Наукове періодичне видання

МЕДИЧНИЙ ФОРУМ

Науковий журнал

23 (23) 2021

Львів
2021

Наукове періодичне видання

Медичний форум

Науковий журнал

23 (23) 2021

Редактор, коректор – Римарчук Л.Г.
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 в журналі, дозволено тільки зі згоди автора та видавця. Будь-яке використання – з обов'язковим посиланням на журнал.

Свідоцтво про державну реєстрацію: КВ № 20513-10313Р від 20 грудня 2013 р.
Засновник журналу: «Львівська медична спільнота»

Видавник: «Львівська медична спільнота»
79000, м. Львів, а/с 6153
www.medicinelviv.org.ua
E-mail: journal@medicinelviv.org.ua
Телефон: +38 099 415 06 39

© «Львівська медична спільнота», 2021
© Автори наукових статей, 2021
© Оформлення Яковенко С.А., 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»

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

Мовчан В. О.
науковий співробітник
ДУ «Інститут медицини праці імені Ю. І. Кундієва»

СКРИНІНГОВА ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ЗВАРЮВАЛЬНИХ МАТЕРІАЛІВ З ВИКОРИСТАННЯМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ БИКА ЯК ТЕСТ-ОБ'ЄКТУ

Ст ттю присвячено проблемі медико-біологічних досліджень зв рюв льних ерозолів. Скринінгов оцінк нових м тері лів у метод х in vitro дозволяє отрим ти попередню інформ цію щодо потенційної небезпеки, т кож є доцільною з позицій біоетики. З пропонов но спосіб ст біліз ції н норозмірних фр кцій твердої скл дової зв рюв льних ерозолів, т кож оцінено їх цитотоксичність в експрес-методі in vitro з використ нням сперм тозоїдів бик .

Ключові слова: зв рюв льні м тері ли, цитотоксичність, н ноч стинки.

Ст тья посвящен проблеме медико-биологических исследов ний св рочных эрозолей. Скринингов я оценк новых м тери лов в метод х in vitro позволяет получить предв рительную информ цию о потенци льной оп сности, т кже целесообр зн с позиций биоэтики. Предложен способ ст билиз ции н нор змерных фр кций твердой сост вляющей св рочных эрозолей, т кже оценен их цитотоксичность в экспресс-методе in vitro с использов нием сперм тозоидов бык .

Ключевые слова: св рочные м тери лы, цитотоксичность, н ноч стицы.

The article is devoted to the problem of medical and biological research of welding aerosols. 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 nanosized fractions of the solid component of welding aerosols is proposed, and their cytotoxicity is evaluated in the express method in vitro using bull sperm.

Key words: welding materials, cytotoxicity, nanoparticles.

Вступ. Створення нових марок зварювальних матеріалів з поліпшеними гігієнічними характеристиками повинно супроводжуватись як гігієнічними, так і токсикологічними дослідженнями Для оцінювання токсичної дії малорозчинних промислових аерозолів, у тому числі, зварювальних, найбільше значення має така їхня ключова властивість, як цитотоксичність, що визначає небезпеку виникнення професійно обумовленої патології органів дихання [1]. Цитотоксичність як властивість частинок пилу (аерозолю) є визначальним фактором для оцінки ступеня його дії на організм людини та математичного прогнозування порівняльної небезпеки розвитку пневмоконіозів. Вона визначає кінетику накопичення й затримки пилу в легенях і лімфовузлах людини, а також інтенсивність шкідливої дії на тканину цих органів. Цю характеристику оцінюють у різних короткочасних тестах, що пов'язано з пануючими уявленнями про ключову роль пошкодження пиловими частинками макрофагів у патогенезі силікозу та інших видів пневмоконіозу. Використовуються також тести, засновані на реєстрації феноменів активації макрофагів, або на тому чи іншому поєднанні цих явищ. Необхідність постійного вдосконалення альтернативних методів тестування токсичності зварювальних аерозолів (ЗА) in vitro визначається також тим фактом, що емісією наночастинок в повітря робочої зони можуть супроводжуватися як виробничі процеси, кінцевим продуктом яких є власне наноматеріали (електронно-променевий синтез у вакуумі, механосинтез, хімічний синтез тощо), так і процеси, що не пов'язані з нанотехнологіями, зокрема, електрозварювання [2]. Своєю чергою, протягом останніх років накопичено достатньо експериментальних даних, які свідчать про те, що речовинам у нанодіапазоні притаманна більша біологічна активність та пошкоджуюча дія [3]. Отже, існує необхідність вдосконалення альтернативних методів тестування потенційної небезпеки нових зварювальних матеріалів, зокрема, з використанням підходів, що застосовуються при скринінговій оцінці наноматеріалів.

Сучасні альтернативні методи тестування речовин хімічного та біологічного походження, у тому числі, й наноматеріалів, у багатьох випадках мають стати заміною загальноприйнятим токсикологічним дослідам на лабораторних тваринах. Токсичність наночастинок зумовлена, насамперед, розвитком оксидативного стресу, перекисним окисненням мембран із подальшим збільшенням їх проникності, порушенням функцій та руйнуванням [4]. 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 сприятиме уточненню механізмів пошкоджуючої дії на організм нанорозмірних об'єктів, удосконаленню оцінки їх небезпечного впливу.

Вибір як тест-об'єкту статевих клітин (сперматозоїдів) обумовлений тим, що незважаючи на порівняно короткий 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 окисленню, незначну кількість цитоплазми, що містить низьку концентрацію ДНК-відновлювальних систем та антиоксидантних ензимів, які виявляються нездатними захистити клітинну мембрану на рівні хвоста і акросоми. Накопичення перекисів ліпідів у тканинах супроводжується руйнуванням молекулярної структури клітинних мембран, найважливішими компонентами яких є фосфоліпіди. Інтенсифікація процесів перекисного окислення ліпідів залежить від ступеня пошкодження мембран сперматозоїдів.

Отже, **мета роботи** полягала у визначенні можливостей застосування методики експрес-оцінки біологічної дії нанорозмірних фракцій твердої складової ЗА (ТСЗА) для отримання інформації щодо цитотоксичності зварювальних матеріалів.

Матеріали та методи досліджень

Було оцінено пошкоджуючу дію нанорозмірних фракцій ТСЗА, що утворилися під час зварювання високолегованим дослідним електродом з рутиловим видом покриття («14-32») зі зниженим вмістом хрому (VI) (під час гігієнічної оцінки хрому (YI) не виявлено), середній аеродинамічний діаметр частинок ТСЗА – 101,72 нм; а також серійним електродом «Cristal» з рутиловим видом покриття із масовою часткою вмісту хрому (YI) 0,9%, середній аеродинамічний діаметр частинок ТСЗА – 148,5 нм. Іншими основними компонентами досліджуваних електродів «14-32» та «Cristal» є хром (III) (3,91% та 0,71% відповідно), нікель (масова частка 1,39% та 0,74% відповідно) та марганець (масова частка 5,2% та 10,33% відповідно) [1].

Нанорозмірні фракції ТСЗА відбиралися відповідно до способу визначення наночастинок в повітрі робочої зони [5].

Розмір частинок визначали методом динамічного розсіювання світла за допомогою приладу Analysette 12 DynaSizer («Fritsch», Німеччина).

Для проведення морфологічних досліджень сперматозоїдів після експозиції (1 година, t=37 ^{0}C) нанорозмірними фракціями ТСЗА, що утворилися після зварювання досліджуваними електродами, разом із контрольним біоматеріалом, готували мазки замороженого еякуляту шляхом рівномірного розподілу краплі біорідини на предметному склі. Частину препаратів висушували на повітрі, а іншу фіксували етанолом. Фарбування мазків проводили за методикою Лефлера (метиленовим синім), за Майн-Грюнвальдом (фіксація) із забарвленням за Романовським розведеною (1/3) та нерозведеною фарбою [6]. Пофарбовані препарати аналізували з імерсією під об'єктивом х1000 з використанням мікроскопу «Carl Zeiss» (Німеччина).

Результати та їх обговорення

Для дослідження цитотоксичної дії нанорозмірних фракцій ТСЗА необхідно було розробити спосіб стабілізації нанопорошків металів у водних розчинах для наступного використання у біомедичних дослідженнях in vivo та in vitro. 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 матеріалу, 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. Встановлено, що середній аеродинамічний діаметр частинок відібраних нанорозмірних фракцій ТСЗА електроду «14-32» у деіонізованій воді становив 333,07 нм, тоді як при використанні глюкозо-цитратного буферу зі співвідношенням глюкози та натрію цитрату 4 : 1 – 101,72 нм. Своєю чергою, розмір частинок ТСЗА електроду «Cristal» у деіонізованій воді становив 249,2 нм, тоді як при використанні глюкозо-цитратного буферу – 148,5 нм.

Таким чином, запропонований стабілізатор дозволяє отримувати відносно стабільні гідрозолі нанорозмірних фракцій ТСЗА, уникаючи при цьому небажаного впливу на токсичність вихідного матеріалу. Це своєю чергою, це надало можливість оцінити цитотоксичність відібраних проб ТСЗА у

морфологічних дослідженнях сперматозоїдів великої рогатої худоби (бика).

При підрахунку кількості нормальних сперматозоїдів брали до уваги характерні параметри: відсутність дефектів головки та наявність у ній акросоми, а також наявність дефектів середньої частини та хвоста, що відповідає критеріям норми [7]. Аномальні сперматозоїди підраховували з урахуванням розподілення дефектів у різних відділах структури. Кожний з них був віднесений до однієї з груп: аномалії головки, відсутність акросоми в ній, або зменшення її області, дефекти середньої частини та хвоста. У кожній із зазначених груп розраховували частку нормальних та аномальних сперматозоїдів як відсоток на 100 порахованих клітин (відсоткове співвідношення) (табл.1). Це дозволило визначити зростання відсотка аномальних клітин та зниження частки морфологічно нормальних клітин у порівнянні з контролем, що характеризує наявність тератоспермії. Ступінь вираженості її залежить від впливу нанорозмірних фракцій ЗА і проявлялася як при дії ТСЗА електроду «Cristal», так і та дослідного електроду «14-32». У той же час, при дії нанорозмірних фракцій ТСЗА, що утворилися під час зварювання електродом «14-32», частка нормальних сперматозоїдів була вдвічі меншою порівняно зі сперматозоїдами, які були інкубовані з нанорозмірними фракціями ТСЗА, що утворилися внаслідок зварювання серійним електродом «Cristal» (14% та 28% відповідно) (табл.1). Останнє може бути наслідком несприятливого впливу нікелю та хрому (III) у складі ЗА електроду «14-32», масова частка яких є більшою порівняно з відповідними складовими ЗА електроду «Cristal», попри відсутність Cr (YI) та меншу кількість марганцю.

Виявлені дефекти статевих клітин при дії досліджуваних нанорозмірних фракцій ТСЗА розвивалися у різних відділах. Зокрема, серед дефектів сперматозоїдів найбільш часто виявлялися аномалії головки та хвоста. Так, у головці вони характеризувалися зміною її форми (грушовидна та трикутна), нахиленням, частою відсутністю акросомальної області або зменшенням її розміру, а також набряковими процесами. Дефекти хвоста характеризувалися його вкороченням, закрученням у петлю різних розмірів та у спіраль на всіх його ділянках. Характерною особливістю хвоста сперматозоїда є рухливість, де кінцевий відділ апарату руху представляє найважливішу його частину. Порушення у ньому гальмує рухливість або призводить до повної її відсутності (астенозооспермія). Зокрема, в експерименті аномалії закручення кінцевого відділу у петлю спостерігалися при дії обох досліджуваних зразків.

Слід звернути особливу увагу на одночасне виявлення в різних відділах одного сперматозоїда подвійних та потрійних аномалій. Так, при дії «Cristal» відзначалися дефекти головки (набряк, трикутна форма, відсутність акросоми, нахил), середньої частини (набряк) та хвоста (вкорочення, його відсутність, закручення у петлю кінцевого відділу); при дії «14-32» – дефекти головки (набряк, нахил, відсутність акросоми), середньої частини (потовщення) та хвоста (вкорочення, петля на різних його ділянках, набряк). Цей комплекс морфологічних аномалій сперматозоїдів відображає зниження рухливої активності та функціональної повноцінності.

Крім визначених аномалій сперматозоїдів спостерігалася їх агрегація (скупчення), що свідчить про їх патологічний стан. Також звертала на себе увагу наявність залишкових тілець як при дії ТСЗА електроду «14-32», так і при дії ТСЗА електроду «Cristal», що, ймовірно, є результатом загибелі сперматозоїдів унаслідок перекисного пошкодження мембран та наявності у них морфологічних аномалій.

Висновки

Встановлено, що експозиція сперматозоїдів бика нанофракціями ТСЗА, що утворилися внаслідок зварювання серійним зварювальним електродом «Cristal» та дослідним електродом з поліпшеними санітарно-гігієнічними характеристиками «14-32», спричиняла морфологічні аномалії статевих клітин. При цьому частка нормальних сперматозоїдів була удвічі меншою при дії нанорозмірних фракцій ТСЗА електроду «14-32» порівняно зі сперматозоїдами, що були екпоновані нанорозмірними фракціями ТСЗА серійного електроду «Cristal» (14% та 28% відповідно).

Запропонований експрес-спосіб може бути використаний в якості скринінгового при дослідженнях зварювальних матеріалів, при цьому доцільним є проведення подальших досліджень щодо валідності отриманих даних та наступного впровадження у практичну діяльність.

Література:

1. Левченко О.Г. Цитотоксичність зв рюв льних ерозолів, що утворюються під ч с зв рюв ння покритими електрод ми / О.Г. Левченко, О.В. Демецьк , А.О. Лук'яненко // Укр їнський журн л з проблем медицини пр ці. – 2016. – № 3(48). – С. 30–36.

2. Demetska O. V. On the problem of exposure control of nanomaterials at workplace / O.V. Demetska, T.Yu. Tkachenko // Укр їнський журн л з проблем медицини пр ці. – 2015. – № 4(45). – С. 10–13.

3. Buchmen J. Understanding nanoparticle toxicity mechanisms to inform redesign strategies to reduce environmental impact. Acc. Chem. Res. – 2019. – № 6 (52). – 1632–1642.

4. Horie M. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity / M.Horie, Y.Tabei // Free Radic Res. 2020. – Dec 18. – P.1–12.

5. П тент Укр їни № 101308 н корисну модель. Експрес-методі визн чення токсичності н ном тері лів у розчин х in vitro з використ нням сперм тозоїдів великої рог тої худоби як тест-об'єкт //Демецьк О.В., Леоненко Н.С. Я.Д. З явник і вл сник Держ вн Уст нов «Інститут медицини пр ці Н ціон льної Ак демії Медичних Н ук Укр їни». – З явк № u201412531; з явл. 19.12.2014; опубл. 10.09.2015, Бюл. № 17.

6. Б грій М.М. Методики морфологічних досліджень / М.М. Б грій, В.А. Дібров т ін. // Вінниця : Нов книг , 2016. 328 с.

7. Гонч ров Н.П. Атл с морфологических форм сперм тозоидов / Н.П. Гонч ров, А.Д. Добр чев , М.В. Корякин // Медицинское информ ционное гентство, 2018. 104 с.