

Я. С. Стравський¹, Л. Я. Федонюк¹, О. М. Ярема¹, О. І. Скиба¹, 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 ФЕРУМУ

Вступ. Доклінічне вивчення лікарських препаратів – невід’ємна частина процесу створення лікарського засобу. Доклінічне дослідження є найбільш тривалим та відповідальним етапом розробки лікарського засобу, який вимагає особливих підходів до планування і забезпечення якості при плануванні вимірювальних експериментів, проведенні випробування та оцінки його результатів.

Мета дослідження – визначити біобезпечність, гостру токсичність, протимікробну та фунгіцидну дію наночастинок Феруму.

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. Протимікробну дію нуль-валентного Феруму (Fe^0NP) щодо тест-штамів мікроорганізмів визначали методом серійних розведень у бульйоні відповідно до Методичних вказівок 4.2.1890-04, 2004. Використовували такі тест-штами мікроорганізмів, як *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, із колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Результати й обговорення. Синтезовані наночастинок є частинками Fe^0NP . Взаємодія синтезованих наночастинок Феруму з тестовими еукаріотичними клітинами не призводила до появи первинних ДНК-ушкоджень порівняно з впливом N-нітрозометилсечовини, яка є відомим генотоксикантом. Синтезовані наночастинок характеризувались як біобезпечні у тестах на мутагенність з використанням поліхроматофільних еритроцитів кісткового мозку тварин. Аналіз показав, що експериментальна субстанція Fe^0NP у досліджуваному концентраційному діапазоні проявила помірну протимікробну активність у тестах *in vitro* відносно як грамнегативних (*S. typhimurium*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*), так і грампозитивних (*S. aureus*) мікроорганізмів. Однак гриби *Candida albicans* виявилися нечутливими до наночастинок Феруму в досліджуваних концентраціях.

Висновки. Фізико-хімічна характеристика й оцінка критеріїв біобезпечності в тестах *in vitro* та *in vivo* свідчать про те, що синтезованим сферичним наночастинок нуль-валентного Феруму властивий низький рівень потенційної небезпеки: виявлено відсутність генотоксичної, цитотоксичної, мутагенної дії, негативного впливу на ключові біохімічні параметри і загальний фізіологічний стан живого організму. Це дозволяє рекомендувати синтезовану субстанцію наночастинок Феруму для подальших досліджень з метою їх застосування як потенційної біологічно активної субстанції.

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

ВСТУП. Доклінічне дослідження препаратів – етап створення ліків, який включає комплекс дослідницьких процедур та операцій з визначення нешкідливості й специфічної активності з метою одержання дозволу на їх клінічні випробування з подальшим упровадженням препаратів у промислове виробництво і медичну практику [1, 2]. Впровадження оригінальних лікарських засобів у клінічну практику не можливе без проведення доклінічного дослідження [3]. Доклінічне дослідження є найбільш тривалим та від-

© Я. С. Стравський, Л. Я. Федонюк, О. М. Ярема, О. І. Скиба, Л. С. Резніченко, 2020.

повідальним етапом розробки лікарського засобу, який вимагає особливих підходів до планування і забезпечення якості при плануванні вимірювальних експериментів, проведенні випробування та оцінки його результатів [4].

Нині в медицині формується новий напрямок – наномедицина [5, 6]. Він передбачає стеження, виправлення, конструювання та контроль над біологічними системами організму на молекулярному рівні за допомогою розроблених нанопристроїв і наноматеріалів, що дають змогу забезпечувати діагностику, лікування, профілактику захворювань [7, 8].

Мета дослідження – вивчити біобезпечність, гостру токсичність, протимікробну та фунгіцидну дію наночастинок Феруму.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Наночастинки Феруму (FeNP) синтезували за оригінальним протоколом, розробленим в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, методом хімічної конденсації у водному середовищі шляхом відновлення хлориду Феруму (III) борогідридом натрію. Концентрація отриманої водної дисперсії наночастинок Феруму становила 10,0 мг/мл за металом.

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

Хімічний склад наночастинок Феруму оцінювали шляхом 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.). Біобезпечність наночастинок у тестах *in vivo* визначали за показниками LD₅₀ при пероральному та внутрішньовенному шляхах введення.

Показники LD₅₀ при пероральному та внутрішньовенному шляхах введення визначали з використанням білих мишей лінії BALB/c обох статей масою 18–22 г віком 2–2,5 місяця. Тварин під час експерименту утримували в стандартних умовах виварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Контрольним тваринам вводили розчинник – воду для ін'єкцій.

Реєстрацію і підрахунок загиблих тварин у кожному з рівнів доз субстанції наночастинок Феруму здійснювали протягом 14 діб. На основі отриманих даних проводили пробіт-аналіз за D. J. Finney із застосуванням комп'ютерної програми BioStat 2009 for Windows (v5.8.4).

Протимікробну активність нуль-валентного Феруму (Fe⁰NP) щодо тест-штамів мікроорганізмів

визначали методом серійних розведень у бульйоні відповідно до Методичних вказівок 4.2.1890-04, 2004. Використовували такі тест-штами мікроорганізмів, як *Salmonella typhimurium* 144, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* 209P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (F-51), *Proteus vulgaris* HX 19 № 222, *Proteus mirabilis* ГИСК 160208, SS/F-403, *Candida albicans*, із колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ). Серійні розведення стерильного розчину Fe⁰NP у бульйоні (рідкому поживному середовищі) готували таким чином, щоб після інокуляції кінцеві концентрації наночастинок становили 911,5, 455,8, 227,9 і 113,9 мкг/мл. Тестування проводили в об'ємі 1 мл кожного розведення Fe⁰NP з кінцевою концентрацією досліджуваних мікроорганізмів 5×10⁵ КОЕ/мл. Після інокуляції культивування мікроорганізмів здійснювали в термостаті при температурі 37 °С протягом 24 год. Для визначення наявності росту мікроорганізмів за присутності наночастинок пробірки із вказаними розведеннями Fe⁰NP порівнювали з референтною пробіркою ("від'ємним" контролем), що містила вихідний інокулюм без додавання Fe⁰NP і зберігалася в холодильнику при температурі 4 °С.

Дослідження на тваринах проводили з дотриманням основних положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р., наказу МОЗ України № 66 від 13.02.2006 р., Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Синтезовані наночастинки Феруму мали сферичну форму та середній розмір 40 нм (рис. 1).

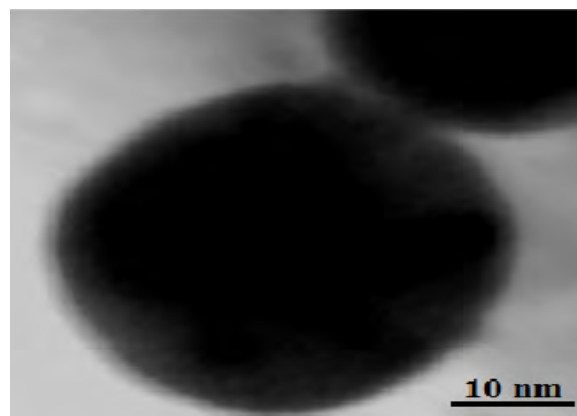


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення наночастинок Феруму (FeNP), синтезованих методом хімічної конденсації у водному розчині.

Результати рентгеноструктурного мікроаналізу хімічного складу синтезованих наночастинок Феруму, проведеного методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії, наведено на рисунку 2.

Отримані дані засвідчили, що у складі наночастинок вміст Феруму (Fe) становить 100 % (рис. 2). Присутність у структурі частинки кисню не фіксується. Це вказує на те, що синтезовані наночастинок є частинками Fe⁰NP. Оксидів та гідроксидів Феруму при мікроаналізі хімічного складу наночастинок не виявляли [9].

Наступним етапом характеристики синтезованої субстанції було визначення параметрів її біобезпечності, оскільки висока біологічна безпечність та біосумісність субстанції з потенційною біологічною активністю є необхідною умовою її подальших доклінічних і клінічних випробувань.

У зразках тестових еукаріотичних клітин лінії СНО-K1, оброблених синтезованими наночастинок Феруму в широкому концентраційному діапазоні, не було зафіксовано цитотоксичного впливу досліджуваного наноматеріалу [10].

Генотоксичного впливу синтезованих наночастинок Феруму на тестові клітини також не було виявлено. Взаємодія синтезованих 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 наночастинок Феруму, показано на рисунку 3, Б.

Показник ушкоджень ДНК ("індекс ДНК-комет" ($I_{\text{ДНК}}$)) під впливом досліджуваної субстанції наночастинок Феруму в різних концентраціях сягав значень, близьких до $I_{\text{ДНК}}$ негативного контролю (нативні клітини).

Отримані дані щодо біобезпечності наночастинок Феруму засвідчили відсутність токсичного впливу синтезованих наночастинок Феруму, на що вказувало статистично достовірне зменшення кількості КУО, пробіотичних культур у присутності наночастинок Феруму не спостерігали [11].

При визначенні особливостей впливу наночастинок Феруму на біохімічні маркери безпеки

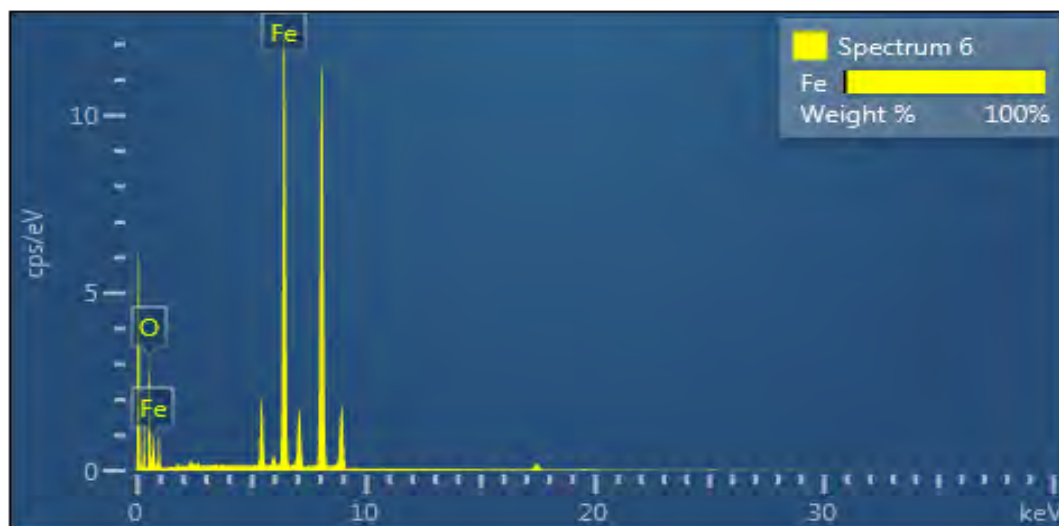


Рис. 2. Рентгеноструктурний мікроаналіз хімічного складу синтезованих наночастинок Феруму (FeNP).

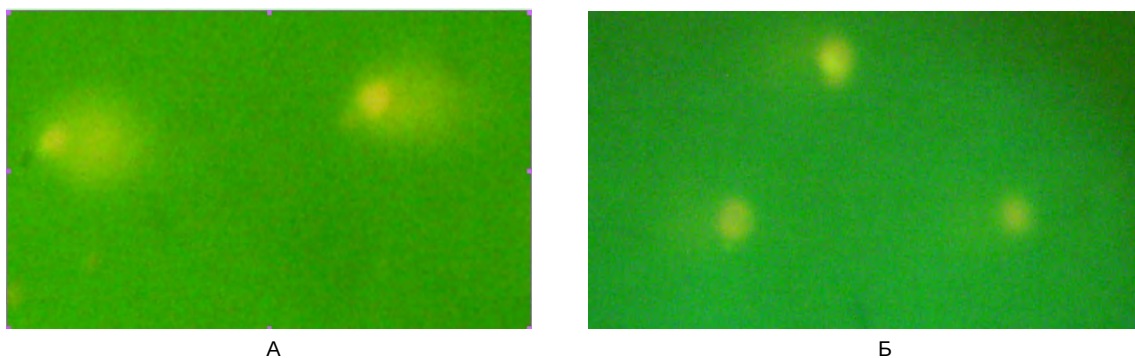


Рис. 3. Електрофоретичні зображення: А – ДНК, ушкоджена N-нітрозометилсечовиною (позитивний контроль – відомий генотоксикант); Б – ДНК, не ушкоджена під впливом наночастинок Феруму.

наночастинок металів (АТР-азну активність сумарної мембранної фракції тестових еукаріотичних клітин лінії CHO-K1 та лактатдегідрогеназу активність їх цитозольної фракції) не було виявлено токсичного впливу наночастинок Феруму в обох випадках.

Синтезовані наночастинок характеризувались як біобезпечні в тестах на мутагенність з використанням поліхроматофільних еритроцитів кісткового мозку тварин.

Результати дослідження параметрів LD_{50} синтезованих наночастинок Феруму при пероральному та внутрішньовенному шляхах введення субстанції засвідчили, що після одноразового внутрішньошлункового введення Fe^0NP протягом 14 діб спостереження в контрольній та дослідній групах не загинула жодна тварина (табл. 1).

Показник LD_{50} синтезованої субстанції при цьому шляху введення перевищував 5000 мг/кг, що дозволило віднести Fe^0NP до практично нетоксичних речовин, тобто V класу токсичності за Н. С. Hodge і Л. Н. Sterner. Лише протягом перших 3 год у мишей дослідної групи спостерігали транзиторне прискорення моторно-евакуаторної функції кишечника, а також чорне забарвлення фекалій. У подальшому відмінностей у загальному стані, руховій активності, хар-

човій поведінці та прирості маси тіла тварин дослідної і контрольної груп протягом 14 діб спостереження не було виявлено.

На відміну від внутрішньошлункового введення, летальність мишей після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок Феруму мала дозозалежний характер (табл. 2).

Так, одразу після введення токсичних (летальних) доз наночастинок Феруму в мишей розвивалися прояви інтоксикації, провідними симптомами яких були колапс, судоми, набряк легень. На піку вказаних проявів частина тварин гинула. При цьому спостерігали статеву чутливість експериментальних тварин до досліджуваної субстанції.

У таблиці 3 наведено зведені розрахунки значень середньосмертельної дози (LD_{50}) наночастинок Феруму після одноразового внутрішньовенного та внутрішньошлункового введення мишам.

Отримані значення LD_{50} свідчать про те, що при внутрішньовенному шляху введення синтезовані наночастинок належать до IV класу токсичності за Н. С. Hodge і Л. Н. Sterner та є малотоксичними речовинами [9, 12].

Результати оцінки протимікробної активності Fe^0NP відносно тест-штамів мікроорганізмів наведено в таблиці 4.

Таблиця 1 – Летальність самок мишей після одноразового внутрішньошлункового введення наночастинок Феруму протягом 14 діб спостереження

Група тварин	Рівень дози, мг/кг	Загальна кількість тварин у групі	Кількість тварин, які загинули	
			абс.	%
Контрольна	0	n=5	0	0
Дослідна	5000	n=5	0	0

Таблиця 2 – Загальна летальність самців і самок мишей (комбінований розрахунок) після одноразового внутрішньовенного введення наночастинок Феруму залежно від рівня дози протягом 14 діб спостереження

Рівень дози, мг/кг	Самки і самці мишей, n=96		
	кількість тварин, які загинули		загальна кількість тварин
	абс.	%	
0	0	0	n=16
180	3	18,75	n=16
205	5	31,25	n=16
230	8	50,00	n=16
255	13	81,25	n=16
280	15	93,75	n=16

Таблиця 3 – Значення середньосмертельної дози наночастинок Феруму після одноразового внутрішньовенного та внутрішньошлункового введення мишам (мг/кг)

Шлях введення	Внутрішньовенний			Внутрішньошлунковий
	Самки, n=64	Самці, n=56	Обидві статі, n=96	
Стать	Самки, n=64	Самці, n=56	Обидві статі, n=96	Самки, n=10
LD_{50}	207,5±10,6	231,4±8,1	220,3±7,1	>5000
Клас токсичності	IV	IV	IV	V

Примітка. LD_{50} ±стандартна похибка.

Таблиця 4 – Оцінка протимікробної активності нуль-валентного Феруму відносно тест-штамів мікроорганізмів (метод серійних розведень у бульйоні)

Тест-штам	Концентрація наночастинок Феруму, мкг/мл за металом (об'єм проби = 1 мл)			
	911,5	455,8	227,9	113,9
<i>Salmonella typhimurium</i> 144	100 % інгібування	100 % інгібування	100 % інгібування	50 % інгібування
<i>Shigella sonnei</i>	50 % інгібування	50 % інгібування	50 % інгібування	30 % інгібування
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	100 % інгібування	50 % інгібування	50 % інгібування	50 % інгібування
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 (F-51)	100 % інгібування	100 % інгібування	50 % інгібування	Не інгібують
<i>Proteus vulgaris</i> HX 19 № 222	100 % інгібування	100 % інгібування	Не інгібують	Не інгібують
<i>Proteus mirabilis</i> ГИСК 160208, SS/F-403	100 % інгібування	Не інгібують	Не інгібують	Не інгібують
<i>Candida albicans</i>	Не інгібують	Не інгібують	Не інгібують	Не інгібують

У тестах із *S. sonnei* під впливом максимальної досліджуваної концентрації наночастинок (911,5 мкг/мл) спостерігали 50 % пригнічення росту тест-штаму. Повного пригнічення росту *S. sonnei* у випробовуваному концентраційному діапазоні Fe⁰NP не відзначали.

Для штаму *S. typhimurium* зареєстровано 100 % пригнічення росту вже під впливом наночастинок Fe⁰NP у концентрації 227,9 мкг/мл.

Для патогенного тест-штаму *S. aureus* спостерігали 100 % пригнічення росту під впливом наночастинок Fe⁰NP у концентрації 911,5 мкг/мл.

Досліджувані наночастинок Fe⁰NP у концентрації 227,9 мкг/мл інгібували ріст штаму *P. aeruginosa* на 50 %, а в концентрації 455,8 мкг/мл – викликали повне 100 % пригнічення росту.

Встановлено повне пригнічення росту *P. vulgaris* під впливом наночастинок Феруму в концентрації 455,8 мкг/мл і *P. mirabilis* – 911,5 мкг/мл.

Досліджувані наночастинок в усьому випробовуваному концентраційному діапазоні не інгібували росту *Candida albicans*.

ВИСНОВКИ. 1. Фізико-хімічна характеристика й оцінка критеріїв біобезпечності в тестах

in vitro та *in vivo* свідчать про те, що синтезованим сферичним наночастинок нуль-валентного Феруму властивий низький рівень потенційної небезпеки: виявлено відсутність генотоксичної, цитотоксичної, мутагенної дій, негативного впливу на ключові біохімічні параметри і загальний фізіологічний стан живого організму. Це дозволяє рекомендувати синтезовану субстанцію наночастинок Феруму для подальших досліджень з метою їх застосування як потенційної біологічно активної субстанції.

2. Синтезована експериментальна субстанція наночастинок нуль-валентного Феруму в тестах *in vitro* виявилася біобезпечною за визначеними маркерами.

3. Експериментальна субстанція нуль-валентного Феруму в досліджуваному концентраційному діапазоні проявляла помірну протимікробну активність у тестах *in vitro* відносно як грамнегативних (*S. typhimurium*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*), так і грампозитивних мікроорганізмів (*S. aureus*). Однак гриби *Candida albicans* виявилися нечутливими до наночастинок Феруму в досліджуваних концентраціях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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

2. Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів : наказ МОЗ України від 14.12.2009 р. № 944 [Електрон-

ний ресурс]. – Режим доступу : <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>.

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

4. Головенко М. Я. Наномедицина: досягнення і перспективи розвитку новітніх технологій у діагности-

ці і лікуванні / М. Я. Головенко // Журн. АМН України. – 2007. – 13, № 4. – С. 1–23.

5. Наноматеріали в біології і основи ветеринарії [В. Б. Борисевич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов та ін.]. – К., 2010. – 415 с.

6. Нанотехнологія у ветеринарній медицині [В. Б. Борисевич, В. В. Борисевич, В. Г. Каплуненко та ін.]. – К.: Поліграф центр Ліра, 2009. – 231 с.

7. Природні механізми дії наноматеріалів: фізико-хімічні, фізіологічні, біохімічні, фармакологічні та токсикологічні аспекти / В. Ф. Москаленко, О. П. Яворовський, Я. В. Цехмістер [та ін.] // Укр. наук.-мед. молодіжний журн. – 2011. – Спец. вип. № 4. – С. 21–26.

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

9. Наноматеріали і наночастинки. Класифікація / І. С. Чекман, Н. О. Горчакова, О. Ю. Озейчук [та ін.] // Наук. вісн. нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця. – 2009. – № 2. – С. 188–201.

10. Чекман І. С. Нанотехнологія: вплив наночастинок на клітину / І. С. Чекман, М. О. Говоруха, А. М. Дорошенко // Укр. мед. часоп. – 2011. – № 1 (81). – С. 30–35.

11. Inflammatory properties of iron-containing carbon nanoparticles / W. J. Waldman, R. Kristovich, D. A. Knight, P. K. Dutta // Chem. Res. Toxicol. – 2007. – 20 (8). – P. 1149–1154.

12. Sahoo S. K. The present and future of nanotechnology in human health care / S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda // Nanomed. – 2007. – 3 (1). – P. 20–31.

REFERENCES

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

2. Pro zatverdzhennia poriadku provedennia doklinichnoho vyvchennia likarskykh zasobiv ta ekspertyzy materialiv doklinichnoho vyvchennia likarskykh zasobiv [About the statement of the order of carrying out preclinical studying of medicines and examination of materials of preclinical studying of medicines]. Order of the Ministry of Ukraine of December 14, 2009, No. 944. Retrieved from: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/> [in Ukrainian].

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

4. Holovenko, M.Ya. (2007). Nanomedycyna: dosiahnennia i perspektyvy rozvytku novitnikh tekhnolohii u diahnozytsii 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].

5. Borysevych, V.B., Kaplunencko, V.H., & Kosinov, M.V. (2010). *Nanomaterialy v biolohii i osnovy veterynarii [Nanomaterials in biology and basics of veterinary medicine]*. Kyiv [in Ukrainian].

6. Borysevych, V.B., Borysevych, B.V., & Kaplunencko, V.H. (2009). *Nanotekhnolohiia u veterynarnii medytsyni [Nanotechnology in veterinary medicine]*. Kyiv: Polihraf tsents Lira [in Ukrainian].

7. Moskalenko, V.F., Yavorovskiy, O.P., & Tsekhmister, Ya.V. (2011). Pryrodni mekhanizmy dii nanomaterialiv: fizyko-khimichni, fiziolohichni, biokhimichni, farmakolohichni ta toksylohichni aspekty [Natural mechanisms of action of nanomaterials: physicochemical, physiological, biochemical, pharmacological and toxicological aspects]. *Ukr.-med. molodizhnyi zhurnal. Spets. vypusk – Ukrainian Scientific Medical Journal, Special Issue*, 4, 21-26 [in Ukrainian].

8. Viktorov, A.P., Maltsev, V.I., & Belousov, Yu.B. (Eds.). (2007). *Bezopasnost lekarstv. Rukovodstvo po farmakonadzoru [Drug safety. Pharmacovigilance Guide]*. Kyiv: Morion [in Russian].

9. Chekman, I.S., Horchakova, N.O., & Ozeichuk, O.Yu. (2009). Nanomaterialy i nanochastynky. Klasyfikatsiia [Nanomaterials and nanoparticles. Classification]. *Nauk. visn. nats. med. un-tu im. O.O. Bohomoltsia – Scientific Bulletin of O.O. Bohomolets National Medical University*, 2, 188-201 [in Ukrainian].

10. Chekman I.S., Hovorukha, M.O., & Doroshenko, A.M. (2011). Nanotekhnolohiia: vplyv nanochastynok na klitynu [Nanotechnology: the effect of nanoparticles on the cell]. *Ukr. med. chasopys – Ukrainian Medical Review*, 1 (81), 30-35 [in Ukrainian].

11. Waldman, W.J., Kristovich, R., Knight, D.A. & Dutta, P.K. (2007). Inflammatory properties of iron-containing carbon nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.*, 20 (8), 1149-1154.

12. Sahoo, S.K., Parveen, S., & Panda, J.J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomed.*, 3 (1), 20-31.

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ ФЕРУМА

Резюме

Вступление. Доклиническое изучение лекарственных препаратов – неотъемлемая часть процесса создания лекарственного средства. Доклиническое исследование является наиболее длительным и ответственным этапом разработки лекарственного средства, который требует особых подходов к планированию и обеспечению качества при планировании измерительных экспериментов, проведении испытания и оценки его результатов.

Цель исследования – определить биобезопасность, острую токсичность, противомикробное и фунгицидное действия наночастиц Ферума.

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. Противомикробное действие нуль-валентного Ферума (Fe^0NP) относительно тест-штаммов микроорганизмов определяли методом серийных разведений в бульоне согласно Методических указаний 4.2.1890-04, 2004. Использовали такие тест-штаммы микроорганизмов, как *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, из коллекции Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов.

Результаты и обсуждение. Синтезированные наночастицы являются частицами Fe^0NP . Взаимодействие синтезированных наночастиц Ферума с тестовыми эукариотическими клетками не приводило к появлению первичных ДНК-повреждений по сравнению с влиянием N-нитрозометилмочевины, которая является известным генотоксикантом. Синтезированные наночастицы характеризовались как биобезопасные в тестах на мутагенность с использованием полихроматофильных эритроцитов костного мозга животных. Анализ показал, что экспериментальная субстанция Fe^0NP в исследуемом концентрационном диапазоне проявила умеренную противомикробную активность в тестах *in vitro* по отношению как грамотрицательных (*S. typhimurium*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*), так и грамположительных микроорганизмов (*S. aureus*). Однако грибы *Candida albicans* оказались нечувствительными к наночастицам Ферума в исследуемых концентрациях.

Выводы. Физико-химическая характеристика и оценка критериев биобезопасности в тестах *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что синтезированным сферическим наночастицам нуль-валентного Ферума свойственны низкий уровень потенциальной опасности: обнаружено отсутствие генотоксического, цитотоксического, мутагенного действий, отрицательного влияния на ключевые биохимические параметры и общее физиологическое состояние живого организма. Это позволяет рекомендовать синтезированную субстанцию наночастиц Ферума для дальнейших исследований с целью их применения в качестве потенциальной биологически активной субстанции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: наночастицы Ферума; доклиническое изучение; биобезопасность; токсичность; противомикробное действие; фунгицидное действие.

Y. S. Stravskyy¹, L. Ya. Fedoniuk¹, O. M. Yarema¹, E. I. Skyba¹, L. S. Reznichenko²
I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY¹
F. D. OVCHARENKO INSTITUTE OF BIOCOLLOIDAL CHEMISTRY, NAS OF UKRAINE², KYIV

PRECLINICAL STUDY OF IRON NANOPARTICLES

Summary

Introduction. Preclinical studies of drugs is an integral part of the drug development process. Preclinical research is the longest and most responsible stage of drug creation, which requires special approaches to planning and quality assurance in the planning of measurement experiments, testing and evaluation of its results.

The aim of the study – to determine 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 (ATPase and lactate activity). Antimicrobial activity zerovalent Iron (Fe⁰NP) for test strains of microorganisms was determined by the method of serial dilutions in broth according to methodical instruction 4.2.1890-04, 2004. The following test strains of microorganisms were used: *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* from the collection of the State Research and Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms.

Results and Discussion. The synthesized nanoparticles are particles of Fe⁰NP. The interaction of the synthesized iron nanoparticles with the 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. The synthesized nanoparticles were characterized as biosafe in mutagenicity tests using polychromatophilic erythrocytes of animal bone marrow. The analysis showed that the experimental substance Fe⁰NP in the studied concentration range showed moderate antimicrobial activity in *in vitro* tests against both gram-negative (*S. typhimurium*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*), and gram-positive microorganisms (*S. aureus*). However, fungi *Candida albicans* were insensitive to iron nanoparticles at the studied concentrations.

Conclusions. Physico-chemical characteristics and evaluation of biosafety criteria in *in vitro* and *in vivo* tests indicate that the synthesized spherical nanoparticles of zerovalent iron are characterized by a low level of potential danger: no genotoxic, cytotoxic, mutagenic effects, adverse effects on key biochemical parameters state of a living organism. This allows us to recommend the synthesized substance of iron nanoparticles for further research with a view to their use as a potential biologically active substance.

KEY WORDS: iron nanoparticles; preclinical study; antimicrobial action; fungicidal action.

Отримано 05.11.20

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