологии и медицины. Также, необходимо тщательно изучить механизмы взаимодействия наночастиц с

клетками, органами и тканями, пути их преобразования и выведения, а также их возможное токсическое влияние на живой организм.

Объектом данного исследования служили наночастицы железа, выделенные из культуры бактерий *K. oxytoca*. Предметом служило их воздействие на организм крыс с индуцированной гемолитической анемией.

Цель эксперимента – оценка влияния наночастиц ферригидрита на организм крыс в модели гемолитической анемии, при сравнении с коммерческим препаратом.

В работе поставлены следующие задачи:

1. Оценить лейкоцитарную формулу крыс после воздействия наночастицами ферригидрита и коммерческим препаратом.
2. Исследовать показатели транспорта кислорода кровью после воздействия наночастицами ферригидрита, с их последующем сравнением с коммерческим препаратом.
3. Проанализировать гистологическую картину печени, селезенки и легкого после воздействия наночастицами ферригидрита в сравнении с коммерческим препаратом.
4. Оценить возможность применения наночастиц ферригидрита при лечении гемолитической анемии.

1 Железо

1.1 Содержание и функции в организме

Железо является вторым по распространенности металлом в земной коре, и имеет важное для жизни значение. Это компонент многих функций организма, в первую очередь - синтеза гемоглобина и транспорта кислорода [7].

Железо, как компонент гемоглобина в эритроцитах, требуется для транспортировки кислорода по всему организму и, в форме миоглобина, для хранения и использования кислорода в мышцах. Кислород, выделяющийся в тканях из гемоглобина, используется в окислительном обмене веществ [8].

Железо также присутствует в качестве компонента железосерных комплексов в ферментах, которые отвечают за транспорт электронов и выработку энергии при митохондриальном дыхании и цикле лимонной кислоты, а также за рибонуклеотидредуктазу, которая необходима для синтеза ДНК.

Железо в геме поддерживается в восстановленном двухвалентном состоянии (Fe^{2+}) для транспорта кислорода гемоглобином и для хранения и использования кислорода в мышцах миоглобином [1].

Выделяют 3 последовательных этапа обеднения организма железом (по Гейнриху):

1. Прелатентный дефицит железа характеризуется отсутствием анемии – гемоглобиновый фонд сохранен, содержание сывороточного железа при этом находится в пределах нормы, наблюдается снижение уровня ферритина.

2. Латентный дефицит железа характеризуется сохранением гемоглобинового фонда железа. При данном типе анемии не наблюдается, уменьшается уровень сывороточного железа, повышается ОЖСС.

3. Железодефицитная анемия наблюдается при следующих показателях

1. легкая степень: гемоглобин находится в пределах 120–90 г/л;
2. средняя степень тяжести: гемоглобин в пределах 89–70 г/л;
3. тяжелая степень тяжести: уровень гемоглобина 70 г/л [2];

Биодоступность железа, при лечении анемии с помощью диет, оценивается очень низко: около 14% – 18% для смешанных диет и 5% – 12% для растительных диет. Ингибиторы всасывания железа, такие как фитат, танены и оксалаты, могут ухудшить этот показатель [9].

Человеческий организм имеет несколько механизмов, благодаря которым уровень железа поддерживается в гомеостазе. Контролируемое поглощение железа, рециркуляция и хранение представляют собой часть этих механизмов. Процесс потери железа осуществляется за счет кровоточивости, потливости и отслоения эпителиальных клеток. Однако могут произойти изменения в абсорбции, хранении и высвобождении клеточного железа, которые усилят этот процесс. Всякий раз, когда требуется больше железа, организм увеличивает его всасывание в двенадцатиперстной кишке и высвобождение из макрофагов и клеток-накопителей. С другой стороны, при перегрузке железом, его поглощение ингибируется, а накопление увеличивается, чтобы предотвратить токсическое действие избытка свободного железа [10].

Средний взрослый человек хранит около 1-3 г железа в своем теле. Приблизительно 1 мг железа теряется каждый день из-за отслоения клеток с поверхности кожи и слизистой оболочки, включая слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта. Менструация увеличивает среднесуточную потерю железа примерно до 2 мг в день у женщин в предменопаузе. Увеличение массы тела во время всплесков роста новорожденных и детей временно повышает потребность в железе [11].

подавляющее большинство железа (около 2300 мг, 65%) содержится в гемоглобине и эритроцитах. Приблизительно 350 мг содержится в миоглобине мышц, а также в ферментах и цитохромах других тканей. Из остального около 500 мг содержится в макрофагах ретикулоэндотелиальной системы, около 200–1000 мг хранится в гепатоцитах в форме ферритина, а 150 мг железа содержится в костном мозге [12,13].

Усвоение железа осуществляется в нескольких формах: неорганический, гем и ферритин. Неорганическое пищевое железо в основном присутствует в окисленной форме (Fe^{3+}) и должно быть восстановлено до формы Fe^{2+} до всасывания в кишечнике. После восстановления Fe^{2+} транспортируется через апикальную мембрану с помощью транспортера двухвалентного металла 1 (DMT1) [14].

1.2 Обмен железа

Гемовое железо, полученное из гемоглобина и миоглобина (мясо, морепродукты, птица), является наиболее легко усваиваемой формой (от 15% до 35%) и составляет 10% или более от общего количества поглощенного нами железа. Негемовое железо происходит из растений и обогащенных железом продуктов, и усваивается хуже [15].

Неорганическое пищевое железо всасывается энтероцитами двенадцатиперстной кишки через DMT1. Учитывая, что железо в значительной степени принимает окисленное состояние, оно сначала должно быть восстановлено мембраносвязанной ферридуктазой DcytB (Cybrd1) [16].

В энтероцит железо может следовать 2 путям: сохраняется небольшая ферритин-связанная часть; остальное транспортируется через базолатеральную мембрану энтероцита ферропортом 1, которому помогает белок - гепестин. Следствием роли DMT1 в рециркуляции железа из цикла рецепторов трансферрина – 1 является то, что мутации, влияющие на DMT1, не только вызывают анемию, ограничивая потребление железа с пищей, но и

одновременно вызывают внутриклеточную перегрузку железом через механизм его удержания [17]. Попав внутрь энтероцита, железо может храниться в виде ферритина или транспортироваться в кровоток.

Мономеры ферритина обладают ферроксидазной активностью ($\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$), которая позволяет мобилизовать ионы Fe^{2+} из структуры кристаллической решетки ферригидрита, обеспечивая его последующий отток из энтероцита через ферропортин. В кровоток молекулы попадают через базолатеральную мембрану энтероцита.

Ферритин, который не связан с железом, называется апоферритином. Он обладает собственной каталитической активностью, которая окисляет двухвалентное железо в трехвалентное.

Для экспорта энтероцитарного железа через ферропортин требуется гепестин, многоатомная оксидаза, гомологичная церулоплазмина, которая окисляет Fe^{2+} до Fe^{3+} для загрузки на трансферрин. Затем трансферрин поглощается тканями и используется для многих процессов, таких как эритропоэз в костном мозге, синтез миоглобина в мышцах и окислительного метаболизма. Макрофаги селезенки, печени и костного мозга, принадлежащие к ретикулоэндотелиальной системе, имеют задачу утилизации железа из стареющих эритроцитов. Печень обладает важной функцией запаса и регуляции железа. Через производство гормона гепсидина она контролирует его высвобождение из энтероцитов и макрофагов в кровоток [15,16,18].

Гепсидин в основном экспрессируется в печени, из гена *HAMP*, расположенного на длинном плече хромосомы 19 (19q13.1). Этот гормон действует путем связывания с поверхностью клетки ферропортина, индуцируя его интернализацию и деградацию. Экспрессия гепсидина была также обнаружена в макрофагах, бета-клетках поджелудочной железы, почках, адипоцитах и легких. Транскрипция *HAMP* регулируется высоким уровнем железа, инфекцией и воспалением, в то время как анемия и эритропоэз

подавляют его экспрессию. С помощью регуляции экспрессии НАМР, человеческий организм избегает как токсических последствий перегрузки железом, так и негативных физиологических последствий его дефицита [19,10].

2 Анемия

2.1 Распространенность заболевания

Анемия является широко распространенной и значительной глобальной проблемой здравоохранения. По сообщениям Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), на период до 2005 г. анемией страдают 1,62 млрд человек, что соответствует почти четверти населения земли. При этом, чуть меньше половины (47%) - дети дошкольного возраста. Почти у 469 млн небеременных женщин присутствовала анемия различного генеза. К 2008 г., анемия была выявлена у 1,9 млрд жителей планеты. При этом распространенность анемии как симптома другого заболевания гораздо выше [2]. Такая высокая частота встречаемости этого заболевания порождает необходимость в усовершенствовании существующих методов диагностики и лечения, особенно в странах с низким уровнем развития, где прогресс был медленным и неравномерным.

2.2 Классификация и симптоматика анемий

В клинической практике наиболее распространена следующая классификация анемий:

1. Заболевание вызвано острой кровопотерей
2. Заболевание является следствием нарушения продукции эритроцитов
3. Заболевание является следствием повышенного разрушения эритроцитов (гемолитические)

Апластическая анемия (АА) является редким, опасным для жизни расстройством костного мозга, которое поражает пациентов всех возрастов и вызвано разрушением лимфоцитов ранними гематопозитическими клетками. Диагностика АА требует комплексного подхода с быстрой оценкой унаследованных и вторичных причин аплазии костного мозга при

одновременном оказании агрессивной поддерживающей терапии. АА следует подозревать у пациентов с панцитопенией и гипоклеточным костным мозгом. Типичные симптомы включают усталость и легкие кровоподтеки (или кровотечение), могут присутствовать различные инфекции. Ежегодная заболеваемость АА составляет ~ 2 случая на миллион. За редкими исключениями (такими как хлорамфеникол, противоэпилептические средства), установить причинно-следственную связь заболевания с лекарственными средствами или токсинами сложно.

Выбор терапии определяется рядом факторов, включая степень тяжести АА, возраст пациента, доступность донора и доступ к оптимальной терапии. Для недавно диагностированной тяжелой апластической анемии показана пересадка костного мозга. Фронтальная терапия у пациентов старшего возраста и у всех пациентов, у которых отсутствует донор, включает иммуносупрессивную терапию с использованием антитимоцитарного глобулина лошади и циклоспорина А [20].

Основной причиной железодефицитной анемии является дисбаланс между потребностью в железе и его запасами в организме, в том числе, из-за заболеваний, связанных с кровопотерей. Основные причины дисбаланса железа: недостаточное его потребление и / или ненормальная потеря (хроническое кровотечение). Признаки и симптомы могут включать в себя: крайнюю усталость, слабость, бледность кожных покровов, боль в груди, учащенное сердцебиение или одышка, головную боль, головокружение, плохой аппетит, особенно у младенцев и детей. Когда уровень гемоглобина падает до 80—70 г/л, возможны нарушения работы сердечно-сосудистой системы. При концентрации гемоглобина менее 40 г/л высока вероятность развития анемической комы [21, 7].

Мегалобластная анемия — анемия, возникающая в результате ингибирования синтеза ДНК при производстве эритроцитов. Важнейшим

признаком этих анемий является производство костным мозгом необычно больших, структурно аномальных, незрелых эритроцитов (мегалобластов). В периферической крови выявляются макроциты и мегалоциты [22].

Сидеробластная анемия – врожденное наследственное заболевание, связанное с нарушением синтеза протопорфирина и вариабельной микроцитарной анемией. При этом типе анемии костный мозг производит кольцевые сидеробласты, а не здоровые эритроциты [23].

Гемолитические анемии обусловлены повышенным разрушением эритроцитов. Выделяют две основные группы гемолитических анемий: наследственные и приобретенные.

Наследственная гемолитическая анемия может быть обусловлена:

1. Дефектами в мембранах эритроцитов
2. Дефектами активности ферментов эритроцитов
3. Дефектным метаболизмом эритроцитов (дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и пируваткиназы).

Приобретенная гемолитическая анемия может быть вызвана лекарственными препаратами, иммуноопосредованными и другими различными причинами. [24].

Гемолитическая анемия существует в спектре от хронической до угрожающей жизни и заслуживает рассмотрения у всех пациентов с необъяснимой нормоцитарной или макроцитарной анемией. Патопфизиология преждевременного разрушения эритроцитов может происходить интраваскулярно или экстраваскулярно в ретикулоэндотелиальной системе, хотя последнее встречается чаще. Первичным внесосудистым механизмом является секвестрация и фагоцитоз из-за плохой деформируемости эритроцитов (т. е. неспособности изменить форму достаточно, чтобы пройти через селезенку). Антитело-опосредованный гемолиз приводит к фагоцитозу или комплемент-опосредованному разрушению, и может так же происходить

интраваскулярно или экстраваскулярно. Внутрисосудистые механизмы включают в себя прямое разрушение клеток, фрагментацию и окисление. Прямое разрушение клеток вызывается токсинами, травмами или лизисом. Фрагментарный гемолиз возникает тогда, когда внешние факторы вызывают сдвиг и разрыв эритроцитов. Окислительный гемолиз происходит, когда защитные механизмы клеток перегружены [25].

В исследовании Sarah Millot etc. оценивалось влияние гемолиза и регенеративной анемии на синтез гепсидина и метаболизм железа. В результате этого эксперимента выяснилось, что железо в основном накапливалось в макрофагах печени и селезенки, но насыщение трансферрином оставалось в пределах нормы. Уровни экспрессии гемоглобин-гаптоглобинового рецептора CD163 и гемопексинового рецептора CD91 были резко снижены как в печени, так и в селезенке, что привело к выведению гема- и гемоглобинового железа с мочой. Результаты исследования подчеркивают механизм мочевого клиренса железосвязанного гемоглобина и убедительно предполагают, что почки могут играть важную роль в защите гепатоцитов от перегрузки железом при хроническом гемолизе [26].

2.3 Генетические нарушения обмена железа

Различные другие редкие анемии прямо или косвенно связаны с генетическими дефектами обмена железа. В отличие от железодефицитной анемии диетического происхождения, терапевтические возможности врожденной анемии остаются глобально ограниченными и в большинстве своем основаны на симптоматическом лечении системного избытка железа (с опорой на хелатное лечение) или его дефицита (в основном переливание или парентеральные добавки железа).

Железорезистентная железодефицитная анемия - это аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене TMPRSS6. Матриптаза-2 физиологически снижает синтез гепсидина печенью. Действуя

как «антиматриптаза-2», мутации TMPRSS6 сильно усиливают продукцию гепсидина и поэтому вызывают как снижение всасывания железа в двенадцатиперстной кишке, так и снижение высвобождения селезенкой железа, происходящего из нормального эритрофагоцитоза. Глобальный результат этой мутации на уровне плазмы - заметное снижение концентрации железа и насыщения трансферрином, что приводит к гипохромной и микроцитарной анемии. Нынешнее лечение в основном основано на парентеральном введении железа.

Из-за мутаций гена SLC11A2 происходит дефект поглощения железа. Эта мутация ассоциируется с гипохромной микроцитарной анемией и висцеральной перегрузкой железом. Клинический профиль связан с двойной ролью DMT1 в поглощении пищевого железа апикальной мембраной энтероцитов двенадцатиперстной кишки и в выходе железа из цитозольных эндосом [27].

Диагноз аутоиммунной гемолитической анемии может быть поставлен с помощью поэтапного подхода, направленного на выявление лабораторных и клинических признаков гемолиза, а затем определение иммунной природы гемолиза с помощью прямого антиглобулинового теста. Ритуксимаб в настоящее время является предпочтительным препаратом для лечения этого заболевания либо в виде монотерапии, либо в сочетании с бендамустином [26].

2.4 Морфологические изменения органов и тканей при анемии

Данные гистологических исследований в эксперименте А.А. Антипова (2013), показывают, что при алиментарной ЖДА развиваются альтернативные и компенсаторные процессы в печени, почках и селезёнке.

В печени отмечаются изменения в центролобулярных гепатоцитах. Они находятся в состоянии белковой, жировой и углеводной дистрофии. Происходит уменьшение паренхимы органа, снижение количества

двухъядерных гепатоцитов примерно в 2 раза, а также увеличение количества гепатоцитов в состоянии апоптоза.

В почках, в эпителии канальцев развивается белковая дистрофия. Наблюдается апикальная деструкция и отслаивание эпителия нефроцитов.

Изменения в селезенке затрагивают красную и белую пульпу, вызывая уменьшение Т- и В-зависимых зон. Резко уменьшается число и площадь лимфоидных фолликулов [28].

По результатам исследования Robert Moreau et al. (2012) предполагается, что гемолитическая анемия приводит к нарушению костеобразования и дисбалансу, благоприятствующему резорбции костной ткани. Также авторы предполагают, что гемолиз провоцирует быстрые эффекты в костном мозге и костях. Интенсивное высвобождение гемоглобина / гема является основным фактором системного воспалительного / окислительного статуса при гемолитических расстройствах, а воспаление - это сложный ответ, который может также влиять на костную ткань и оказывать дополнительное кроветворное действие в костном мозге [29].

2.5 Современные методы лечения и тенденция усовершенствования препаратов

Лечение железодефицита будет зависеть от причины его появления и степени тяжести. Оно может включать в себя различные препараты, процедуры, хирургические вмешательства и диетические изменения. Тяжелая железодефицитная анемия может потребовать внутривенной терапии железом или переливания крови.

На данный момент для лечения железодефицита применяются следующие препараты:

- Монокомпонентные препараты железа для приема внутрь: железа гидроксид полимальтозный комплекс; железа глюконат; железа протеин сукциниллат; железа сульфат; железа фумарат.
- Препараты сложного состава для приема внутрь: железа глюконат, марганец, медь и др.;
- Препараты железа для внутримышечных инъекций и внутривенного введения [22].

Стратегии разработки новых терапевтических препаратов направлены в сторону уменьшения размеров частиц железа для их большей биодоступности. Так, в исследовании Qiaosha Zhu, изучался порошок карбонильного железа (CIP), который начал использоваться в качестве добавки железа. CIP - это элементарное железо с содержанием железа > 98%, ключевым физическим свойством которого является размер мелких сферических частиц (5 мкм), и он значительно меньше, чем 10–100 мкм других форм элементарного железа (например, восстановленное, электролитическое и распыленное). В выводах авторы говорят, что CIP обладает терапевтическим потенциалом для лечения ЖДА, (мощной биодоступностью и низкой токсичностью). Через 8 дней после введения CIP концентрация гемоглобина у крыс ЖДА нормализовалась. Результаты, полученные в эксперименте по субхронической токсичности, не выявили значительных изменений гематологических, биохимических, морфологических и гистологических признаков. Наибольшая доза, при которой не наблюдалось токсического или неблагоприятного эффекта CIP составляла >200 мг / кг. Таким образом, CIP в будущем может использоваться как безопасная добавка железа [5].

Благодаря достижениям в области нанотехнологий можно создавать наночастицы ферритина, которые могут быть доступны через физиологические пути. Хотя эти наноразмерные частицы обладают более высокой биодоступностью, механизм и действие синтезированных

ферритиновых миметических наночастиц недостаточно изучены (Blanco-Rojo & Vaquero, 2019) [30].

Повышать биодоступность различных веществ помогает нанокапсуляция вещества. Нанокапсуляция - это метод инкапсуляции биоактивного соединения внутрь оболочки или капсулы. Она включает в себя инкорпорацию, диспергирование и поглощение биологически активных соединений в виде небольших пузырьков в наноразмерном диапазоне. Нанокапсуляция так же обеспечивает стабильность, лучшую управляемость и защиту от окисления, контролируемое высвобождение и целенаправленную доставку. Таким образом, она доказана как один из подходов к обогащению железа. Hosny et al. (2015) сообщили об успешном исследовании твердых липидных наночастиц, загруженных железом, для лечения ЖДА [31].

2.6 Особенности моделирования анемии

Хорошо известно, что фенилгидразин вызывает гемолитическую анемию. Считается, что это происходит в результате реакции фенилгидразина с гемоглобином. Сопутствующее окисление фенилгидразина приводит к образованию ряда продуктов, включая бензол, азот, перекись водорода, супероксид анион и фенильный радикал. Образующиеся продукты критически зависят от условий эксперимента, особенно от количества присутствующего кислорода [32].

Фенилгидразин (ФЗ) был первым производным гидразина, охарактеризованным Германом Эмилем Фишером в 1875 году. Он существует в виде кристаллов (желтого или бледно-коричневого цвета) и желтой маслянистой жидкости. Метаболизм ФЗ, по-видимому, происходит через кольцевое гидрокселирование и конъюгацию, экскреция происходит главным образом с мочой [33].

ФЗ вызывает окислительный стресс внутри эритроцитов, приводящий к окислению оксигемоглобина, и последующему образованию метгемоглобина,

который впоследствии превращается в необратимые гемихромы, приводящие к осаждению гемоглобина в виде тел Хайнца. Он вызывает повреждение скелетного белка, перекисное окисление липидов, истощение АТФ, дисбаланс катионов и снижение деформируемости мембран [34].

Сложность животной модели анемии заключается в том, что разные виды позвоночных животных имеют сходное распределение железа в организме, но относительная доля ежедневного поглощения, рециркуляции и потери железа может отличаться от наблюдаемой у людей. Например, у лабораторных мышей поглощение и потери железа с пищей, по-видимому, пропорционально намного выше, чем у людей. Средняя продолжительность жизни эритроцитов мыши близка к 40 дням, а у взрослой мыши содержится около 0,6–1 мл эритроцитов (при условии, что объем крови составляет 7% от веса взрослой мыши 20–30 г, а гематокрит 45–50%) или около 0,6–1 мг железа в гемоглобине. Каждый день около 15–25 мкг железа перерабатывается и используется для производства новых эритроцитов. Что касается ежедневных потерь, когда мышей помещают на железодефицитную диету (~ 4 ч / млн Fe) на 2 недели, по меньшей мере 200–250 мкг Fe истощается из запасов, а потери составляют ~ 15–20 мкг Fe в день.

Таким образом, в рационе с достаточным количеством железа, такое же высокое количество железа будет поглощаться каждый день. Напротив, ежедневное поглощение железа и потери у человека составляют 5–10% от объема переработки железа. Кроме того, стандартная пища мышей имеет высокое содержание железа (около 350 частей на миллион или примерно в десять раз больше суточной нормы питания), и приводит к значительной загрузке железом даже у здоровых мышей, что потенциально затрудняет исследования регуляции железа. Поэтому исследования на животных моделях гомеостаза железа и его нарушений должны учитывать различия между видами в метаболизме железа и учитывать непропорционально сильное влияние диеты на его гомеостаз у мышей [35].

В статье Qing-shan Liu et al. изучалась новая модель острой анемии для фармакологических исследований на мышах, с помощью острой физической нагрузки. Эта модель легко генерируется, удобна и дешева для исследований. В результате эксперимента, деформируемость клеточной мембраны была нарушена, а эритроциты легко разрушались при микроциркуляции, что привело к анемии [36].

3 Наночастицы

3.1 Перспективы использования современной медицине

Нанотехнология - это процесс, в результате которого производятся объекты с размерами от 1 до 100 нм, нередко с изменением свойств объекта и появлением новых. Кроме того, нанотехнология отвечает за производства объектов макромира, содержащих в своем составе наноразмерные компоненты, а также за определение и диагностику свойств производимых объектов.

Этот метод последнее время используется для повышения биодоступности питательных веществ. Исследования показали, что при получении некоторых материалов нанометрового размера их биодоступность возрастает [5].

На данный момент активно развивается так называемая «наномедицина». Наномедицина обладает многими полезными свойствами и стимулирует инновации и развитие лекарств: повышенная растворимость / биодоступность, улучшение профиля безопасности и эффективности, нацеленность на конкретные ткани, преодоление биологических барьеров и другие впечатляющие характеристики [37].

На сегодняшний день приоритетным направлением этой отрасли является использование наночастиц (НЧ) различных металлов, что дает новые возможности для диагностики и лечения опухолей, доставки лекарственных веществ в определенные конкретные органы, ткани, клетки и органеллы, а также использовать НЧ металлов как перспективную альтернативу антибиотикам.

Одним из актуальных направлений остается использование ферромагнитных НЧ для терапии железодефицитной анемии, так как они вызывают биологический ответ, отличный от ответа при терапии традиционными лекарственными препаратами. Эксперименты на мышях

линии SHK показали, что у животных с индуцированной гемолитической анемией при введении железных НЧ происходило общее увеличение количества эритроцитов, а также снижалось количество разрушенных красных клеток крови [38].

Применение других веществ - суперпарамагнитных наночастиц оксида железа в медицине, основано на двух основных преимуществах оксидов железа, а именно: низкая токсичность для людей и их сильное взаимодействие с высокочастотными электромагнитными полями. Таким образом, суперпарамагнитные наночастицы оксида железа получили широкое клиническое признание в диагностической радиологии, потому что они вызывают неоднородную восприимчивость в магнитно-резонансной томографии и изменению кривых релаксометрии. Тем не менее, их терапевтическое применение в доставке лекарств, маркировке клеток и тканевой инженерии все еще исследуются. Кроме того, НЧ могут быть использованы в минимально инвазивных хирургических вмешательствах без швов или гипертермии, например, при лечении глиомы [39].

В исследовании Elaheh Honarkar Shafie et al. наблюдалось повышение уровня гемоглобина, эритроцитов и сывороточного железа у крыс, получавших разовую дозу НЧ, содержащих железо, по сравнению с крысами, получавшими разовую дозу сульфата железа. Это свидетельствует о большей биодоступности железа в виде наночастиц, а не в виде сульфата железа. Кроме того, воспалительный ответ у групп животных, получавших наночастицы, было ниже, чем в группах, получавших сульфат железа [5].

Wegmüller et al. оценили влияние уменьшения размера и инкапсуляции пирофосфата железа на удержание уровня гемоглобина у анемичных крыс и сообщили, что биодоступность пирофосфата железа со средним размером 2,5 мкм составила 43%, а с размером 0,5 мкм - 95% по сравнению с сульфатом железа [40].

В исследовании Victor Garcés et al. изучались наночастицы маггемита (средний размер 10 нм), непокрытых мононаночастиц (МНЧ) или инкорпорированных на *L. fermentum* (МНЧ-бактерии) в качестве новых добавок железа для лечения дефицита железа у анемичных крыс. Результаты исследования показали восстановление здоровых уровней показателей крови и экспрессии железосодержащих белков после введения МНЧ-бактерий анемичным крысам, что подтвердило эффективность этого материала в качестве нового препарата при лечении анемии. Однако, эффективность этих материалов в облегчении анемии была значительно выше при включении в состав пробиотика (МНЧ-бактерии), чем при одиночном выделении (МНЧ) [41].

Железодефицитная анемия, которая не может быть эффективно вылечена пероральным лечением железом из-за разрушения лекарства в следствии желудочно-кишечного пищеварения, может быть обработана внутривенной инъекцией наночастиц оксида железа, улучшающей биодисперсность железа; это было коммерциализировано в таких препаратах, как Dexferrum®, Feraheme®, Ferrisat®, Ferrlecit®, Monofer® и Venofer® [42].

Богословская О.А и др. в своем эксперименте обнаружили, что уровень гемоглобина у животных, которым перед введением ФЗ была сделана инъекция НЧ железа, был достоверно выше, чем у животных с гемолитической анемией, которым данные НЧ не вводились [43].

3.2 Токсичность наночастиц железа

Биораспределение, фармакокинетика и возможная токсичность зависят от таких свойств, как размер частиц, морфология поверхности и поверхностный заряд. В целом, более мелкие частицы циркулируют дольше, чем более крупные, и могут постепенно поглощаться ретикулоэндотелиальной системой в лимфе, тканями и костным мозгом. Крупные частицы, размером более 50 нм, обычно быстро поглощаются ретикулоэндотелиальной системой

в клетках Купфера Лива и имеют ограниченное поглощение в лимфатических и костных тканях. Материал покрытия, а не средний гидратированный размер частиц оксида железа, вносит значительный вклад в скорость клиренса частиц оксида железа и их деградации в синусоидальных клетках Купфера печени, особенно для частиц меньше, чем 40 нм в диаметре. В целом, частицы оксида железа с материалами покрытия, которые ограничивают или затрудняют доступ воды к ядру, демонстрируют значительно более высокие скорости разложения, что отражается в увеличенном периоде полураспада этих частиц в печени [40].

Огромная кривизна плоскости НЧ и изменение связей атомов на поверхности приводит к изменению их химических потенциалов. Вследствие этого существенно изменяется растворимость, реакционная и каталитическая способность НЧ и их компонентов. Довольно большая удельная поверхность (при расчете на единицу массы) наноматериалов увеличивает их адсорбционную ёмкость, химическую реакционную способность и каталитические свойства. Это может приводить, в частности, к увеличению продукции свободных радикалов и активных форм кислорода и далее к повреждению биологических структур (липиды, белки, нуклеиновые кислоты, в частности, ДНК); небольшие размеры и разнообразие форм наночастиц. НЧ, из-за своих небольших размеров, способны к связыванию с нуклеиновыми кислотами, белками. Так же они могут взаимодействовать с мембранами клеток и проникать в органеллы.

Возможна также адсорбция на наночастицах различных контаминантов и облегчение их транспорта внутрь клетки, что резко увеличивает токсичность последних. Возможно, что из-за малого размера наночастицы могут не распознаваться защитными системами организма, они не изменяются в ходе реакция организма и плохо выводятся из него, что ведет к их накоплению в растительных и животных организмах [44].

3.3 Биосинтез наночастиц

Микробы были использованы для синтеза наночастиц благодаря их легкости в обращении, выращиванию в мало затратной среде, такой как целлюлозные отходы или пустыри, поддерживаемому уровню безопасности, обладанию потенциалом адсорбции ионов металлов и превращения их в наночастицы ферментами, продуцируемыми метаболическими процессами.

Синтез НЧ бактериями может быть внутриклеточным или внеклеточным в зависимости от местоположения. Внутриклеточный механизм заключается в транспортировке специфических ионов в клеточную стенку, которая отрицательно заряжена, а с положительно заряженными металлами они диффундируют через клеточную стенку под действием электростатического притяжения. Затем, ферменты, присутствующие в клеточных стенках бактерий, превращают металлы в наночастицы металлов. В то время как внеклеточный механизм включает ферментативный опосредованный синтез, нитратредуктаза или гидрохинон, синтезируемые многими грибами или прокариотическими организмами, превращает металлические ионы в металлические наночастицы [45].

Укупорочные агенты играют очень важную и универсальную роль в синтезе НЧ. НЧ могут быть функционализированы и стабилизированы с помощью укупорочных агентов для придания им полезных свойств путем контроля морфологии, размера и защиты поверхности, тем самым предотвращая агрегацию. Было сообщено, что многие поверхностно-активные вещества используются в качестве укупорочных агентов для изменения желаемой формы и размера биогенного синтеза наночастиц, но они трудно удаляются и не легко разлагаются. Таким образом, коммерческие поверхностно-активные вещества являются опасными для окружающей среды. В связи с ограничениями, которыми обладают эти химические вещества, существует настоятельная необходимость использования

экологически чистых укупорочных агентов и разработки зеленых биохимических маршрутов, на лабораторном и промышленном уровнях, для синтеза НЧ [46].

Показано, что наночастицы ферригидрита, полученные бактериями *Klebsiella oxytoca* в процессе биоминерализации растворов солей железа из природной среды, проявляют уникальные магнитные свойства: они характеризуются как антиферромагнитным порядком, присущим объемному ферригидриту, так и спонтанным магнитным моментом, обусловленным декомпенсацией спинов в подрешетках наночастиц. Эта особенность была признана возможным применением магнитных манипуляций на этих природных объектах, открывающих им путь в наномедицину и биотехнологии [47].

Пробиотические бактерии, *Lactobacillus fermentum* и *Bifidobacteria breve*, служат платформами для плотного размещения мелких наночастиц оксида железа на их внешней поверхности. Это перспективные материалы для добавок железа, так как, во-первых, обнаружено, что бактерии остаются живыми после прививки наночастиц, а во-вторых, потому что пробиотические бактерии составляют часть естественной микробиоты и способны выживать в условиях желудка и гнездиться в различных участках желудочно-кишечного тракта [42].

3.3.1 *Klebsiella oxytoca* как источник наночастиц

Klebsiella oxytoca – грамотрицательная палочковидная бактерия размером 2 на 5 мкм. Эта Fe-редуцирующая бактерия (FeRB) ферментирует цитрат железа в анаэробных условиях и производит гидrogель железа. *K. oxytoca* использует цитрат в анаэробном состоянии путем совместного переноса цитрата с ионом железа и использует цитрат железа в качестве единственного источника энергии и углерода, получая CO₂ и уксусную кислоту, в комплексе с восстановлением Fe (III) до Fe (II). Полученный Fe (II)

не связывается с гидрогелем и остается в среде, но Fe (III) связывается с гидрогелем и образует полисахарид-гидрогель железа, который называется Fe (III)-экзополисахарид (Fe-EPS). Гидрогель представляет собой секреторный экзополисахарид (ЭПС), прикрепленный к поверхности клетки и содержащий галактозу, глюкуроновую кислоту и рамнозу, которые проявляют металлосвязывающие свойства и связан с наночастицами ферригидрита [48]. В работе [6] впервые было указано на способность энтеробактерии *K. oxytoca*, к ферментации цитрата железа в анаэробных условиях и образованию трехвалентного гидрогеля металла.

С биотехнологической точки зрения этот биогенный полисахарид-гидрогель железа может иметь преимущества в различных областях применения, особенно в биомедицинской и сельскохозяйственной промышленности.

В исследовании Giada Giusi Picceri et. al. (2017) наночастицы экзополисахарида железа произведены во время ферментации цитрата железа *K. oxytoca* DSM 29614 для оценки их влияния на рост трюфелей. Перед экспериментом были произведены ряд тестов на токсичность, который показал, что частицы безопасны для использования. Добавка значительно улучшала рост мицелия, не влияя на морфологию гифов. Увеличение диаметра гифов и межклеточного расстояния указывало на более здоровое состояние мицелия по сравнению с теми, которые выращивались в отсутствие железа или с коммерческой добавкой железа. Этот метод биогенерации наночастиц экзополисахаридов железа предлагает множество преимуществ, в том числе значительную экономию средств, без токсического воздействия на эктомикоризный гриб, открывая возможность их использования в качестве добавок железа на трюфельных плантациях [49].

Наночастицы ферригидрита, синтезируемые *K. oxytoca*, встроены в полисахаридную матрицу и могут оказаться перспективным препаратом при лечении многих заболеваний.

В частности, в эксперименте Столяра С.В. и др. (2018) показано, что ампициллин, в комбинации с наночастицами ферригидрита, в 2 раза ускоряет процесс заживления ожоговых ран у крыс. Так же, местное применение ампициллина с наночастицами значительно уменьшало воспаление и активировало регенерацию тканей [50].

Таким образом, *K. oxytoca* и продуцируемые ей наночастицы имеют широкие перспективы для дальнейших исследований в различных экологических, экспериментально медицинских и биологических исследованиях. Также, требуется тщательно изучить то, как наночастицы взаимодействуют с живыми клетками, какими путями преобразовываются и выводятся из организма и какое токсическое действие на него оказывают.

4 Материалы и методы исследования

4.1 Получение и выделение наночастиц

Используемые микроорганизмы *Klebsiella oxytoca* были выделены из сапропеля озера Боровое (Красноярского края). 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 ультразвуком. Полученный осадок промывали дистиллированной водой.

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 Центра Коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. Дозировка стабилизированной суспензии ферригидрита была выбрана из расчета лечебной дозы коммерческого препарата Феранимала 75 (ООО Фирма «А-БИО», Россия), представляющий собой коллоидный раствор комплекса гидроокиси трехвалентного железа в декстрани.

4.2 Объекты исследования

Влияние препаратов изучали на половозрелых самцах крыс породы Вистар, массой тела 220 ± 40 г. Животные содержались группами по 4 крысы на клетку. Всего в эксперименте участвовало 24 животных. Кормление происходило ежедневно. Основу рациона у всех групп составляло зерно пшеницы (по 1 ст.л. на животное) с небольшим добавлением костной муки (3 ст. л. на 1 л зерна).

Перед началом эксперимента были сформированы 3 группы, по 8 крыс в каждой. Записывался вес каждой крысы. В 1-й группе находились интактные

животные. У 2-й и 3-й групп животных вызывалась токсическая гемолитическая анемия на 1-е сутки начала эксперимента, путем внутрибрюшинного введения солянокислого фенилгидрозина в дозе 6мг/100гр массы тела. У 1-й группа анемия не вызывалась, но происходила инъекция физиологического раствора.

Лечение анемии во 2-й групп производилось путем многократного введения Феранимала-75, в 3-й путем многократного введения стабилизированной суспензии ферригидрита. Первой группе так же вводился физиологический раствор. Препараты вводились на 4-е сутки от начала эксперимента, в момент наступления анемии. Дозировка обоих препаратов составляла 75 мг/кг Fe(III). Все инъекции производилась внутримышечно, в заднебедренную группу мышц и происходили каждые 8 дней. Всего эксперимент длился 30 дней. При введении препаратов крысы фиксировались на столе корнцангом, путем захвата складки кожи в области затылка.

Забор крови у всех животных происходил на 1, 4, 8, 15 и 30 сутки, путем ампутации кончика хвоста и сцезивания капель в пробирки. Определяли функциональные показатели крови и делали мазки на предметное стекло для последующего определения лейкоформулы. По окончании эксперимента все животные подвергались эвтаназии. Органы животных подвергались гистологическому исследованию.

4.3 Исследование функциональных показателей крови

Функциональные показатели определяли в цельной крови на приборе ABL-800 FLEX (Radiometr, Дания). В качестве исследуемых показателей крови были выбраны: парциальное давление кислорода (pO_2), сатурация кислородом (sO_2), фракция оксигемоглобина (FO_2Hb) и фракция дезоксигемоглобина.

Парциальное давление кислорода отражает количество кислорода, растворенного в крови. Этим показателем измеряют эффективность переноса атмосферного кислорода из легких в кровотоки.

Сатурация кислородом (sO_2) отражает отношение концентрации оксигемоглобина к концентрации функционального гемоглобина ($O_2Hb + Hb$).

Процентное содержание фракции оксигемоглобина отражает способность артериальной крови к транспорту кислорода, и в этом сходен с другим параметром sO_2 , но FO_2Hb - это отношение концентрации оксигемоглобина (O_2Hb) к концентрации общего гемоглобина, которая включает как функциональный гемоглобин, так и дисгемоглобины (т.е. $O_2Hb + Hb + COHb + MetHb$). $F Hb$ отражает фракцию дезоксигемоглобина в общем гемоглобине в крови. Уровень нормы определялся по показателям контрольной (1й) группы.

4.4 Анализ лейкоцитарной формулы

Мазки крови окрашивались по Романовскому. Лейкоцитарная формула подсчитывалась вручную на световом микроскопе Olympus CX41 (Япония). Учитывались палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы, базофилы. Подсчет каждого мазка производился до достижения 200 клеток.

4.5 Подготовка гистологических препаратов

Для гистологического исследования были отобраны образцы печени и селезенки. Органы изымались сразу после эвтаназии животного. Их фиксация производилась в формалине. Далее препараты проходили стандартную подготовку:

1. Промывка
2. Обезвоживание

3. Заливка материала в парафин
4. Изготовление срезов при помощи микротомов
5. Удаление из срезов парафина.
6. Окрашивание срезов.

Окрашивание препаратов производилось гематоксилином и эозином. Эта окраска является двойной: гематоксилин (основной краситель) – окрашивает ядра клеток, эозин (кислый краситель) красит цитоплазму клеток и в меньшей степени - различные неклеточные структуры.

На соединения железа производилась окраска по Перлсу. Это широко используемый метод в гистологии, гистопатологии и клинической патологии для обнаружения присутствия железа в образцах тканей или клеток. Метод Перлса используется для определения « негемового » железа в тканях, таких как ферритин и гемосидерин. Процедура не окрашивает железо, связанное с гемоглобином и миоглобином.

Анализ гистологических препаратов производился на электронном микроскопе с кратностью увеличения окуляра x10, и объективами x10, x40.

4.6 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку базы данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc.) и пакета электронных таблиц MS Excel 2010. Использовали непараметрическую статистику. Описание выборки производили с помощью медианы и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей.

Для проверки статистической значимости различий величин исследуемых показателей проводили с помощью критерия Вилкоксона при множественных сравнениях и критериям Манна-Уитни при попарных сравнениях.

5 Результаты исследования

Изъято 11 страниц в связи с написанием публикаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Из анализа лейкоцитарной формулы можно предположить, что Феранимал-75 индуцирует развитие интенсивного воспалительного процесса. При этом у группы, получавшей суспензию ферригидрита, воспалительный процесс был менее выражен.

2. Изучение показателей функциональной активности эритроцитов показало быстрое восстановление исследуемых параметров, при воздействии суспензии ферригидрита, до уровня контрольной группы. Увеличение фракции фетального гемоглобина (на 15 сутки) и сывороточного железа (на 8 сутки) у 3 группы, относительно 2, может говорить о более высокой биодоступности наночастиц, по сравнению с Феранималом.

3. По результатам гистологического исследования, Феранимал-75 обладает более выраженной токсичностью и характеризуются обильным накоплением железа в печени и селезенке в виде гемосидерина. При введении в организм суспензии ферригидрита отмечается частичное отложение гемосидерина в печени, что указывает на быструю элиминацию из органа и отложение в селезенке, свидетельствующие о компенсаторном усилении гемопоэза. В легких животных 3 группы негативный ответ при введении суспензии ферригидрита менее выражен, чем у животных 2 группы.

4. Эксперимент показал, что эффективность лечения гемолитической анемии с применением суспензии ферригидрита, сопоставима с коммерческим аналогом. Данные результаты позволяют рассматривать наночастицы ферригидрита как возможный препарат для лечения анемии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DMT1 - Транспортёр двухвалентного металла 1

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ЖДА - Железодефицитная анемия

АА - Апластическая анемия

СІР - Порошок карбонильного железа

ФЗ - Фенилгидразин

НЧ - Наночастицы

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Pippard, M.J. Iron deficiency anemia, anemia of chronic disorders and iron overload) / M. J. Pippard // *Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition)*. С. 11. – 2011. – Р. 173-179.
2. Сарсания, С.И. Нюансы диагностики и лечения железодефицитной анемии / С.И. Сарсания, А.Л. Тихомиров, Е.В. Ночевкин, К.С. Тускаев // *Трудный пациент*. – 2017. – № 2–3. – С. 23–34
3. Nielsen, P. Efficacy of an iron retard preparation in patients with iron deficiency anemia / P. Nielsen, R. Kongi, R. Fischer // *MMW - Fortschritte der Medizin*. –2016. –V. 158. –№ 6. –Р. 17–23.
4. Geisser, P. The pharmacology and safety profile of ferric carboxymaltose (Ferinject®): structure/reactivity relationships of iron preparations / P. Geisser // *Portuguese Journal of Nephrology & Hypertension*. – 2009. –№ 23. –№ 1. С. 11.
5. Qiaosha, Z. Effects of carbonyl iron powder on iron deficiency anemia and its subchronic toxicity / Z. Qiaosha, Q. Yang, Y. Ying, W. Weifeng, X. Jingli W. Dongzhi // *Journal of Food and Drug Analysis*. – 2016. –№ 24. – С. 746-753.
6. Baldi, F. Bio-generated metal binding polysaccharides as catalysts for synthetic applications and organic pollutant transformations / F. Baldi, D. Marchetto, S. Paganelli, O. Piccolo // *New Biotechnology*. – 2011. – № 29. – С.74-78.
7. Barragán-Ibanez, G. Iron deficiency anaemia / G. Barragán-Ibanez, A. Santoyo-Sánchez, C.O. Ramos-Penafiel // *Revista Médica del Hospital General de México*. –2016. –№ 79. – С. 88-97.
8. Geissler, C. Iron, Meat and Health / C. Geissler, M. Singh // *Nutrients*. – 2011. – С.283–316.

9. Shafie, E. H. The effects of nanoparticles containing iron on blood and inflammatory markers in comparison to ferrous sulfate in anemic rats / E. H. Shafie, S. Ali Keshavarz, M. E. Kefayati, F. Taheri, P. Sarbakhsh, and M. R. Vafa // *International Journal of Preventive Medicine*. –2016. –№7. – C.117
10. Silva, B. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies / B. Silva, P. Faustino // *Biochemical et Biophysica Acta*. –2015. –№7. – C.1347-1359
11. Abbaspour, N. Review on iron and its importance for human health / N. Abbaspour, R. Hurrell, R. Kelishadi // *Journal of Research in Medical Sciences*. – 2014. – C. 164-174.
12. Pantopoulos, K. Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis / K. Pantopoulos, S.K. Porwal, A. Tartakoe, L. Devireddy // *Biochemistry*. – 2012. – №51. – C. 5705–5724.
13. Munoz, M. Disorders of iron metabolism. Part 1: Molecular basis of iron homoeostasis / M. Munoz, A.J. Garcia-Erce, F.A. Remacha // *Journal of Clinical Pathology*. – 2011. –№64. –C. 281–286.
14. Dev, S. Overview of Iron Metabolism in Health and Disease / S. Dev, J. L. Babitt // *Hemodialysis International*. – 2017. – C.6-20.
15. Thomas, E. *Biochemistry. Iron Absorption* / E. Thomas, St. L. Kayla, M. R. Huecker // – 2020. – Режим доступа: <https://www.statpearls.com/>
16. Matthias, W. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism / W. M. Hentze, M. Muckenthaler, B. Galy, C. Camaschella. // *Cell*. – 2010. №142. – Pages 24-38.
17. Brissot, P. Rare anemias due to genetic iron metabolism defects / P. Brissot, D. G. Bernard, E. Brissot, O. Loréal, M.B. Troadec // *Mutation Research*. –2018. – C.52-53.
18. Yiannikourides, A. A Short review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders / A. Yiannikourides, G. O. Latunde-Dada // *Medicines*. – 2019. № 6(3). – P. 85

19. Kühn, L. C. How iron controls iron / L. C. Kühn // Cell Metabolism. – 2009. – №10. – С.439 - 441.
20. Peslak, S. A. Diagnosis and treatment of aplastic anemia / S. A. Peslak, T. Olson, D. V. Babushok // Current Treatment Options in Oncology. – 2018. – №18. – С.70.
21. Андреев, Н.А. Железодефицитные состояния и железодефицитная анемия / Н.А. Андреев, Л.В. Балеева // Вестник современной клинической медицины. – 2009. – №2. – С. 60-65.
22. Богданов, А.Н. Мегалобластные анемии / А.Н. Богданов, В.И. Мазуров // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2010 г. – С. 82-86.
23. Brandow, A. M. Pallor and anemia / A. M. Brandow // Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis – 2018. – С.661–681.
24. Богданов, А.Н. Гемолитические анемии / А.Н. Богданов, В.И. Мазуров // Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования – 2011. – №3. – С. 107-114
25. Phillips, J. Hemolytic Anemia: Evaluation and Differential Diagnosis / J. Phillips, A. C. Henderson // American Family Physician. –2018. – №98. – С.354 –361.
26. Millot, S. Hemolytic anemia repressed hepcidin level without hepatocyte iron overload: lesson from Günther disease model / S. Millot, C. Delaby, B. Moulouel, T. Lefebvre et. al. // Haematologica. – 2017. – №102. – С.260-270.
27. Brissot, P. Rare anemias due to genetic iron metabolism defects / P. Brissot, D. G. Bernard, E. Brissot, O. Loréal, M.B. Troadec // Mutation Research. –2018. – №777. – С.52-63

28. Антипов, А.А. Гистологические и морфометрические изменения печени, почек, селезенки и лимфатических узлов поросят при алиментарной железодефицитной анемии / Антипов А.А., Жаров А.В. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2013. – №1. – с. 19-21
29. Moreau, R. Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and plasmodium-infected / R. Moreau, D. T. Malu, M. Dumais, E. Dalko // – 2012. – Режим доступа: <https://journals.plos.org/plosone>
30. Blanco-Rojo, R. Iron bioavailability from food fortification to 881 precision nutrition. A review. / R. Blanco-Rojo, M. P. Vaquero // Innovative Food Science and Emerging Technologies. – 2019. – №51. – С.126–138.
31. Hosny, K. M. Solid lipid nanoparticles loaded with iron to overcome barriers for treatment of iron deficiency anemia / K. M. Hosny, Z. M. Banjar, A. H. Hariri, A. H. Hassan // Drug Design, Development and Therapy. – 2015. – №9. – С.313-320.
32. Shetlar, M. D. Reactions of hemoglobin with phenylhydrazine: a review of selected aspects / M. D. Shetlar, H. A. Hill // Environmental Health Perspectives. – 1985. – С.265-281.
33. Berger, J. Phenylhydrazine haematotoxicity / J. Berger // Journal of Applied Biomedicine. – 2007. – С.125-130.
34. Pandey, K. Molecular Mechanism of Phenylhydrazine Induced Haematotoxicity: A Review / K. Pandey, A. K. Meena, A. Jain, R. K. Singh // American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics. – 2014. – С.390-394.
35. Ganz, T. Hepcidin and iron homeostasis / T. Ganz, E. Nemeth // Biochemical et Biophysica Acta. – 2014. – №1823. – С.1434-1443.

36. Liu, Q. A novel acute anemia model for pharmacological research in mice by compelled acute exercise / Q. Liu, J. Wang, J. Cui, Z. Yang, G. Du // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2009. – №30. – С.1643-1647.

37. Flühmann, B. Nanomedicines: The magic bullets reaching their target? / B. Flühmann, I. Ntai, G. Borchard, S. Simoens, S. Mühlebach // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – №128. – С.78-80.

38. Короткова, А. С. Наночастицы металлов: их использование в современной медицине / А. С Короткова, Образование и наука в современных реалиях. Сборник материалов Международной научно-практической конференции: в 2 томах. – 2017. – С. 87-91

39. Schleicher, E. Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study / E. Schlachter, H. Ruedi Widmer, A. Bregy, T. Lönnfors-Weitzel, et. al. // *International journal of nanomedicine*. – 2011. – №6. – P. 1793–1800

40. Wegmüller, R. Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats / R. Wegmüller, M.B. Zimmermann, D. Moretti, et. al. // *The Journal of Nutrition*. – 2004. №134. – P. 3301–4

41. Garcés, V. Bacteria-carried iron oxide nanoparticles for treatment of anemia / V. Garcés, A. Rodríguez-Nogales, A. González et. al. // *Bioconjugate Chemistry*. – 2018. №29 (5). – P. 1785-1791.

42. AlphanDéry, E. Iron oxide nanoparticles for therapeutic applications / E. AlphanDéry // *Drug Discovery Today*. – 2020. №25 (1). – P. 141-149.

43. Богословская, О.А. Применение наночастиц железа в профилактике экспериментальной гемолитической анемии / О.А. Богословская, А.А. Рахметова, Д.П. Коноваленко, А.А. Хомяков, И.П. Ольховская, Н.Н. Глущенко // *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. –2014. – С. 7-8.

44. Андрусина, И.Н. Наночастицы металлов: способы получения, физико-химические свойства, методы исследования и оценка токсичности / И.Н. Андрусина // /Сучасні проблеми токсикології. – 2011. - №3. – С.5-14.

45. Menon, S. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications / S. Menon, S. Rajeshkumar, V. Kumar // Resource-Efficient Technologies. – 2017. – №3. – С.516-527.

46. Sharma, D. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review / D. Sharma, S. Kanchi, K. Bisetty // Arabian Journal of Chemistry. – 2019. – №12. – С.3576-3600.

47. Kichanov, S. Structural and compositional specifications on biogenic ferrihydrite nanoparticles production by *Klebsiella oxytoca* / S. Kichanov, A. Pantelica, D. Pantelica, S. Stolyar, R. Iskhakov, D. Aranghel, P. Ionescu, R. Vladoiu, M. Balasoiu // Romanian Reports in Physics. – 2018. – №70.

48. Kianpour, S. Physicochemical and biological characteristics of the nanostructured polysaccharide-iron hydrogel produced by microorganism *Klebsiella oxytoca* / S. Kianpour, A. Ebrahiminezhad et. al. // Journal of Basic Microbiology. – 2017. – С. 132-140.


49. Giusi Picceri, G. Bacteria-produced ferric exopolysaccharide nanoparticles as iron delivery system for truffles (*Tuber borchii*) / G. Giusi Picceri, P. Leonardi, M. Iotti et. al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – №102. – С.1429-1441.

50. Stolyar, S. V. Bacterial Ferrihydrite Nanoparticles: Preparation, Magnetic Properties, and Application in Medicine / S. V. Stolyar, D. A. Balaev, V. P. Ladygina et. al. // Journal of Superconductivity and Novel Magnetism. – 2018. – №31. – С. 2297-2304.

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В.А. Кратасюк
подпись инициалы, фамилия

« 24 » июня 20 20 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Возможность применения наночастиц железа, выделенных из
культуры бактерий *Klebsiella oxytoca*, для лечения анемии у крыс

06.04.01 Биология

06.04.01.03 Биофизика

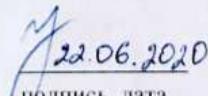
Научный руководитель


подпись, дата

д. б. н., профессор
должность, ученая степень

О. А. Коленчукова
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Е. А. Бирюкова
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

д.б.н., доцент
должность, ученая степень

Е. В. Инжеваткин.
инициалы, фамилия

Красноярск 2020