



**ПІВДЕННОУКРАЇНСЬКИЙ
МЕДИЧНИЙ
НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ**

Науковий журнал

29 квітень 2021

Одеса
2021

ISSN 2306-7772

Науковий журнал

Південноукраїнський медичний науковий журнал

29 квітень 2021

Виходить тричі на рік.

Редактор, коректор – Мельбрун А. Я.

Верстка-дизайн – Канавка С. А.

Відповідальність за підбір, точність наведених на сторінках журналу фактів, цитат, статистичних даних, дат, прізвищ, географічних назв та інших відомостей, а також за розголошення даних, які не підлягають відкритій публікації, несуть автори опублікованих матеріалів. Редакція не завжди поділяє позицію авторів публікацій. Матеріали публікуються в авторській редакції. Передрукування матеріалів, опублікованих у журналі, дозволено тільки зі згоди автора та видавця. Будь-яке використання – з обов'язковим посиланням на журнал.

Свідоцтво про державну реєстрацію: КВ № 19536-9336Р від 26.11.2012 р.

Засновник журналу: ГО «Південна фундація медицини»

© ГО «Південна фундація медицини», 2021

© Автори наукових статей, 2021

© Оформлення Ткаченко М. С., 2021

Демецька О. В.
кандидат біологічних наук,
доцент кафедри медицини праці, психофізіології та медичної екології
Національного університету охорони здоров'я України
імені П. Л. Шупика

Діденко М. М.
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
ДУ «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва
Національної академії медичних наук України»

Мовчан В. О.
науковий співробітник
ДУ «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва
Національної академії медичних наук України»

Белюга О. Г.
кандидат хімічних наук,
провідний інженер
ДУ «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва
Національної академії медичних наук України»

Рябовол В. М.
аспірант кафедри гігієни та екології № 2
Національного медичного університету імені О. О. Богомольця

Леоненко О. Б.
доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник
ДУ «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва
Національної академії медичних наук України»

СКРИНІНГОВА ОЦІНКА ПОШКОДЖУЮЧОЇ ДІЇ НАНОМАТЕРІАЛІВ З ВИКОРИСТАННЯМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЯК ТЕСТ-ОБ'ЄКТУ

Анотація: Стаття присвячена проблемі медико-біологічних досліджень наноматеріалів. Скринінгова оцінка нових матеріалів у методах *in vitro* дозволяє отримати попередню інформацію щодо потенційної небезпеки, а також є доцільною з позицій біоетики. Запропоновано спосіб стабілізації нанопорошків металів та їх похідних, а також проведено виявлення пошкоджуючої дії наноматеріалів шляхом оцінки перекисного окиснення мембранних ліпідів сперматозоїдів бика *in vitro*. Встановлено, що комплекс оксиду титану, допованого сріблом, та нанопорошок діоксиду титану у концентраціях 3 мг/мл ініціюють патологічні зміни у сперматозоїдах великої рогатої худоби (бика), що є маркерами оксидативного стресу, при цьому патологічна дія наноконкомпозиту $\text{TiO}_2 + \text{Ag}$ є більш вираженою.

Аннотация: Статья посвящена проблеме медико-биологических исследований наноматериалов. Скрининговая оценка новых материалов в методах *in vitro* позволяет получить предварительную информацию о потенциальной опасности, а также целесообразна с позиций биоэтики. Предложен способ стабилизации нанопорошков металлов и их производных, а также проведено выявление повреждающего действия наноматериалов путем оценки перекисного окисления мембранных липидов сперматозоидов быка *in vitro*. Установлено, что комплекс оксида титана, допированного серебром, и нанопорошок диоксида титана в концентрациях 3 мг / мл инициируют патологические изменения в сперматозоидах крупного рогатого скота (быка), которые являются маркерами оксидативного стресса, при этом патологическое действие наноконкомпозита $\text{TiO}_2 + \text{Ag}$ более выражено.

Summary: The article is devoted to the problem of medical and biological research of nanomaterials. Screening evaluation of new materials *in vitro* allows to obtain preliminary information on the potential hazard, and is also appropriate from the standpoint of bioethics. A method for stabilizing metal nanopowders and their derivatives is proposed, and the damaging effect of nanomaterials is detected by evaluating the peroxidation of membrane lipids of bull sperm *in vitro*. It was found that the complex of titanium oxide doped with silver and nanopowder of titanium dioxide at concentrations of 3 mg / ml initiate pathological changes in bovine sperm (bull), which are markers of oxidative stress, while the pathological effect of $\text{TiO}_2 + \text{Ag}$ nanocomposite is more pronounced.

Вступ. Через економічний потенціал комерціалізація різних типів наноматеріалів для широкого спектра застосувань, включаючи промислову, споживчу, медичну та діагностичну сферу, являє собою проблему для компаній і регулюючих органів щодо забезпечення розробки безпечних та ефективних продуктів для споживачів. Тому оцінка потенційних небезпек, пов'язаних з цією технологією і відповідними продуктами, стала новою областю для оцінки ризику для здоров'я. Розуміння цього є елементом широкого процесу взаємодії із зацікавленими сторонами та потенційними клієнтами щодо питань гігієни навколишнього середовища та безпеки людей.

Протягом останніх 10 років було запропоновано кілька дослідницьких стратегій і завдань для прямої «перевірки», тобто безпечного поводження з окремими формами наночастинок і нанотехнологій в цілому [1].

При цьому основна проблема полягає у тому, що всі наночастинок не можуть бути своєчасно ефективно оцінені на предмет безпеки і впливу на навколишнє середовище через:

- 1) велику кількість різних типів наночастинок;
- 2) численні варіації всередині конкретних типів наночастинок (наприклад, існує безліч різних нанорозмірних вуглецевих частинок: частинки сажі, фулерени, одностінні вуглецеві нанотрубки, багатостінні вуглецеві нанотрубки, вуглецеві нановолокна та ін.);
- 3) значні матеріальні витрати, що є необхідними для адекватного тестування кожного окремого типу наночастинок.

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, у тому числі й наноматеріалів, у багатьох випадках мають стати заміною загальноприйнятими токсикологічним дослідям на лабораторних тваринах.

Скринінгова оцінка нових матеріалів у методах *in vitro* дозволяє отримати попередню інформацію щодо потенційної небезпеки, а також є доцільною з позицій біоетики. Тому розробка наукових підходів до експрес-оцінки небезпечності нанорозмірних об'єктів різної хімічної природи та складу є одним з пріоритетних завдань сучасної експериментальної медицини, що дозволить отримати нові дані щодо особливостей токсичної дії наноматеріалів та сприятиме уточненню механізмів пошкоджуючої дії на організм нанорозмірних об'єктів, удосконаленню оцінки їх небезпечного впливу.

Головною перевагою більшості досліджень *in vitro* є можливість проводити тестування великого масиву об'єктів, а також можливість оцінки їх прямої токсичної дії на клітину (мішень), до того ж отримані дані можна використовувати для аналізу механізму токсичної дії. Слід зазначити, що токсичність наночастинок зумовлена, насамперед, розвитком оксидативного стресу,

перекисним окисненням мембран з подальшим збільшенням їх проникності, порушенням функцій та руйнуванням [2].

Необхідність постійного удосконалення методів *in vitro* тестування наночастинок обумовлюється високою швидкістю розвитку сучасних нанотехнологій, які постійно представляють все нові об'єкти. Вибір як тест-об'єкту сперматозоїдів обумовлений тим, що незважаючи на порівняно короткий (до декількох годин) період життя, їх біологічні особливості (плазматична мембрана і акросома, що представляють собою ліпопротеїдні та глікопротеїдні утворення, щільність упаковки білків і нуклеїнових кислот в ядрі, малий вміст води, низький рівень метаболізму в нерухомому стані) зумовлюють велику стійкість до зовнішніх впливів. У той же час, сперматозоїди більш чутливі до оксидативного стресу, ніж інші клітини, через велику кількість поліненасичених жирних кислот, які легко піддаються перекисному окисненню, незначну кількість цитоплазми, що містить низьку концентрацію ДНК-відновлювальних систем та антиоксидантних ензимів, які виявляються недостатніми захистити клітинну мембрану на рівні хвоста і акросоми. Накопичення перекисів ліпідів у тканинах супроводжується руйнуванням молекулярної структури клітинних мембран, найважливішими компонентами яких є фосfolіпіди. Інтенсифікація процесів перекисного окислення ліпідів залежить від ступеня пошкодження мембран сперматозоїдів.

Отже, мета роботи полягала у визначенні ефектів токсичної дії наноматеріалів за показниками оксидативного стресу в експрес-методі *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень. В дослідженні використовували комплекс оксиду титану, допованого сріблом (наноккомпозит $\text{TiO}_2 + \text{Ag}$, масова частка $\text{Ag} \sim 4 \text{ мас. \%}$), а також нанопорошок оксиду титану (TiO_2), синтезованого методом термічного розкладу.

Розмір частинок визначали методом динамічного розсіювання світла за допомогою приладу DinaSizer («Fritsch», Німеччина).

Оптичну густину фосfolіпідів визначали за допомогою приладу спектрофотометр ULAB 101UV (робочий діапазон довжин хвиль – 325–1000 нм).

Для морфологічних досліджень дефектів сперматозоїдів при дії нанопорошку TiO_2 та композиту $\text{Ti} + \text{Ag}$ готували мазки замороженого еякуляту шляхом рівномірного розподілення краплі біорідини на предметному склі, висушували на повітрі та фіксували етанолом протягом однієї хвилини. Фарбування мазків проводили за методикою Лефлера метиленовим синім. Пофарбовані препарати аналізували з імерсією під об'єктивом $\times 1000$.

Отримані результати досліджень статистично обробляли методами варіаційної статистики з використанням пакету програм Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Для дослідження потенційної пошкоджуючої дії наноматеріалів необхідно було розробити спосіб стабілізації нанопорошків металів та їх похідних у водних розчинах для наступного використання у біомедичних

дослідженнях *in vitro* та *in vivo*. Як відомо, для стабілізації наноматеріалів у розчинах використовують органічні та неорганічні сполуки, що забезпечують отримання колоїдних розчинів різного ступеню стійкості. Токсичність композиції визначається не тільки токсичністю діючої речовини (наприклад, наночастинок металу), а також стабілізуючих або інших допоміжних компонентів, що можуть вплинути на біологічну активність отриманого розчину. Принциповим аспектом був пошук стабілізатора, який не тільки не буде підвищувати показники токсичності вихідного наноматеріалу, а й забезпечить «комфортне» середовище для деяких тест-об'єктів, зокрема, сперматозоїдів великої рогатої худоби, які використовують у скринінгових дослідженнях цитотоксичності наноматеріалів.

В якості стабілізатора запропоновано глюкозо-цитратний буфер (глюкоза (4 г), натрію цитрат (1 г) у 100 мл дистильованої води), що зазвичай застосовують в експрес-методі визначення токсичності наноматеріалів у розчинах з використанням сперматозоїдів великої рогатої худоби як тест-об'єкту для розморожування сперми, а також в якості контрольного розчину [3]. Встановлено, що середній аеродинамічний діаметр частинок нанокompозиту TiO_2+Ag у фізіологічному розчині становив 677,7 нм, у глюкозо-цитратному буфері (глюкоза та натрію цитрат у співвідношенні 4 : 4) – 718 нм, тоді як при використанні глюкозо-цитратного буферу зі співвідношенням глюкози та натрію цитрату 4 : 1 – 43,9 нм (на другу добу – 53,37 нм). Своєю чергою, розмір частинок нанопорошку оксиду титану (TiO_2), синтезованого методом термічного розкладу, у фізіологічному розчині виміряти не вдалося через агломерацію наночастинок. Натомість у глюкозо-цитратному буфері зі співвідношенням глюкози та натрію цитрату 4:1 середній аеродинамічний діаметр частинок становив 46,84 нм.

Таким чином, запропонований стабілізатор дозволяє отримувати відносно стабільні гідрозолі нанопорошків металів, уникаючи при цьому небажаного впливу на токсичність вихідного наноматеріалу. Це своєю чергою, надало можливість оцінити пошкоджуючу дію досліджуваних зразків наноматеріалів (нанокompозиту TiO_2+Ag із середнім аеродинамічним діаметром частинок у розчині 43,9 нм, та TiO_2 із середнім аеродинамічним діаметром

частинок 46,84 нм), які було стабілізовано глюкозо-цитратним буфером. В якості скринінгового методу визначення токсичності та пошкоджуючої дії наноматеріалів *in vitro* з використанням як тест-об'єкту сперматозоїдів великої рогатої худоби (бика) було адаптовано та використано відомий метод вилучення фосфоліпідів з мозку щурів [4]. Замість мозку щурів використовували заморожену бичачу сперму (гранули), які відтаювали у глюкозо-цитратному буфері (співвідношення глюкози та натрію цитрату 4 : 1) у термостаті при температурі 37 °C протягом 90 хв. До дослідного розчину на початку відтаювання додавали 3 мг нанопорошку в 1 мл глюкозо-цитратного буферу. Наприкінці отриманий фосфоліпідний екстракт дослідної та контрольної проби досліджували на спектрофотометрі ULAB 101 UV. Визначення оптичної густини отриманих фосфоліпідних екстрактів при довжині хвилі 540 нм свідчить на користь руйнування молекулярної структури мембран сперматозоїдів, що були експоновані наноматеріалами, та вивільнення фосфоліпідів.

З цього приводу слід зазначити, що саме накопичення перекисів ліпідів в тканинах супроводжується руйнуванням молекулярної структури мембран, найважливішими компонентами яких є фосфоліпіди. Відповіддю статевої клітини на стрес є порушення низки найважливіших біохімічних процесів, в тому числі і функціонування мембранних структур, а також активація «суїцидальної» програми – апоптозу. Апоптоз характеризується цілим набором постадійних специфічних біохімічних змін, що відбуваються як в ядрі, так і в клітинній мембрані сперматозоїда, серед яких, зокрема, зміни в динаміці фосфоліпідів [5, 6].

Отримані результати кореспондують із даними морфологічного аналізу аномалій сперматозоїдів, експонованих досліджуваними наноматеріалами: частка їх дефектів була значно більшою у дослідних зразках (61% при впливі нанокompозиту TiO_2+Ag та 39% при впливі TiO_2) порівняно із контролем (20%) (Табл.1). При оцінці головки сперматозоїдів було зазначено її набряк та відсутність акросомальної області, яка частіше виявлялась у всіх спостереженнях. Дефекти хвоста сперматозоїдів характеризувалися його вкороченням, закрученням та набряком, що вказує на їх низьку рухливість. Крім цього визначалася агрегація

Таблиця 1

Частка морфологічних аномалій сперматозоїдів при дії наноматеріалів

Морфологічні аномалії сперматозоїдів	Контроль, %	TiO_2 , %	$\text{Ti}+\text{Ag}$, %
Дефекти головки	3	6	11
Відсутність акросоми	12	21	23
Дефекти середньої частини	відсутні	5	9
Дефекти хвоста	5	7	18
Частка аномалій	20	39	61
Частка нормальних сперматозоїдів	80	61	39

сперматозоїдів (їх скупчення), що додатково свідчить про їх патологічний стан.

Після експозиції сперматозоїдів наноконкомпозитом TiO_2+Ag виявлено значну кількість залишкових тілець, що є результатом загибелі клітин. Зазначені зміни, поряд із виявленими аномаліями сперматозоїдів, свідчать на користь більш вираженого патологічного впливу наноконкомпозиту TiO_2+Ag .

Таким чином, запропонований експрес-спосіб може бути використаний в якості скринінгового при дослідженнях наноматеріалів *in vitro*.

Висновки

1. Запропоновано стабілізатор (глюкоза (4 г), натрію цитрат (1 г) у 100 мл дистильованої води),

який дозволяє отримувати відносно стабільні гідрозолі нанопорошків металів, уникаючи при цьому небажаного впливу на токсичність вихідного наноматеріалу.

2. Встановлено, що комплекс оксиду титану, допованого сріблом (наноконкомпозит TiO_2+Ag , масова частка $\text{Ag} \sim 4\text{мас.}\%$), та нанопорошок TiO_2 у концентраціях 3 мг/мл ініціюють патологічні зміни у сперматозоїдах великої рогатої худоби (бика), що є маркерами оксидативного стресу (аномалії головки, середньої частини та хвоста, а також відсутність акросоми тощо), при цьому патологічна дія наноконкомпозиту TiO_2+Ag є більш вираженою.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Warheit D.B. Hazard and risk assessment strategies for nanoparticle exposures: how far have we come in the past 10 years? *F1000Res.* – 2018. – № 7. – P. 376.
2. Horie M. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity // *M. Horie, Y. Tabei // Free Radic. Res.* 2020. – № 18. – P. 1–12.
3. Патент України № 101308 на корисну модель. Експрес-методи 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 Державна Установа «Інститут медицини праці Національної Академії Медичних Наук України». – Заявка № u201412531; заявл. 19.12.2014; опубл. 10.09.2015, Бюл. № 17.
4. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley // *J. Biol. Chem.* – 1957. № 1. – P. 497–509.
5. Kudriavtsev I.V. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology / I.V. Kudriavtsev, A.S., Golovkin Zurochka A.V. // *Medical Immunology.* – 2012. – № 14. – P. 461–482.
6. Dutta S. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management / S. Dutta, A. Majzoub, A. Agarwal // *Arab. J. Urol.* – 2019. – V.17, № 2. – P. 87–97.