

Я. С. Стравський¹, Л. Я. Федонюк¹, О. М. Ярема¹, Л. С. Резніченко²
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МОЗ УКРАЇНИ¹
ІНСТИТУТ БІОКОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ІМ. Ф. Д. ОВЧАРЕНКА НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

ДОКЛІНІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НАНОЧАСТИНОК КУПРУМУ

Вступ. Доклінічне вивчення лікарських препаратів – невід’ємна частина процесу створення лікарського засобу. Встановлені, за результатами доклінічного вивчення, характеристики специфічної фармакологічної активності та нешкідливості під час застосування і щодо його ймовірних віддалених наслідків є принциповими факторами, які визначають можливість промислового випуску лікарського засобу та доцільність його медичного використання.

Мета дослідження – вивчити біобезпечність, гостру токсичність, протимікробну та фунгіцидну дії наночастинок Купруму.

Методи дослідження. Біобезпечність синтезованої субстанції наночастинок у тестах *in vitro* визначали з використанням показників цитотоксичності, мутагенності, молекулярно-генетичного (показник генотоксичності), фізіологічного (стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини) та біохімічних (АТФ-азна і лактатдегідрогеназна активність) маркерів. Протимікробні та фунгіцидні властивості препарату було вивчено на клінічних ізолятах збудників інфекційно-запальних процесів: бактеріях *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, грибах роду *Candida* – *C. albicans*, *Candida non-albicans* та інших мікроміцетах – *Penicillium spp.*, *Paecilomyces lilacinus*, *A. niger* і *A. flavus*.

Результати й обговорення. Взаємодія наночастинок Купруму з тестовими еукаріотичними клітинами не призводила до появи первинних ДНК-ушкоджень порівняно з впливом N-нітрозометилсечовини, яка є відомим генотоксикантом. У зразках тестових еукаріотичних клітин лінії CHO-K1, оброблених наночастинами Купруму в широкому концентраційному діапазоні, не було зафіксовано цитотоксичного впливу досліджуваного наноматеріалу. Експериментальна субстанція наночастинок Купруму (CuNP) володіє вираженою протимікробною та фунгіцидною активністю відносно всіх досліджуваних патогенних тест-культур: як у вихідній концентрації (32,0 мг/мл у перерахунку на метал), так і при її десятикратному розведенні (3,2 мг/мл у перерахунку на метал). Повне інгібування росту патогенних тест-штамів спостерігали при використанні кінцевих засівних доз мікроорганізмів на чашках від 10^3 до 10^6 КУО/см². Досліджувана субстанція наночастинок Купруму також проявляла протимікробну та фунгіцидну дії щодо клінічних ізолятів збудників інфекційно-запальних процесів різної локалізації, а саме бактерій і грибів.

Висновок. Результати оцінювання гострої токсичності субстанції наночастинок Купруму після одноразового внутрішньовенного введення білим мишам залежно від рівня дози протягом 14 діб спостереження дозволяють віднести її до IV класу токсичності (малотоксичні речовини).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: наночастинок Купруму; доклінічне вивчення; біобезпечність; токсичність; протимікробна дія; фунгіцидна дія.

ВСТУП. Доклінічне вивчення лікарських засобів передбачає проведення хімічних, фізичних, біологічних, мікробіологічних, фармакологічних, токсикологічних та інших досліджень [1, 2]. Виконання таких досліджень дає можливість встановити специфічну та загальнофармакологічну активність, а також нешкідливість для організму діючих речовин і готових лікарських препаратів [3].

Доклінічне вивчення лікарських препаратів – невід’ємна частина процесу створення лікарського засобу. Встановлені, за результатами доклінічного вивчення, характеристики специ-

фічної фармакологічної активності та нешкідливості під час застосування і щодо його ймовірних віддалених наслідків є принциповими факторами, які визначають можливість промислового випуску лікарського засобу та доцільність його медичного використання [4, 5].

Мета дослідження – вивчити біобезпечність, гостру токсичність, протимікробну та фунгіцидну дії наночастинок Купруму.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальну субстанцію наночастинок Купруму (CuNP) синтезовано методом хімічної конденсації у водному середовищі за оригінальним протоко-

лом, розробленим в Інституті біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України. Вихідною речовиною в процесі синтезу слугував сульфат Купруму п'ятиводний. Концентрація синтезованої водної дисперсії наночастинок Купруму – 32,0 мг/мл у перерахунку на метал.

Розмір і форму наночастинок Купруму визначали методом трансмісійної електронної мікроскопії (трансмісійний електронний мікроскоп JEM-1230, "JEOL LTD", Японія).

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

Біобезпечність синтезованої субстанції наночастинок у тестах *in vitro* визначали з використанням показників цитотоксичності, мутагенності, молекулярно-генетичного (показник генотоксичності), фізіологічного (стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини) та біохімічних (АТФ-азна і лактатдегідрогеназна активність) маркерів відповідно до протоколів Методичних рекомендацій "Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів", які затвердила Науково-експертна рада Державного експертного центру МОЗ України (протокол № 8 від 26.09.2013 р.).

Активність синтезованої субстанції наночастинок Купруму щодо патогенних тест-штамів мікроорганізмів визначали методом серійних розведень в агарі згідно з Методичними вказівками МУК 4.2.1890-04 "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів". Як тестові використовували такі штами мікроорганізмів: *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *E. coli* ATCC 2592, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* 209P, *S. Typhimurium* 144, *Shigella sonnei* та *C. albicans* з колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ).

Кінцеві засівні дози тестових мікроорганізмів на чашках становили 10^3 , 10^4 та 10^5 КУО/см³. Антимікробну активність наночастинок Купруму досліджували за їх кінцевою концентрацією в середовищі визначення (середовище Мюллера-Хінтона) – 6,4 мг/мл у перерахунку на метал. Стерильні препарати нанокупруму вносили в стерильне поживне середовище Мюллера-Хінтона, охолоджене до 50 °С, перемішували та розливали на чашки Петрі. Культивування мікроорганізмів здійснювали в термостаті за температури 37 °С протягом 24 год.

Протимікробні й фунгіцидні властивості наночастинок Купруму також було вивчено на

клінічних ізолятах збудників інфекційно-запальних процесів: бактеріях *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, грибах роду *Candida* – *C. albicans*, *Candida non-albicans* та інших мікроміцетях – *Penicillium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *A. niger*, *A. flavus*.

Даний етап дослідження було проведено на твердому поживному середовищі методом дозованих крапель. На чашки Петрі із середовищем визначення (агар Мюллера-Хінтона для бактерій та агар Сабуро для грибів) засівали газомом мікроорганізми в дозі 10^7 КУО/см³. Суспензію мікроорганізмів готували на 0,9 % NaCl. Після підсушування чашок з культурами мікроорганізмів протягом 30 хв на поверхню агару наносили у вигляді краплі дисперсію наночастинок Купруму: або вихідної концентрації (32,0 мг/мл у перерахунку на метал), або в десятикратному розведенні (3,2 мг/мл у перерахунку на метал).

Концентрація наночастинок Купруму в перерахунку на метал у краплі ($V=12,5$ мкл) на чашці становила, відповідно, 0,4 мг та 0,04 мг. Культивування бактерій здійснювали в термостаті за температури 37 °С протягом 24 год, грибів роду *Candida* – за температури 37 °С протягом 48 год, інших мікроміцетів – за температури 28 °С протягом 5 діб. Підрахунок результатів проводили шляхом вимірювання зон повної затримки росту культур. Усі дослідження було виконано у трьох паралельних визначеннях.

Гостру токсичність субстанції наночастинок Купруму при внутрішньовенному введенні оцінювали на самках білих лабораторних мишей лінії BALB/c масою 18–22 г віком 2,0–2,5 місяця з дотриманням основних положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей від 18.03.1986 р., Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22.09.2010 р. "Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях", наказу МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. "Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів", Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

Тварин, яких використовували в експерименті, утримували в стандартних умовах сертифікованої за системою GLP (Good Laboratory Practice) експериментально-біологічної клініки Державної установи "Інститут фармакології та токсикології НАМН України" (віварію) за температури повітря 22–24 °С і відносної вологості 50–70 % з вільним доступом до корму та води. Групи тварин фор-

мували методом рандомізації. Період карантину й акліматизації тривав 7 діб.

Протягом випробування здійснювали реєстрацію та підрахунок загиблих тварин у кожному з рівнів доз. На основі отриманих даних проводили пробіт-аналіз результатів за D. J. Finney із застосуванням комп'ютерної програми BioStat 2009 for Windows (v5.8.4.3) компанії AnalystSoft Inc. Одержували значення середньої смертельної дози (LD_{50}) зі стандартною помилкою.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Фізико-хімічна характеристика експериментальної субстанції наночастинок Купруму (визначення розміру і форми частинок), проведена методом трансмісійної електронної мікроскопії, засвідчила, що наночастинки мали сферичну форму та середній розмір 20 нм (рис. 1).

Результати рентгеноструктурного мікроаналізу хімічного складу експериментальної суб-

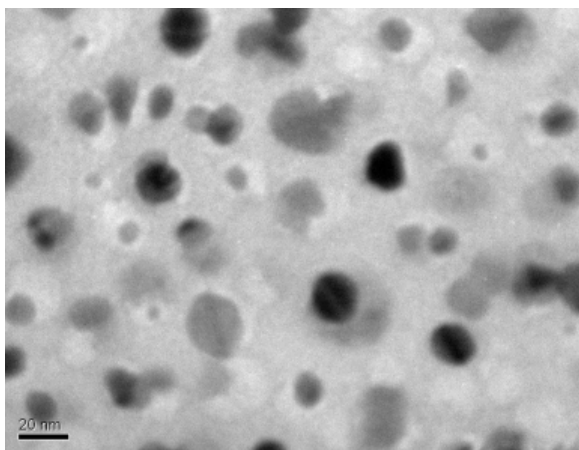


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення експериментальної субстанції наночастинок Купруму (CuNP).

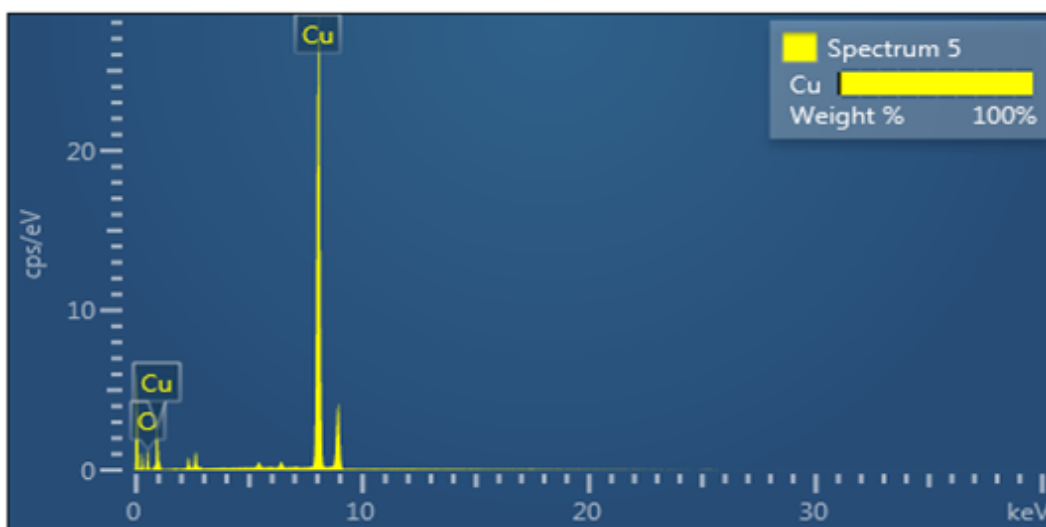


Рис. 2. Рентгеноструктурний мікроаналіз хімічного складу експериментальної субстанції наночастинок Купруму (CuNP).

станції наночастинок Купруму, проведеного методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії, наведено на рисунку 2.

Отримані дані засвідчили, що у складі наночастинок вміст Купруму (Cu) становить 100 % (рис. 2). Присутність у структурі частинки кисню не фіксується. Це вказує на те, що аналізовані наночастинки є частинками нуль-валентного Купруму (Cu^0NP). Оксидів та гідроксидів міді під час мікроаналізу хімічного складу наночастинок не виявляли.

Біобезпечність наночастинок Купруму в тестах *in vitro* оцінювали за показниками цитотоксичності, мутагенності, генотоксичності згідно з вимогами до паспорта безпеки наноматеріалу, а також визначали біобезпечність за станом мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини та біохімічними маркерами (АТФ-азна і лактатдегідрогеназна активність) [6, 7].

Так, у зразках тестових еукаріотичних клітин лінії СНО-К1, оброблених наночастинками Купруму в широкому концентраційному діапазоні, не було зафіксовано цитотоксичного впливу досліджуваного наноматеріалу.

Генотоксичного впливу субстанції наночастинок Купруму на тестові клітини також не було виявлено. Взаємодія досліджуваних наночастинок з тестовими еукаріотичними клітинами не призводила до появи первинних ДНК-ушкоджень порівняно з впливом N-нітрозометилсечовини, яка є відомим генотоксикантом (рис. 3, А). Типові електрофоретичні зображення ДНК клітин, оброблених наночастинками Купруму, показано на рисунку 3, Б.

Показник ушкоджень ДНК ("індекс ДНК-комет" ($I_{ДНК}$)) під впливом субстанції наночастинок Купруму в різних концентраціях сягав значень,

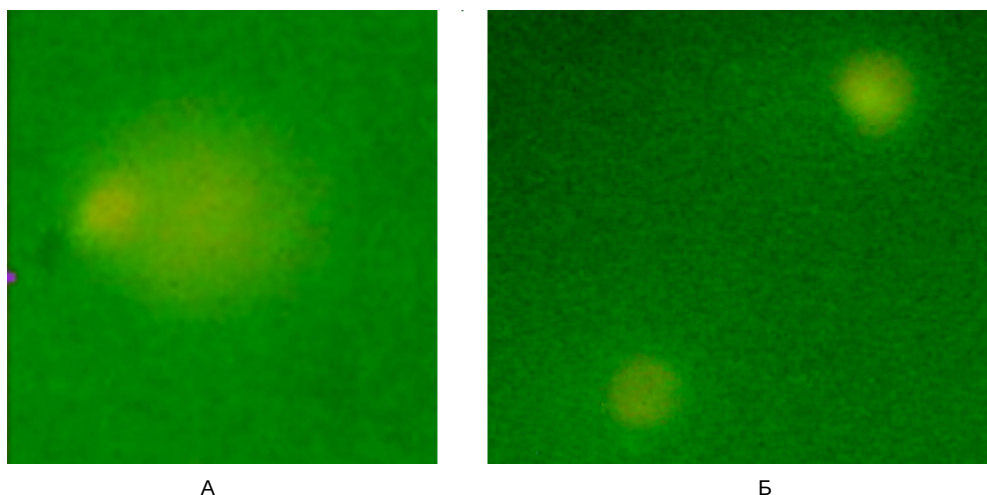


Рис. 3. Електрофоретичні зображення: А – ДНК, ушкоджена N-нітрозометилсечовиною (позитивний контроль – відомий генотоксикант); Б – ДНК, не ушкоджена під впливом експериментальної субстанції наночастинок Купруму.

близьких до $I_{\text{днк}}$ негативного контролю (нативні клітини).

При визначенні особливостей впливу наночастинок Купруму на біохімічні маркери безпеки наночастинок металів (АТФ-азну активність сумарної мембранної фракції тестових еукаріотичних клітин лінії CHO-K1 та лактатдегідрогеназу активність їх цитозольної фракції) не було виявлено токсичного впливу субстанції в обох випадках.

Субстанція наночастинок Купруму характеризувалась як біобезпечна в тестах на мутагенність з використанням поліхроматофільних еритроцитів кісткового мозку тварин [8, 9].

Наступним етапом досліджень було визначення антимікробної активності експериментальної субстанції наночастинок Купруму розміром 20 нм відносно широкого спектра тестових штамів мікроорганізмів.

Результати аналізу протимікробної та фунгіцидної активності синтезованих наночастинок Купруму (CuNP) *in vitro* щодо патогенних тест-штамів мікроорганізмів наведено в таблиці 1.

Встановлено, що наночастинок Купруму володіли вираженою протимікробною та фунгіцидною активністю відносно всіх досліджуваних патогенних тест-культур: повне інгібування росту

Таблиця 1 – Оцінка протимікробної та фунгіцидної активності наночастинок Купруму (CuNP) щодо патогенних тест-штамів мікроорганізмів

| Тест-штам | Засівна доза тест-штаму, КУО/см ³ | Ріст тест-штаму за присутності CuNP | Контрольний ріст тест-штаму |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|
| <i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300 | 10 ³ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁴ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁵ | Ріст відсутній | ++++ |
| <i>E. coli</i> ATCC 2592 | 10 ³ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁴ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁵ | Ріст відсутній | ++++ |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 10 ³ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁴ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁵ | Ріст відсутній | ++++ |
| <i>S. aureus</i> 209P | 10 ³ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁴ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁵ | Ріст відсутній | ++++ |
| <i>S. typhimurium</i> 144 | 10 ³ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁴ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁵ | Ріст відсутній | ++++ |
| <i>S. sonnei</i> | 10 ³ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁴ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁵ | Ріст відсутній | ++++ |
| <i>C. albicans</i> | 10 ³ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁴ | Ріст відсутній | ++++ |
| | 10 ⁵ | Ріст відсутній | ++++ |

Примітка. КУО – колонієутворювальні одиниці; CuNP – наночастинок Купруму; ++++ – інтенсивний ріст тест-штаму; концентрація CuNP у середовищі визначення становила 6,4 мг/мл у перерахунку на метал.

патогенних тест-штамів спостерігали при використанні кінцевих засівних доз мікроорганізмів на чашках від 10^3 до 10^5 КУО/см³.

Досліджувана субстанція наночастинок Купруму також проявляла протимікробну та фунгіцидну дію щодо клінічних ізолятів збудників інфекційно-запальних процесів різної локалізації, а саме бактерій і грибів (табл. 2).

Для досліджуваних культур *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. non-albicans*, *Penicillium* spp., *P. lilacinus*, *A. niger* та *A. flavus* під впливом наночастинок Купруму в концентрації 0,04 і 0,4 мг у перерахунку на метал у краплі спостерігали повне пригнічення росту при використанні засівної дози мікроорганізмів 10^7 КУО/см³.

Таким чином, виражену протимікробну та фунгіцидну активність було виявлено для дисперсії наночастинок Купруму як у вихідній концентрації (32,0 мг/мл у перерахунку на метал), так і при її десятикратному розведенні (3,2 мг/мл у перерахунку на метал).

Отже, наведені результати оцінювання антимікробної активності *in vitro* свідчать про те, що наночастинок Купруму розміром 20 нм ха-

рактеризуються широким спектром протимікробної та фунгіцидної активності [10–12].

Протягом 3–4 год перед введенням досліджуваної субстанції або розчинника тварин утримували без корму з вільним доступом до води. Введення здійснювали одноразово шляхом ін'єкції в латеральну хвостову вену за умов визначення показника LD₅₀ при внутрішньовенному введенні. Перед цим тварин іммобілізували та нагрівали хвіст у теплій воді для досягнення ефекту вазодилатації. Об'єм введення речовин визначали з розрахунку 0,1 мл на 20,0 г маси тіла тварини.

Після внутрішньовенного введення досліджуваної субстанції або розчинника протягом 14 діб щоденно спостерігали за станом тварин, особливостями поведінки, положенням тіла та руховою активністю, споживанням корму і води. Реєстрували терміни розвитку та характер симптомів інтоксикації і випадки смерті. Дані щодо летальності мишей після одноразового внутрішньовенного введення досліджуваної субстанції наночастинок Купруму наведено в таблиці 3.

Розраховані значення LD₅₀ зі стандартною помилкою наведено в таблиці 4.

Таблиця 2 – Оцінка протимікробної та фунгіцидної активності наночастинок Купруму розміром 20 нм щодо клінічних ізолятів збудників інфекційно-запальних процесів різної локалізації, вираженої в діаметрі зон затримки росту

| Клінічний ізолят мікроорганізмів | Діаметр зон затримки росту, мм | | |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | 0,04 мг CuNP у краплі | 0,4 мг CuNP у краплі | контрольний ріст (без CuNP) |
| <i>S. aureus</i> | 6 | 11 | 0 |
| <i>E. coli</i> | 7 | 11 | 0 |
| <i>P. mirabilis</i> | 7 | 11 | 0 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 7 | 11 | 0 |
| <i>E. aerogenes</i> | 7 | 11 | 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 6 | 11 | 0 |
| <i>C. albicans</i> | 6 | 8 | 0 |
| <i>C. non-albicans</i> | 5 | 12 | 0 |
| <i>Penicillium</i> spp. | 5 | 8 | 0 |
| <i>P. lilacinus</i> | 6 | 8 | 0 |
| <i>A. niger</i> | 5 | 10 | 0 |
| <i>A. flavus</i> | 6 | 8 | 0 |

Примітка. CuNP – наночастинок Купруму; засівна доза мікроорганізмів становила 10^7 КУО/см³.

Таблиця 3 – Летальність самок мишей після одноразового внутрішньовенного введення субстанції наночастинок Купруму залежно від рівня дози протягом 14 діб спостереження

| Рівень дози, мг/кг | Кількість загинув тварин | | Загальна кількість тварин |
|--------------------|--------------------------|------|---------------------------|
| | абс. | % | |
| 0 | 0 | 0 | n=6 |
| 250 | 0 | 0 | n=6 |
| 316 | 2 | 33,3 | n=6 |
| 398 | 3 | 50,0 | n=6 |
| 501 | 4 | 66,7 | n=6 |
| 631 | 4 | 66,7 | n=6 |
| 794 | 5 | 83,3 | n=6 |
| 1000 | 6 | 100 | n=6 |

Таблиця 4 – Значення LD₅₀ досліджуваної субстанції наночастинок Купруму після одноразового внутрішньовенного введення самкам мишей лінії BALB/c

| Субстанція | Значення LD ₅₀ , мг/кг | Клас токсичності | Ступінь токсичності |
|----------------------|-----------------------------------|------------------|---------------------|
| Наночастинок Купруму | 443,7±56,5 | IV | Малотоксичні |

Примітка. LD₅₀±стандартна помилка.

Отримані результати дозволяють віднести субстанцію наночастинок Купруму до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) [13, 14].

ВИСНОВКИ. 1. Субстанція наночастинок Купруму характеризується як біобезпечна, оскільки не має токсичного впливу на біохімічні маркери.

2. Експериментальна субстанція наночастинок Купруму (CuNP) володіє вираженою протимікробною та фунгіцидною активністю відносно

всіх досліджуваних патогенних тест-культур: як у вихідній концентрації (32,0 мг/мл у перерахунку на метал), так і при її десятикратному розведенні (3,2 мг/мл у перерахунку на метал).

3. Результати оцінювання гострої токсичності субстанції наночастинок Купруму після одноразового внутрішньовенного введення білим мишам залежно від рівня дози протягом 14 днів спостереження дозволяють віднести її до IV класу токсичності (малотоксичні речовини).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / за ред. І. Я. Коцюмбаса. – Львів, 2006. – 359 с.

2. Ingle A. P. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review / A. P. Ingle, N. Duran, M. Rai // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – **98**, No. 3. – P. 1001–1009.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. – К., 2001. – 527 с.

4. Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів : наказ МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>.

5. Безопасность лекарств. Руководство по фармаконадзору / под ред. А. П. Викторова, В. И. Мальцева, Ю. Б. Белоусова. – К. : Морион, 2007. – 240 с.

6. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / [І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук та ін.]. – К. : Поліграф плюс, 2012. – 328 с.

7. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів : метод. рек. / [І. М. Трахтенберг, З. Р. Ульберг, І. С. Чекман та ін.]. – К. : Міністерство охорони здоров'я України, 2013. – 108 с.

8. Liao M. Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral

administration / M. Liao, H. Liu // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2012. – **34**, No. 1. – P. 67–80.

9. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors / L. I. Privalova, B. A. Katsnelson, N. V. Loginova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – **15**, No. 7. – P. 12379–12406.

10. Pelgrift R. Y. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance / R. Y. Pelgrift, A. J. Friedman // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – **65**, No. 13–14. – P. 1803–1815.

11. In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method / E. Ghasemian, A. Naghoni, B. Tabaraie, T. Tabaraie // *J. Mycol. Med.* – 2012. – **22**, No. 4. – P. 322–328.

12. Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications / G. Ren, D. Hu, E. W. C. Cheng [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2009. – **33**. – P. 587–590.

13. Головенко М. Я. Наномедицина: досягнення і перспективи розвитку новітніх технологій у діагностиці і лікуванні / М. Я. Головенко // *Журн. АМН України.* – 2007. – **13**, № 4. – С. 1–23.

14. Ефективність дії наночастинок міді до збудників інфекційно-запальних процесів різної локалізації / Л. С. Резніченко, А. В. Руденко, П. В. Сімонов [та ін.] // *Вісн. фармації.* – 2012. – № 3 (71). – С. 75–78.

REFERENCES

1. Kotsiubasa, I. Ya. (Ed.). (2006). *Doklinichni doslidzhennia veterynarnykh likarskykh zasobiv [Preclinical studies of veterinary drugs]*. Lviv [in Ukrainian].

2. Ingle, A.P., Duran, N., & Rai, M. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based

nanoparticles: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (3), 1001-1009.

3. Stefanov, O.V. (Ed.). (2001). *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv: metod. rekom. [Preclinical studies of medicines: guidelines]*. Kyiv [in Ukrainian].

4. (2009). Pro zatverdzenia Poriadku provedennia doklinichnoho vyvchennia likarskykh zasobiv ta ekspertyzy materialiv doklinichnoho vyvchennia zasobiv: nakaz MOZ Ukrainy № 944 vid 14.12.2009 r. [On the statement of the Order of carrying out preclinical studying of drugs and examination of materials of preclinical studying of medicines: the order of the Ministry of Health of Ukraine No. 944 of December 14, 2009]. Retrieved from: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/> [in Ukrainian].
5. Viktorov, A.P., Maltsev, V.I., & Belousov, Yu.B. (Eds.). (2007). *Bezopasnost lekarstv. Rukovodstvo po farmaknadzoru [Drug safety. Pharmacovigilance guidelines]*. Kyiv: Morion [in Ukrainian].
6. Chekman, I.S., Ulberh, Z.R., Malanchuk, V.O., Horchakova, N.O., & Zupanets, I.A. (2012). *Nanonauka, nanobiologiya, nanofarmatsiia [Nanoscience, nanobiology, nanopharmacy]*. Kyiv: Polihraf plus [in Ukrainian].
7. Trakhtenberh, I.M., Ulberh, Z.R., & Chekman, I.S. (2013). *Otsinka bezpeky likarskykh nanopreparativ: metod. rek. [Safety assessment of drug nanopreparations: guidelines]*. Kyiv: Ministry of Health of Ukraine [in Ukrainian].
8. Liao, M., & Liu, H. (2012). Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral administration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 34 (1), 67-80.
9. Privalova, L.I., Katsnelson, B.A., Loginova, N.V., Gurvich, V.B., Shur, V.Y., Valamina, I.E., & Makeyev, O.H. (2014). Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci.*, 15 (7), 12379-12406.
10. Pelgrift, R.Y., & Friedman, A.J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65 (13-14), 1803-1815.
11. Ghasemian, E., Naghoni, A., Tabaraie, B., & Tabaraie, T. (2012). In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method. *J. Mycol. Med.*, 22 (4), 322-328.
12. Ren, G., Hu, D., Cheng, E.W.C., Vargas-Reus, M.A., Reip P., & Allaker, R.P. (2009). Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 33, 587-590.
13. Holovenko M.Ya. (2007). Nanomedycyna: dosiahnennia i perspektyvy rozvutku novyynikh tekhnolohii u diahnozytsi i likuvanni [Nanomedicine: achievements and prospects for the development of new technologies in diagnosis and treatment]. *Zhurn. AMN Ukrainy – Journal of AMS of Ukraine*, 13 (4), 1-23 [in Ukrainian].
14. Rieznichenko, L.S., Rudenko, A.V., Simnov, P.V., Hruzina, T.H., Ulberh, Z.R., & Chekman, I.S. (2012). Efektyvnist dii nanochastynok midi do zbudnykiv infektsiino-zapalnykh protsesiv riznoi lokalizatsii [The effectiveness of copper nanoparticles to pathogens of infectious and inflammatory processes of different localization]. *Visn. Farmatsii – Bulletin of Pharmacy*, 3 (71), 75-78 [in Ukrainian].

Я. С. Стравский¹, Л. Я. Федонюк¹, О. М. Ярема¹, Л. С. Резниченко²
 ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО
 МОЗ УКРАИНЫ¹
 ИНСТИТУТ БИОКОЛОИДНОЙ ХИМИИ ИМ. Ф. Д. ОВЧАРЕНКО НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ КУПРУМА

Резюме

Вступление. Доклиническое изучение лекарственных препаратов – неотъемлемая часть процесса создания лекарственного средства. Установленные, по результатам доклинического изучения, характеристики специфической фармакологической активности и безвредности при применении и относительно его возможных отдаленных последствий являются принципиальными факторами, которые определяют возможность промышленного выпуска лекарственного средства и целесообразность его медицинского использования.

Цель исследования – изучить биобезопасность, острую токсичность, противомикробное и фунгицидное действия наночастиц Купрума.

Методы исследования. Биобезопасность синтезированной субстанции наночастиц в тестах *in vitro* определяли с использованием показателей цитотоксичности, мутагенности, молекулярно-генетического (показатель генотоксичности), физиологического (состояние микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека) и биохимических (АТФ-азная и лактатдегидрогеназная активность) маркеров. Противомикробные и фунгицидные свойства препарата также было изучено на клинических изолятах возбудителей инфекционно-воспалительных процессов: бактериях *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, грибах рода *Candida* – *C. albicans*, *Candida non-albicans* и других микромицетах – *Penicillium spp.*, *Paecilomyces lilacinus*, *A. niger* и *A. flavus*.

Результаты и обсуждение. Взаимодействие наночастиц Купрума с тестовыми эукариотическими клетками не приводило к появлению первичных ДНК-повреждений по сравнению с влиянием N-нитрозо-метилмочевины, которая является известным генотоксикантом. В образцах тестовых эукариотических клеток линии CHO-K1, обработанных наночастицами Купрума в широком концентрационном диапазоне, не было зафиксировано цитотоксического влияния исследуемого наноматериала. Экспериментальная

субстанція наночастиць Купрума (CuNP) має виражену противомікробну та фунгіцидну активність відносно всіх досліджуваних патогенних тест-культур: як в початковій концентрації (32,0 мг/мл в перерахунок на метал), так і при її десятикратному розведенні (3,2 мг/мл в перерахунок на метал). Повне інгібування росту патогенних тест-штамів спостерігали при використанні кінцевих посівних доз мікроорганізмів на чашках від 10^3 до 10^5 КУО/см³. Досліджувана субстанція наночастиць Купрума також проявляла антимікробну та фунгіцидну дію відносно клінічних ізолятів збудителів інфекційно-воспалювальних процесів різної локалізації, а саме бактерій і грибів.

Висновок. Результати оцінювання гострої токсичності субстанції наночастиць Купрума після однократного введення білим мишам в залежності від рівня дози в період 14 днів спостереження дозволяють віднести її до IV класу токсичності (малотоксичні речовини).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: наночастиці Купрума; доклінічне дослідження; біобезпека; токсичність; противомікробна дія; фунгіцидна дія.

Y. S. Stravskyy¹, L. Ya. Fedoniuk¹, O. M. Yarema¹, L. S. Reznichenko²
I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY¹
F. OVCHARENKO INSTITUTE OF BIOCLOID CHEMISTRY, NAS OF UKRAINE², KYIV

PRECLINICAL STUDIES OF COPPER NANOPARTICLES

Summary

Introduction. Preclinical study of drugs is an integral part of the drug creation process. Established for the results of preclinical studies, the characteristics of specific pharmacological activity and harmfulness during use and its possible long-term consequences are the main factors that determine the possibility of transferring the drug to commercial release and the feasibility of its medical use.

The aim of the study – to learn the biosafety, acute toxicity, antimicrobial and fungicidal effects of copper nanoparticles.

Research Methods. The biosafety of the synthesized substance of nanoparticles in *in vitro* tests was determined using cytotoxicity, mutagenicity, molecular genetic (genotoxicity), physiological ("state of the microflora of the human gastrointestinal tract") and biochemical (ATP-ase and lactate activity). Antimicrobial and fungicidal properties of drug were also studied in clinical isolates of infectious and inflammatory pathogens: bacteria *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, fungi of the genus *Candida* – *C. albicans*, *Candida non-albicans* and other micromycetes – *Penicillium spp.*, *Paecilomyces lilacinus*, *A. niger* and *A. flavus*.

Results and Discussion. The interaction of copper nanoparticles with test eukaryotic cells did not lead to the appearance of primary DNA damage, compared with the effect of N-nitrosomethylurea, which is a known genotoxicant. In the samples of test eukaryotic cells of the line treated with copper nanoparticles in a wide concentration range, no cytotoxic effect of the studied nanomaterial was recorded. The experimental substance of copper nanoparticles (CuNP) has a pronounced antimicrobial and fungicidal activity against all studied pathogenic test cultures: both in the initial concentration (32.0 mg/ml for metal) and for its tenfold dilution (3.2 mg/ml in conversion to metal). Complete inhibition of the growth of pathogenic test strains was observed at final inoculation doses of microorganisms on plates from 10^3 to 10^5 CFU/cm³. The studied substance of copper nanoparticles also showed antimicrobial and fungicidal action against clinical isolates of pathogens of infectious and inflammatory processes of different localization, namely bacteria and fungi.

Conclusion. Evaluation of acute toxicity of copper nanoparticle substances after a single intravenous injection of white rats depending on the dose level in the range of 14 days of observation allows to cancel the substance of copper nanoparticles up to class IV toxicity (low toxicity).

KEY WORDS: Cuprum nanoparticles; preclinical study; biosafety; toxicity; antimicrobial action; fungicidal action.

Отримано 03.09.20

Адреса для листування: Л. Я. Федонюк, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: fedonyuklj@tdmu.edu.ua.