



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 152744

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2022 03484	(72) Винахідник(и):	Яворовський Олександр Петрович (UA), Зазуляк Тетяна Степанівна (UA), Остапів Дмитро Дмитрович (UA), Рябовол Василь Миколайович (UA), Демецька Олександра Віталіївна (UA)
(22) Дата подання заявки:	21.09.2022	(73) Володілець (володільці):	НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бульв. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	06.04.2023		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	05.04.2023, Бюл.№ 14		

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ НАНОМАТЕРІАЛІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ЯК ТЕСТ-ОБ'ЄКТА СПЕРМАТОЗОЇДІВ КНУРІВ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб оцінки токсичності наноматеріалів з використанням як тест-об'єкта сперматозоїдів кнурів in vitro включає приготування досліджуваного та контрольного зразків з подальшим визначенням виживання сперматозоїдів. Отримані еякуляти кнурів розбавляють фосфатно-сольовим буфером 1:10, поділяють на контрольну та дослідну частини і вносять в дослідні зразки наноматеріали в дозах 1/100 LD₅₀, 1/10 LD₅₀, LD₅₀ з подальшим визначенням показників виживання сперматозоїдів до припинення прямолінійного поступального руху за температури 18-20 °С, дихальної активності, активності сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази, за зміною яких, порівняно з показниками контрольних зразків, оцінюють токсичність наноматеріалів.

UA 152744 U

UA 152744 U

Корисна модель належить до медицини, а саме проведення токсиколого-гігієнічних досліджень щодо оцінки небезпеки наноматеріалів для осіб, які працюють у галузі нанотехнологій, та населення, і може бути використана для подальших досліджень біологічної дії наноматеріалів.

Необхідність постійного вдосконалення альтернативних методів тестування токсичності наноматеріалів *in vitro* визначається високою швидкістю розвитку нанотехнологій, а сучасні альтернативні методи тестування речовин хімічного та біологічного походження, в тому числі й наноматеріалів, у багатьох випадках мають стати заміною загальноприйнятим токсикологічним дослідом на лабораторних тваринах. Сучасні альтернативні методи тестування речовин хімічного та біологічного походження, у тому числі й наноматеріалів, у багатьох випадках мають стати заміною загальноприйнятим токсикологічним дослідом на лабораторних тваринах. В дослідженнях потенційної небезпеки наноматеріалів *in vivo*, крім ссавців, використовуються різноманітні об'єкти, зокрема комахи (медоносні бджоли *Apis mellifera*), риби (*Danio rerio*) тощо. Натомість скринінгова оцінка наноматеріалів у методах *in vitro* дозволяє не тільки отримати попередню інформацію щодо потенційної небезпеки, а й також є доцільною з позицій біоетики. В методах *in vitro* застосовують нормальні (фібробласти легень людини) та трансформовані (клітини раку печінки людини) культури клітин людини, культури клітин тварин (первинні гепатоцити шурів), а також статеві клітини людини та тварин.

Вибір як тест-об'єкта сперматозоїдів зумовлений тим, що, незважаючи на порівняно короткий (до декількох діб) період життя, біологічні особливості сперматозоїдів (плазматична мембрана і акросома, що є ліпопротеїдними і глікопротеїдними утвореннями, щільність упаковки білків і нуклеїнових кислот в ядрі, малий вміст води, низький рівень метаболізму в нерухомому стані) зумовлюють велику стійкість до зовнішніх впливів. Водночас сперматозоїди більш чутливі до оксидативного стресу, ніж інші клітини, через велику кількість поліненасичених жирних кислот, які легко піддаються пероксидному окисненню, незначну кількість цитоплазми, що містить низьку концентрацію ДНК-відновлювальних систем та антиоксидантних ензимів, які виявляються нездатними захистити клітинну мембрану на рівні хвоста і акросоми. Вплив токсичних сполук, зокрема наноматеріалів, негативно впливає на сперматозоїди, зумовлюючи зниження їх дихальної активності, порушення активності мітохондріальних ензимів та ресинтез аденозинтрифосфату, що у кінцевому підсумку відбивається на зниженні їх виживання.

Відомий спосіб визначення токсичності наноматеріалів у розчинах *in vitro* з використанням сперматозоїдів великої рогатої худоби як тест-об'єкта [1], який вибраний як найближчий аналог. Спосіб включає приготування досліджуваного та контрольного зразків з подальшим визначенням виживання сперматозоїдів за величиною індексу токсичності (It) на підставі відношення параметрів рухливості суспензії сперматозоїдів великої рогатої худоби в досліджуваному та контрольному зразках. При цьому використовують сперматозоїди бугая у гранулах, що потребує їх розморожування за певних умов. Цей спосіб надає можливість отримати лише попередню інформацію щодо цитотоксичності досліджуваних матеріалів, але не дозволяє оцінювати вплив наноматеріалів на фізіолого-біохімічні характеристики тест-об'єкта. Крім цього, потребує застосування дороговартісного обладнання "Аналізатора зображень АТ-05".

Вибір сперматозоїдів кнурів як тест-об'єкта зумовлений тим, що вони є більш доступними в економічному аспекті, тож актуальною є розробка скринінгового методу визначення токсичності та пошкоджувальної дії наноматеріалів *in vitro* з використанням як тест-об'єкта статевих клітин кнурів, який не потребує дороговартісного та рідкісного обладнання.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб оцінки токсичності наноматеріалів з використанням як тест-об'єкта сперматозоїдів кнурів *in vitro* шляхом вибору складу та концентрації буферу для інкубування сперматозоїдів, доз наноматеріалу та фізіолого-біохімічних показників сперматозоїдів, що забезпечує високу достовірність оцінки токсичного впливу наноматеріалів на біологічні об'єкти та не потребує дороговартісного та рідкісного обладнання.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі оцінки токсичності наноматеріалів з використанням як тест-об'єкта сперматозоїдів кнурів *in vitro* включає приготування досліджуваного та контрольного зразків з подальшим визначенням виживання сперматозоїдів, згідно з корисною моделлю, отримані еякуляти кнурів розбавляють фосфатно-сольовим буфером 1:10, поділяють на контрольну та дослідну частини і вносять в дослідні зразки наноматеріали в дозах 1/100 LD₅₀, 1/10 LD₅₀, LD₅₀ з подальшим визначенням показників виживання сперматозоїдів до припинення прямолінійного поступального руху за температури 18-20 °С, дихальної активності, активності сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази, за зміною яких, порівняно з показниками контрольних зразків, оцінюють токсичність наноматеріалів.

В конкретних варіантах виконання:

як фосфатно-сольовий буфер використовують NaCl -0,8 г, KCl -0,02 г, Na_2HPO_4 -0,11 г, KH_2PO_4 -0,02 г, MgCl_2 -0,01 г, вода дистильована - до 100 мл;

дихальну активність визначають полярографічно в термостатованій комірці за температури 38,5 °С з вмонтованим електродом Кларка;

активність сукцинатдегідрогенази визначають за вмістом утвореного продукту реакції червоного кольору - червоного формазану впродовж 2 год. інкубування за температури 38,5 °С;

активність цитохромоксидази визначають за вмістом утвореного продукту реакції синього кольору - індофенолового синього впродовж 1 год. інкубування за температури 38,5 °С.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Для оцінки токсичності наноматеріалів використовують свіжоотримані мануальним методом еякуляти кнурів з визначеними фізіологічними показниками: об'ємом і концентрацією сперматозоїдів підрахунком в камері Горяєва. Для досліджень кожен еякулят розбавляють 1:10 фосфатно-сольовим буфером NaCl -0,8 г, KCl -0,02 г, Na_2HPO_4 -0,11 г, KH_2PO_4 -0,02 г, MgCl_2 -0,01 г, вода дистильована - до 100 мл і ділять на дві частини: контрольну, без додавання наноматеріалу, та дослідну, з додаванням наноматеріалу.

Дози діючих речовин в зразках сперми вибирають з врахуванням встановлених параметрів гострої токсичності для теплокровних тварин, відповідно до чого у зразки вносять наноматеріали в дозах 1/100 LD_{50} , 1/10 LD_{50} і LD_{50} , розрахованих на мл сперми. В зразках визначають наступні показники: виживання сперматозоїдів впродовж години за температури 18-20 °С до припинення прямолінійно поступального руху; дихальну активність - полярографічно в нг-атом $\text{O}_2/\text{хв} \times 0,1$ мл сперми в термостатованій комірці за температурою 38,5 °С з вмонтованим електродом Кларка; активність сукцинатдегідрогенази в од/год. $\times 0,1$ мл сперми і цитохромоксидази в од/год. $\times 0,1$ мл сперми [2]. Проявом токсичної дії є зниження дихальної активності сперматозоїдів зі збільшенням дози наноматеріалу порівняно з контролем, порушення активності сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази і, відповідно, ресинтезу аденозинтрифосфату, що супроводжується зниженням фізіологічних функцій клітин, а саме зниженням їх виживання у середовищі.

Конкретний приклад.

Для оцінки токсичності наноматеріалів використовують свіжоотримані мануальним методом еякуляти кнурів з визначеними фізіологічними показниками: об'ємом і концентрацією сперматозоїдів підрахунком в камері Горяєва. Для досліджень кожен еякулят розбавляли 1:10 фосфатно-сольовим буфером NaCl -0,8 г, KCl -0,02 г, Na_2HPO_4 -0,11 г, KH_2PO_4 -0,02 г, MgCl_2 -0,01 г, вода дистильована - до 100 мл і ділили на частини: контрольну, без додавання наноматеріалів, і дослідну - з додаванням наноматеріалів діоксиду титану. Використовували наступні наноматеріали: TiO_2 (ІПМ ім. І.М. Францевича, далі - ІПМ), TiO_2 (Acros Organics, Франція) і композити з наночастинками срібла - 4 % Ag-TiO_2 (з масовою часткою Ag 4 %, ІПМ), 8 % Ag-TiO_2 (з масовою часткою Ag 8 %, ІПМ). Дози діючих речовин в зразках сперми вибирали з врахуванням встановлених параметрів гострої токсичності для теплокровних тварин, а безпосередньо у гострому експерименті на мишах шляхом внутрішньоочеревинного введення було встановлено, що для нанопорошку TiO_2 , виробництва "Acros Organics", LD_{50} перевищує 11000 мг/кг; для нанопорошку TiO_2 , виробництва ІПМ ім. І.М. Францевича, LD_{50} дорівнює 4783,30 мг/кг, для нанопорошку Ag-TiO_2 з масовою часткою Ag 4 % LD_{50} становить 724,44 мг/кг, а введення нано- TiO_2 з масовою часткою Ag 8 % того ж виробника в дозі 1000 мг/кг призводило до загибелі всіх тварин в статистичній групі. Дослідні зразки сперми експонували наноматеріалами діоксиду титану в дозах 1/100 LD_{50} , 1/10 LD_{50} і LD_{50} , розрахованих на мл сперми. У контрольних та дослідних зразках визначали наступні показники: виживання сперматозоїдів впродовж години за температури 18-20 °С - до припинення прямолінійно поступального руху; дихальну активність - полярографічно в нг-атом $\text{O}_2/\text{хв} \times 0,1$ мл сперми в термостатованій комірці за температури 38,5 °С з вмонтованим електродом Кларка; активність сукцинатдегідрогенази в од/год. $\times 0,1$ мл сперми і цитохромоксидази в од/год. $\times 0,1$ мл сперми. Аналіз результатів досліджень проведено методами варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2010. Дані представляли як середнє значення $\pm$ довірчий інтервал при довірчому рівні 95 %. Різницю між контрольними та дослідними даними вважали достовірною при $p < 0,05$. Нанопорошки діоксиду титану різних виробників, а також із різним ступенем доповненості наносріблом (4 та 8 % Ag) чинять пошкоджуючу дію на статеві клітини кнурів, яка характеризується зниженням дихальної активності сперматозоїдів, порушенням активності сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази і, відповідно, ресинтезом аденозинтрифосфату, що супроводжується зниженням фізіологічних функцій клітин - зниженням виживання їх у середовищі.

Джерела інформації:

1. Патент України на корисну модель № 101308, опубл. 10.09.2015, бюл. № 17/2015. Експрес-спосіб визначення токсичності наноматеріалів у розчинах *in vitro* з використанням сперматозоїдів великої рогатої худоби як тест-об'єкта // Демецька О.В., Леоненко Н.С. Заявник і власник ДУ "Інститут медицини праці НАМН України".
2. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / Влізло В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б. та ін. за ред. В.В. Влізла - Львів: Сполом, 2012. - 764 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб оцінки токсичності наноматеріалів з використанням як тест-об'єкта сперматозоїдів кнурів *in vitro*, що включає приготування досліджуваного та контрольного зразків з подальшим визначенням виживання сперматозоїдів, який **відрізняється** тим, що отримані еякуляти кнурів розбавляють фосфатно-сольовим буфером 1:10, поділяють на контрольну та дослідну частини і вносять в дослідні зразки наноматеріали в дозах 1/100 LD₅₀, 1/10 LD₅₀, LD₅₀ з подальшим визначенням показників виживання сперматозоїдів до припинення прямолінійного поступального руху за температури 18-20 °С, дихальної активності, активності сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази, за зміною яких, порівняно з показниками контрольних зразків, оцінюють токсичність наноматеріалів.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як фосфатно-сольовий буфер використовують: NaCl - 0,8 г, KCl - 0,02 г, Na₂HPO₄ - 0,11 г, KH₂PO₄ - 0,02 г, MgCl₂ - 0,01 г, вода дистильована - до 100 мл.
3. Спосіб за будь-яким з пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що дихальну активність визначають полярографічно в термостатованій комірці за температури 38,5 °С з вмонтованим електродом Кларка.
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що активність сукцинатдегідрогенази визначають за вмістом утвореного продукту реакції червоного кольору - червоного формазану, впродовж 2 год. інкубування за температури 38,5 °С.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що активність цитохромоксидази визначають за вмістом утвореного продукту реакції синього кольору - індофенолового синього, впродовж 1 год. інкубування за температури 38,5 °С.