

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ Й АНТИОКСИДАНТНОЇ
АКТИВНОСТІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ АНТИОКСИДАНТІВ
НА МОДЕЛІ *PARAMECIUM CAUDATUM***

Д. Пилипенко

*Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут»
вул. Кирпичова, 2, Харків 61002, Україна
e-mail: pdmforwork@gmail.com*

Антиоксидантні препарати активно застосовуються в медичній практиці для лікування запальних процесів у кардіологічних, офтальмологічних, аутоімунних, онкологічних та інших захворюваннях. Застосування методів нанобіотехнології є перспективним напрямом сучасної фармації, оскільки дає змогу створити препарати якісно нового рівня. Інкапсуляція активних фармацевтичних інгредієнтів до складу ліпосомальних наночастинок допомагає підвищити біодоступність і ефективність природних антиоксидантів, створити водорозчинні ін'єкційні форми гідрофобних сполук. Біотестування є простим, інформативним експрес-методом оцінки токсичності й антиоксидантної активності лікарських препаратів, що може бути обґрунтованою альтернативою використанню лабораторних тварин на етапі скринінгу. Одноклітинні інфузорії виду *Paramecium caudatum* є поширеним тест-об'єктом завдяки високій чутливості до змін навколишнього середовища; великим розмірам клітини, що забезпечує можливість спостереження за змінами морфології та руху клітини; простоті культивування.

Метою роботи є оцінка токсичності й антиоксидантної активності ліпосомальних форм антиоксидантів: кверцетину, куркуміну, коензиму Q10 та цитохрому С за допомогою біотестування на культурі *Paramecium caudatum*.

Досліджено токсичність ліпосомальних форм кверцетину, куркуміну, коензиму Q10 та цитохрому С у дозах 25–100 мкг/мл на культурі *Paramecium caudatum*. Інкубація культури *Paramecium caudatum* із ліпосомальними формами кверцетину, куркуміну та коензиму Q10 сприяла розмноженню культури, тоді як ліпосомальний цитохром С викликав лізис клітин протягом 24 год. Встановлено, що на токсичність ліпосомального препарату впливає його ліпідний склад. Включення до складу ліпідної мембрани аніонного фосфоліпиду дипальмітоїлфосфатидилгліцерину суттєво зменшує виживання тест-культури, порівняно із ліпосомами, що містять лише фосфатидилхолін. На моделі окисативного стресу *Paramecium caudatum*, індукованого гідроген пероксидом, ліпосомальні форми кверцетину, куркуміну та коензиму Q10 зумовлюють дозозалежний антиоксидантний ефект, що проявлявся у збільшенні стійкості тест-культури до токсиканта.

Ключові слова: ліпосомальні антиоксиданти, токсичність, антиоксидантна активність, біотестування, *Paramecium caudatum*

Процеси пероксидного окиснення ліпідів розвиваються під час багатьох захворювань різної етіології: ішемічна хвороба серця, цукровий діабет, катаракта, онкологічні, аутоімунні захворювання та ін. [23]. Для гальмування розвитку окисативного стресу та нормалізації функціонального стану організму застосовують антиоксиданти різної природи.

Тому створення ефективних антиоксидантних препаратів є актуальним завданням сучасної фармації.

Серед екзогенних антиоксидантів велику групу становлять біофлавоноїди, серед них – кверцетин (Quer) і куркумін (Cur). Quer – один із широко відомих природних рослинних антиоксидантів, який успішно застосовується як протизапальний засіб, кардіопротектор, антигіпоксанти та ін. [29]. Доведена фармакологічна активність Cur: протизапальна, протипухлинна, нейро-, гепато-, кардіопротекторна та ін. [26]. Серед ендogenous сполук добре відома антиоксидантна активність цитохрому С (CytC) та коензиму Q10 (Q10) – переносників електронів у процесі окисного фосфорилування мітохондрій. Завдяки своїй біологічній ролі ці сполуки знайшли застосування у терапії станів, пов'язаних із порушеннями клітинного дихання та синтезу АТФ, насамперед у кардіології [2, 19].

Перспективним напрямом нанобіотехнології є включення активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) до складу ліпосомальних наночастинок (Ls) [17]. Створення Ls форм антиоксидантів дає змогу підвищити їхню біодоступність і ефективність, створити ін'єкційні водорозчинні форми ліпофільних антиоксидантів, зменшити побічні ефекти на організм. На сьогоднішній день в Україні запропоновано способи одержання Ls форм Quer [8], Q10 [7], CytC [9] та Cur [22], які перебувають на різних стадіях розробки, в тому числі вперше у світі в Україні виробляється Ls-Quer («Ліпофлаво», розчин для ін'єкцій та очні краплі). Важливим етапом розробки лікарського препарату є дослідження фармакологічної активності, для проведення яких використовують лабораторних тварин (щурів, мишей та ін.), проте вартість тварин і їхнього утримання є високою. Тому актуальності набуває використання біотестування для первинного скринінгу токсичності й антиоксидантної активності досліджуваних препаратів.

Принцип біотестування заснований на адаптації тест-організмів до змін умов навколишнього середовища. Методики біотестування досить прості, інформативні, експресні та не потребують дорогого спеціального обладнання. Серед тест-організмів у фармації широко використовуються інфузорії виду *Paramecium caudatum* завдяки таким перевагам: поєднання ознак як окремої еукаріотичної клітини, так і самостійного організму; висока чутливість до змін навколишнього середовища; можливість завдяки великим розмірам клітини фіксувати зміни морфологічних ознак клітини, рухливість, ріст, виживання культури, отримуючи кількісні показники; короткий життєвий цикл дає можливість простежити реакцію на досліджувану речовину в ряду поколінь; прості умови культивування, невибагливість і швидка адаптація до змін умов навколишнього середовища; можливість проведення експрес-контролю; економічність проведення дослідження [28]. Висока чутливість *Paramecium caudatum* дає змогу визначити токсичність низьких доз АФІ та оцінити ступінь токсичного впливу за специфічними реакціями задовго до загибелі клітини [6, 28]. Модель оксидативного стресу на *Paramecium caudatum* використовується для дослідження антиоксидантних властивостей широкого спектра лікарських форм: розчинів [14], екстрактів [11], сиропів [13], м'яких лікарських форм [16], нанопрепаратів [15] та ін.

Метою роботи є порівняльна оцінка токсичності й антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur, Q10 і CytC на моделі *Paramecium caudatum*.

Матеріали та методи

У роботі використовували Quer (PVP Sociedade Anonima, Бразилія); Q10 (Hangzhou Huadong Medicine Group Kangrun Pharmaceutical Co., Ltd, Китай); CytC (Hebei Lead Bio-Chemicals Co., Ltd, Китай); Cur, одержаний за розробленим методом [10]; фосфатидилхолін яєчного жовтка (EPC) та дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (DPPG) (Lipoid, Німеччина);

лактоза (Sigma Aldrich); 0,01 М фосфатний буфер рН 6,7–7,0. Ліпосоми одержували методом ліпідної плівки за відомими методами [7–9, 22].

Культивування *Paramecium caudatum* здійснювали на середовищі Лозина-Лозинського із використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* як корму [13, 28].

Токсичність Ls препаратів і окремих ліпідів оцінювали за виживанням та інтенсивністю розмноження культури *Paramecium caudatum* протягом 72 год інкубації у поживному середовищі із додаванням досліджуваних препаратів за температури 20–25 °С [11, 13, 16]. Як контроль використовували культуру *Paramecium caudatum* без додавання препаратів. Підрахунок клітин проводили через 24, 48 і 72 год після додавання досліджуваних препаратів за допомогою оптичного мікроскопа.

Вивчення антиоксидантної активності проводили на моделі оксидативного стресу *Paramecium caudatum*, індукованого додаванням 1 % розчину гідроген пероксиду [4, 13, 16]. Культуру *Paramecium caudatum* інкубували протягом 24 год із досліджуваними препаратами в дозах 25, 50, 75 і 100 мкг/мл (за АФІ) за температури 20–25 °С, після чого змішували 1 мл культури *Paramecium caudatum* із 1 мл розчину гідроген пероксиду. Як контроль використовували культуру *Paramecium caudatum* без додавання препаратів. Спостереження за змінами морфології та руху клітин здійснювали за допомогою оптичного мікроскопа, фіксували час загибелі 100 % клітин. Антиоксидантну активність оцінювали за допомогою індексу біологічної активності (I_{BA}) – відношення середнього часу загибелі 100 % клітин у досліджуваному зразку до контролю [5]. За значення I_{BA} в діапазоні $1,00 \pm 0,10$ – антиоксидантна активність відсутня, досліджуваний зразок не відрізняється від контролю; $I_{BA} > 1,10$ – досліджуваний зразок проявляє антиоксидантну активність, підвищуючи стійкість клітин до токсиканта; $I_{BA} < 0,90$ – досліджуваний зразок проявляє токсичний вплив, зменшуючи життєздатність клітин.

Достовірність результатів оцінювали за допомогою критерію Стьюдента ($n=5$, $P < 0,05$) відповідно до ДФУ 2.0.

Результати і їхнє обговорення

Дослідження токсичності ліпосомальних форм антиоксидантів на культурі *Paramecium caudatum*. Проведено вивчення токсичності Ls форм Quer, Cur, Q10, CytC на культурі *Paramecium caudatum* у концентраціях 25–100 мкг/мл (за АФІ). Встановлено, що у досліджуваному діапазоні концентрацій протягом 24 год інкубації культури із Ls формами Quer, Cur та Q10 спостерігається збільшення чисельності клітин до 180 % (рис. 1), при цьому клітини зберігають нормальну морфологію та характер рухової активності. Крім того, у дозах 25 і 50 мкг/мл чисельність клітин, інкубованих із Ls формами АФІ, не знижувалася порівняно із контролем протягом 72 год інкубації (рис. 1а, 1б).

За збільшення дози препаратів до 75 мкг/мл через 72 год спостерігали зниження чисельності клітин у Ls-Cur (до 40 % від початкової чисельності) і Ls-Quer (до 70 %) (рис. 1в). У максимальній використованій дозі всі досліджувані препарати викликають суттєве зниження чисельності клітин *Paramecium caudatum* через 72 год (рис. 1г), причому токсичність зростає у ряду: Ls-Quer < Ls-Q10 < Ls-Cur.

Інкубація із Ls-CytC призводила до 100 % лізису клітин *Paramecium caudatum* у всіх досліджуваних концентраціях протягом 24 год (рис. 1). При цьому вільна форма CytC в концентраціях 10–400 мкг/мл не викликає загибелі, змін морфології або характеру руху протягом 72 год.

На токсичність Ls препаратів можуть впливати як фізико-хімічні властивості АФІ, так і склад ліпідів у мембрані. Досліджувані препарати у своєму складі містять ЕРС (Ls-

Quer –100 %), EPC:DPPG – 10:1 (Ls-Cur, Ls-Q10) та EPC:DPPG – 6:5 (Ls-CytC). Різниця у ліпідному складі передусім обумовлена вимогами одержання стабільних і стандартних Ls із високим ступенем включення АФІ у їхню мембрану та водне середовище [17]. Ступінь включення, у свою чергу, залежить від фізико-хімічних властивостей АФІ: заряду, структури та ін. Встановлено, що введення до складу Ls аніонних фосfolіпідів дає змогу підвищити включення у них АФІ. Заряд АФІ, зокрема, позитивно зарядженого CytC, дає змогу включити даний АФІ до Ls за рахунок аніонного фосfolіпиду [9]. Крім цього, включення в Ls DPPG допомагає покращити технологічні параметри під час виробництва Ls препаратів [22].

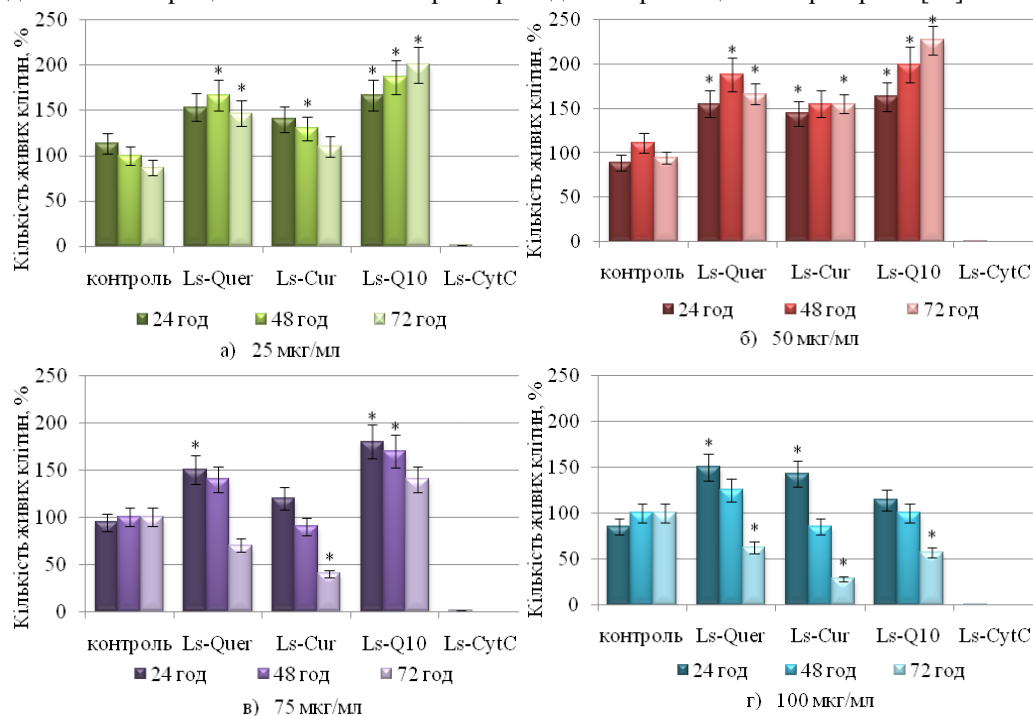


Рис. 1. Токсичність Ls форм антиоксидантних препаратів на культурі *Paramecium caudatum* протягом 72 год (* достовірність $P < 0,05$, порівняно із контролем; $n=5$)

Зниження активності *Paramecium caudatum* та їхня 100 % загибель може бути пов'язана зі значною кількістю DPPG в Ls. Підтвердженням цього є роботи [1, 4], в яких продемонстровано, що аніонні фосfolіпіди (кардіоліпін, фосфатидилгліцерин, фосфатидна кислота) в концентраціях вище 335 мкМ проявляють бактерицидну активність щодо грамнегативних бактерій *E. coli* BL21(DE3) та грампозитивних бактерій *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, а також показана антибактеріальна активність «порожніх» Ls на основі кардіоліпину щодо резистентного штаму *M. tuberculosis* MS-115 із множинною стійкістю до антибіотиків. Автори пояснюють це розвитком вільнорадикальних процесів під дією аніонних фосfolіпідів [12]. Крім того, в основі токсичного впливу аніонного фосfolіпиду DPPG на клітини *Paramecium caudatum* може лежати ряд механізмів: зміна температури фазового переходу в мембрані *Paramecium caudatum*, що може змінювати її плинність і проникність [18]; відомо, що аніонні фосfolіпіди впливають на міжфазні ефекти, включаючи електростатичну взаємодію у процесі поверхневого зв'язування білків, впливаючи на позаклітинні процеси під час порушення нормальної мембранної асиметрії [3].

Дослідження токсичності ліпідів на культурі *Paramecium caudatum*. Проведено вивчення токсичності «порожніх» Ls на основі ЕРС (аналогічно ліпідному складу Ls-Quer) та суміші ЕРС:DPPG у співвідношеннях 10:1 (аналогічно ліпідному складу Ls-Cur, Ls-Q10) та 6:5 (аналогічно ліпідному складу Ls-CytC) в інтервалі концентрацій 250–4000 мкг/мл на культурі *Paramecium caudatum*.

Показано, що за інкубації культури *Paramecium caudatum* з Ls на основі ЕРС та суміші ЕРС:DPPG (10:1) протягом 24 год не спостерігали ні загибелі, ні підвищення інтенсивності поділу клітин порівняно із контролем. При цьому у зразках із ЕРС через 48 год інкубації спостерігали зниження чисельності живих клітин до 60–65 % за концентрації ліпідів більше 3000 мкг/мл (рис. 2), тоді як у зразках із сумішшю ЕРС:DPPG зниження чисельності живих клітин спостерігали за концентрації ліпідів більше 1000 мкг/мл (рис. 3).

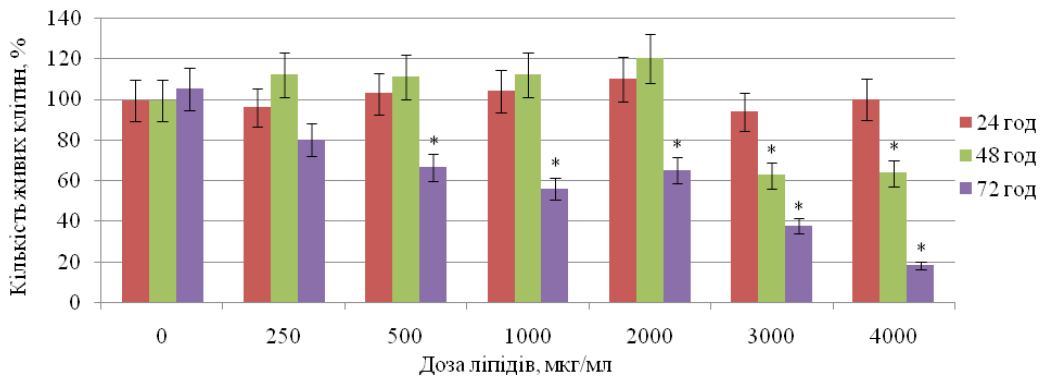


Рис. 2. Залежність чисельності культури *Paramecium caudatum* від дози ліпідів (ЕРС) через 24, 48 і 72 год інкубації (* достовірність $P < 0,05$, порівняно із контролем; $n=5$)

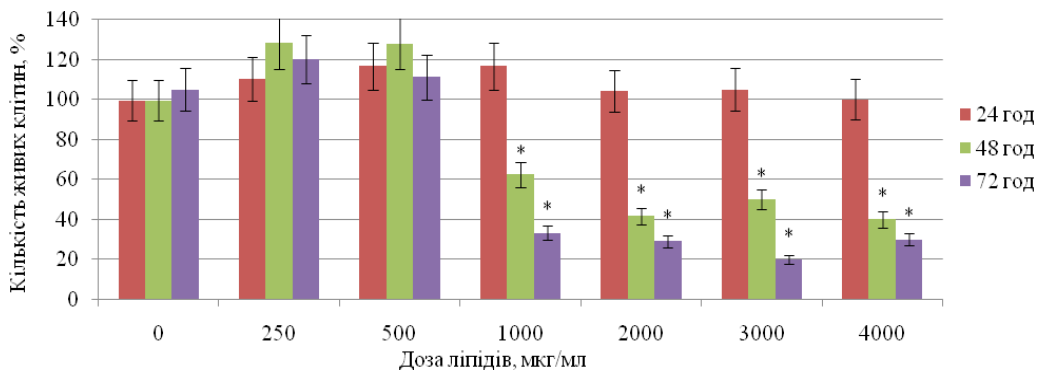


Рис. 3. Залежність чисельності культури *Paramecium caudatum* від дози ліпідів (ЕРС:DPPG – 10:1) через 24, 48 і 72 год інкубації (* достовірність $P < 0,05$, порівняно із контролем; $n=5$)

Інтерес викликає збільшення чисельності *Paramecium caudatum* за інкубації з ЕРС протягом 48 год у дозах менше 2000 мкг/мл, що може бути обумовлено використанням ЕРС клітиною як будівельного матеріалу для мембран або джерела поживних речовин [3, 20, 25].

Культивування *Paramecium caudatum* з Ls на основі суміші ЕРС:DPPG (6:5) в усіх досліджуваних концентраціях призводило до повного лізису клітин протягом 24 год. Цьому передувала вакуолізація цитоплазми (рис. 4б), набухання клітини (рис. 4в), в результаті чого відбувається укорочення поздовжньої осі клітини, розрив клітинної мембрани та

вихід вмісту клітини у зовнішнє середовище. Отримані результати вказують на те, що включення до складу Ls аніонного фосфоліпиду DPPG значно збільшує токсичний вплив Ls на *Paramecium caudatum*, що слід брати до уваги під час розробки складу Ls препаратів.



Рис. 4. Зміна морфології клітин *Paramecium caudatum* під впливом Ls на основі суміші EPC:DPPG (6:5): а – нормальна морфологія клітин; б – вакуолізація цитоплазми; в – набухання клітини та розрив клітинної мембрани (збільшення мікроскопа 100×)

Таким чином, вивчення антиоксидантної активності Ls препаратів на культурі *Paramecium caudatum* обмежується Ls із низьким вмістом аніонних фосфоліпідів (DPPG) через високу чутливість *Paramecium caudatum*.

Вивчення антиоксидантної активності ліпосомальних форм кверцетину, куркуміну та убіхінону на моделі *Paramecium caudatum*. Антиоксидантну активність Ls форм Quer, Cur і Q10 проводили після інкубації з досліджуваними препаратами протягом 24 год, оскільки, як раніше було показано (рис. 1), протягом цього часу Ls препарати не виявляють токсичного впливу на культуру *Paramecium caudatum*. Як плацебо використовували «порожні» Ls на основі EPC.

Результати дослідження антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur і Q10 представлені у табл. 1. Під дією гідроген пероксиду в контролі спостерігали уповільнення руху клітин протягом 3 хв (рис. 6 – контроль), деформацію клітин, блебінг клітинної мембрани та зупинку руху 100 % клітин (рис. 5).

Таблиця 1

Результати дослідження антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur і Q10

Препарат	Доза АФІ							
	25 мкг/мл		50 мкг/мл		75 мкг/мл		100 мкг/мл	
	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА	Час зупинки руху 100 % клітин, хв	ІБА
Контроль	8,28±0,15		8,11±0,23		8,17±0,33		8,45±0,18	
Плацебо	8,82±0,14	1,06	9,05±0,39	1,11	9,42±0,39	1,15	7,95±0,11	0,94
Ls-Quer	9,67±0,13*	1,17	10,47±0,15*	1,29	10,82±0,45*	1,32	9,83±0,15*	1,16
Ls-Cur	9,80±0,16*	1,18	9,95±0,21*	1,23	10,62±0,30*	1,30	9,48±0,19*	1,12
Ls-Q10	9,82±0,22*	1,19	9,75±0,31*	1,20	10,80±0,41*	1,32	9,08±0,15	1,07

*достовірність $P < 0,05$, порівняно із контролем; $n=5$

Усі досліджувані препарати виявили дозозалежний антиоксидантний ефект у дозах 25–75 мкг/мл ($P < 0,05$), тоді як у дозі 100 мкг/мл ефект знизився у зразках Ls-Quer та Ls-Cur ($P < 0,05$), а у Ls-Q10 не відрізнявся від контролю ($P > 0,05$), що може бути пов'язано із

високою дозою як АФІ, так і ліпідів Ls мембрани. Необхідно відмітити, що «порожні» Ls у досліджуваних дозах не забезпечували статистично достовірного збільшення часу зупинки клітин *Paramecium caudatum* порівняно з контролем ($P > 0,05$).

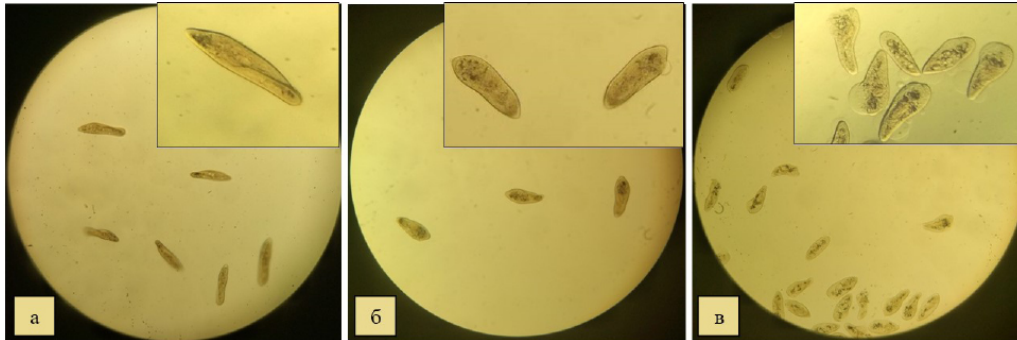


Рис.5 Зміна морфології клітин *Paramecium caudatum* під впливом гідроген пероксиду: а – нормальна морфологія клітин; б – уповільнення та набухання клітин; в – блебінг мембрани, деформація та повна зупинка клітин (збільшення мікроскопа 100×)

Ls антиоксидантні препарати виявили близький антиоксидантний ефект, при цьому підвищення стійкості *Paramecium caudatum* до дії токсиканта виявлялось не тільки у збільшенні часу повної зупинки, але й у суттєвому збільшенні часу збереження нормальної рухової активності (рис. 6).

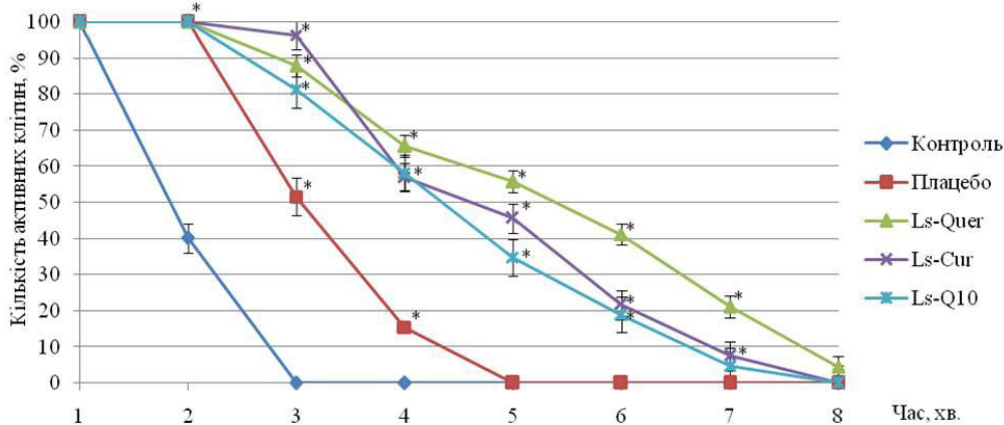


Рис. 6. Кількість клітин *Paramecium caudatum*, які зберегли рухову активність під дією гідроген пероксиду (доза досліджуваних препаратів 50 мкг/мл) (* достовірність $P < 0,05$, порівняно із контролем; $n=5$)

Отримані результати узгоджуються із даними літератури щодо вивчення *in vitro* антиоксидантних властивостей Quer, Cur та Q10 у різних лікарських формах. Вільні форми Quer (Мол. маса = 302,236) у дозі 50 мкМ та Q10 (Мол. маса = 863,34) у дозі 10 мкМ зменшували пошкодження ДНК, індуковане додаванням гідроген пероксиду, на культурі клітин слизової оболонки носа людини на 52,3 та 27,7 % відповідно [24]. Cur (Мол. маса = 368,38) та Q10 у дозі 5 мкМ пригнічували утворення активних форм кисню в культурі клітин і пов'язані з ними шляхи, що викликають розвиток остеокластогенезу [21]. Необхідно відмітити, що антиоксиданти у вільній формі мають вкрай низьку біодоступність, тому в наведе-

дених вище роботах їх використовували у високих дозах. Для підвищення біодоступності та зменшення ефективної дози АФІ синтезували хітин-глюканові комплекси Quer і Cur [27], що ефективно знижували вільнорадикальні процеси у культурі мононуклеарних клітин периферичної крові у дозі 50–100 мкг. У даній роботі Ls форми антиоксидантів виявляли антиоксидантні властивості на моделі *Paramecium caudatum* вже у дозі 25 мкг.

Таким чином, досліджено токсичність Ls форм Quer, Cur, Q10 і CytC у дозах 25-100 мкг/мл на тест-системі *Paramecium caudatum*. Встановлено, що протягом 24 год Ls форми Quer, Cur, Q10 у використовуваних дозах не виявляють токсичного впливу на культуру *Paramecium caudatum*, проте інкубація із Ls формою CytC призводить до лізису клітин. Проведено порівняння токсичності Ls на основі ЕРС та суміші ЕРС:DPPG у співвідношеннях 10:1 і 6:5 на культурі *Paramecium caudatum*. Встановлено, що включення до складу Ls мембрани аніонного фосфоліпиду DPPG призводить до збільшення токсичності для культури *Paramecium caudatum*. Проведено порівняння антиоксидантної активності Ls форм Quer, Cur, Q10 на моделі оксидативного стресу *Paramecium caudatum*: усі досліджувані препарати продемонстрували дозозалежні антиоксидантні властивості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреевская С. Н., Смирнова Т. Г., Жогина Ю. А. и др. Влияние экзогенного кардиолипина на рост и жизнеспособность *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* // Докл. Академии наук. 2010. Т. 434. № 5. С. 705–708.
2. Ващенко В. И., Хансон К. П., Шабанов П. Д. Цитохром С как лекарственное средство: прошлое, настоящее, будущее // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2005. Т. 4. № 1. С. 27–37.
3. Ипатова О. М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. М.: Изд-во ГУ НИИ Биомед. химии РАМН, 2005. 318 с.
4. Мукулович Ю. Л., Сорокоумова Г. М., Селищева А. А., Швец В. И. Антибактериальная активность экзогенных анионных фосфолипидов в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и *Escherichia coli* // Тонкие химические технологии. 2016. Т. 11. № 3. С. 64–73.
5. Пат. 2125262 РФ, МПК G01N 33/00, 33/18, C12Q 1/04. Способ биологического мониторинга экологических систем и объектов / Бузлама В.С., Ващенко Ю.Е., Востроилова Г.А., Титов Ю.Т. (РФ); № 97108740/13; Заявл. 10.06.1997; Опубл. 20.01.1999.
6. Пат. 2281507 РФ, МПК G01N 33/483. Способ оценки токсичности бактериальных антигенов / Жукова С.И., Адельшин Ф.К., Храпова Н.П. (РФ); Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; № 2004133598/15; Заявл. 20.04.2006; Опубл. 10.08.2006. Бюл. № 22, 9 с.
7. Пат. 91702 України, МПК B01F 3/00, 3/08, 3/20, 3/22. Спосіб одержання кардіопротекторного засобу на основі ліпосомальних наночастинок / Шахмаев А.Е., Горбач Т.В., Краснополяский Ю.М. (Україна); № u201401941; Заявл. 26.02.2014; Опубл. 10.07.2014. Бюл. № 13, 14 с.
8. Пат. 111762 України, МПК A61K 9/127, 47/44, 31/353, A61P 39/06, 9,10, 27,02, Спосіб отримання фармакологічно активного ліпосомального засобу, що містить кверцетин / Григор'єва Г.С., Краснополяський Ю.М., Коначович Н.Ф., Пасечнікова Н.В. (Україна); ТОВ «НАНОМЕДТРАСТ»; № a201407695; Заявл. 08.07.2014; Опубл. 10.06.2016. Бюл. № 11, 10 с.
9. Пат. 118583 України, МПК A61K 9/127, 47/44, 38/41 A61P 27/12, Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпо-

- сомальна композиція, отримана таким способом / Григор`єва Г.С., Кацай О.Г., Краснопольський Ю.М. та ін. (Україна); ТОВ «НАНОМЕДТРАСТ»; № а201610776; Заявл. 27.10.2016; Опубл. 11.02.2019. Бюл. № 3. 17 с.
10. Пилипенко Д. М., Краснопольський Ю. М. Виділення та очистка куркуміноїдів із кореневища *Curcuma Longa L.* // Укр. біофарм. журнал. 2019. Т. 4. № 61. С. 60–64.
 11. Пузырева И. Н., Огай М. А., Петров А. Ю. Экспресс-анализ биологической активности композиции из спиртоводного извлечения расторопши, астрагала и таурина // Научные ведомости. Сер. Медицина. Фармация. 2016. Т. 12 (233). № 34. С. 131–134.
 12. Смирнова Т.Г., Микулович Ю.Л., Андреевская С.Н. и др. Лизопроеизводные кардиолипина подавляют жизнеспособность чувствительного и резистентного штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Биофарм. журнал. 2011. Т. 3. № 2. С. 19–27.
 13. Степанова Э. Ф., Темірбулатова А. М., Воронова Л. С., Зилфикаров И. Н. Разработка сиропов композитного состава с фитоконпонентами адаптогенного действия // Науч. ведомости. Сер. Медицина. Фармация. 2011. Т. 22 (117). № 16/2. С. 131–137.
 14. Грутаев И. В. Экспериментальное изучение влияния синтетических олигопептидов на модели свободноживущей инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* // Укр. біофарм. журнал. 2011. Т. 5. № 16. С. 42–45.
 15. Умнова О. А. Сравнение биологической активности фитохимических композиций в нативной и липосомальных формах // Вестн. Москов. ун-та. Сер. 2 Химия. 2010. Т. 51. С. 476–484.
 16. Федоровська М. І., Половко Н. П., Стрілець О. П. Вивчення антиоксидантних властивостей дерматокосметичних засобів з рослинними субстанціями на біологічній моделі *Paramecium caudatum* // Укр. біофарм. журнал. 2018. Т. 2. № 55. С. 22–25.
 17. Швец В. И., Краснопольський Ю. М., Сорокоумова Г. М. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике. М.: Ремедиум, 2017. 200 с.
 18. Beltran-Gracia E., Lopez-Camacho A., Higuera-Ciajara I. et al. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications // Cancer Nanotechnology. 2019. Vol. 10. Article number: 11.
 19. DiNicolantonio J. J., Bhutani J., McCarty M. F., O'Keefe J. H. Coenzyme Q10 for the treatment of heart failure: a review of the literature // Open Heart. 2015. Vol. 2. N 1. e000326.
 20. Esko J. D., Nishijima M., Raetz C. R. Animal cells dependent on exogenous phosphatidylcholine for membrane biogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. N 6. P. 1698–1702.
 21. Moon H. J., Ko W. K., Han S. W. et al. Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. Vol. 418. N 2. P. 247–253.
 22. Pylypenko D., Prochorov V., Dudnichenko O., Krasnopolsky Y. Nanobiotechnological obtaining of liposomal forms of antioxidant preparations based on bioflavonoides // Scientific Journal "Science Rise" Pharmaceutical Sciences. 2019. Vol. 6. N 22. P. 11–15.
 23. Ramana K. V., Srivastava S., Singhal S. S. Lipid peroxidation products in human health and disease // Oxid. Med. Cell. Longev. 2014. Vol. 2014. 162414.
 24. Reiter M., Rupp K., Baumeister P. et al. Antioxidant effects of quercetin and coenzyme Q10 in mini organ cultures of human nasal mucosa cells // Anticancer Res. 2009. Vol. 29. N 1. P. 33–39.
 25. Ridgway N. D. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 6-th edition. Elsevier Science, 2016. P. 209-236.

26. Shimatsu A., Kakeya H., Imaizumi A. et al. Clinical application of “curcumin”, a multi-functional substance // *Anti-Aging Med.* 2012. Vol. 9. N 1. P. 43–51.
27. Singh A., Lavkush, Kureel A. K. et al. Curcumin loaded chitin-glucan quercetin conjugate: Synthesis, characterization, antioxidant, in vitro release study, and anticancer activity // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 110. P. 234–244.
28. Suezov R., Grishina P., Ponyaev A. et al. Relative cytotoxicity of complexes of platinum(II) and palladium(II) against pure cell culture *Paramecium caudatum* and human cell lines A431 and HaCaT // *Mediterr. J. Chem.* 2018. Vol. 7. N 1. P. 28–38.
29. Xu D., Hu M. J., Wang Y. Q., Cui Y. L. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application // *Molecules.* 2019. Vol. 24. N 6. 1123.

Стаття надійшла до редакції 20.05.20

доопрацьована 14.07.20

прийнята до друку 28.07.20

STUDY OF TOXICITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LIPOSOMAL ANTIOXIDANTS USING *PARAMECIUM CAUDATUM* MODEL

D. Pylypenko

*National Technical University “Kharkiv Polytechnic Institute”
2, Kyrpychov St., Kharkiv 61002, Ukraine
e-mail: pdmforwork@gmail.com*

Antioxidant drugs are actively used in medical practice for the treatment of inflammatory processes in various cardiac, ophthalmic, autoimmune, cancer and other diseases. The use of nanobiotechnological methods is a promising area of modern pharmacy, as it allows for creation of drugs of a qualitatively new level. Encapsulation of active pharmaceutical ingredients in liposomal nanoparticles makes it possible to increase the bioavailability and efficacy of natural antioxidants, to create water-soluble injectable forms of hydrophobic compounds. Biotesting is a simple, informative and rapid method to evaluate the toxicity and antioxidant activity of drugs, which can be a valid alternative to the use of laboratory animals at the screening stage. *Paramecium caudatum* is an unicellular infusoria widely used as test-object due to high sensitivity to environmental changes; big cell size, which makes it possible to monitor changes in morphology and mobility of the cells; easy cultivation.

The aim of the study is to evaluate the toxicity and antioxidant activity of liposomal forms of antioxidants: quercetin, curcumin, coenzyme Q10 and cytochrome C by biotesting method using *Paramecium caudatum*.

The toxicity of liposomal forms of quercetin, curcumin, coenzyme Q10 and cytochrome C at doses of 25–100 µg/ml using *Paramecium caudatum* was studied. Incubation of *Paramecium caudatum* with liposomal forms of quercetin, curcumin and coenzyme Q10 led to growth of the cell culture, whereas liposomal cytochrome C caused cell lysis within 24 hours. It is established that toxicity of liposomal preparation is influenced by its lipid composition. Incorporation of anionic phospholipid (dipalmitoylphosphatidylglycerol) in lipid membrane significantly reduces the survival of the test culture compared with liposomes containing only phosphatidylcholine. In the model of oxidative stress induced in *Paramecium caudatum* by hydrogen peroxide, liposomal forms of quercetin, curcumin and coenzyme Q10 demonstrated dose-dependent antioxidant effects, which resulted in tolerance increasing of the test culture to the toxicant.

Keywords: liposomal antioxidants, toxicity, antioxidant activity, biotesting, *Paramecium caudatum*