

О. Т. КУЦАН, доктор ветеринарних наук, професор, член-кор. НААН

О. Л. ОРОБЧЕНКО, кандидат ветеринарних наук

М. Є. РОМАНЬКО, кандидат біологічних наук

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

КЛІНІЧНІ ТА ОРГАНІЧНІ ЗМІНИ У ЩУРІВ ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВОГО ВВЕДЕННЯ НАНОКОМПОЗИТУ МЕТАЛІВ (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) ЗА УМОВ ГОСТРОГО ТОКСИКОЛОГІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ

Отримані нові дані щодо клініко-органічних змін у щурів в експерименті з вивчення гострої токсичності наноконструкції металів (НкМе), а саме: відсутність загибелі щурів протягом 14 діб спостереження; максимально можлива введена доза НкМе – 40 см³/кг маси тіла (4 мг/кг за кожним металом); зміни у клінічному стані у щурів, яким одноразово per os ввели НкМе в дозах 10, 20 і 40 см³/кг маси тіла з 1- по 3-тю добу досліджу (за зменшення споживання води та корму); при патологоанатомічному розтині на 1-, 3-, 7- та 14-ту добу досліджень зміни в ШКТ щурів (здуття шлунку та товстого відділу кишечника), що отримали дослідний зразок НкМе у всьому дозовому діапазоні.

Отримані результати свідчать, що при доклінічному та клінічному оцінюванні токсичності наночасток металів, як компонентів ветеринарних препаратів і біодобавок, в експериментах in vivo необхідно враховувати клініко-фізіологічні та патологоанатомічні параметри гострої токсичності.

Ключові слова: гостра токсичність, клініко-фізіологічний стан, патологоанатомічний розтин, наноконструкція металів, щури.

Досягнення нанобіотехнології значною мірою позначилися на розвитку тваринництва, ветеринарної та гуманної медицини, де наноматеріали знайшли своє широке застосування у профілактиці, лікуванні та діагностиці захворювань різної етіології, годівлі тварин і птиці [1–4]. Перспективними у цьому аспекті є наночастинки металів, наноаквахелати металів, вуглецеві нанотрубки та фулереми. На такому етапі розвитку нанобіотехнологій актуальним і нагальним є створення банку біобезпечних і біосумісних наноматеріалів для потреб ветеринарної медицини і тваринницької галузі взагалі.

Широке впровадження наноматеріалів, а отже і більш тісний контакт з ними живих організмів, супроводжуються відсутністю ґрунтовних знань про можливий їх небезпечний вплив. Але вищезгадані питання потребують досконалого вивчення та розв'язання. Дослідження потенційних ризиків використання наноматеріалів може бути адекватним за використання ключових системних характеристик живого організму (фізіологічних, біохімічних, імунологічних, генетичних тощо) чутливих до токсичної дії. Такі характеристики вважають системними біомаркерами.

Визначення особливостей модуляції наночастками біохімічних процесів біологічних систем різного рівня організації, тобто біосумісності, зокрема у аспекті дозового навантаження (біодоступності), відкриває нові перспективи у

фундаментальному розумінні їх впливу на стан та функціональну активність клітин [2–8]. Тому питання дослідження ступеня біосумісності та біодоступності наночасток в експериментах *in vitro* і *in vivo* та їх безпечності є вкрай актуальним, вивчення механізмів взаємодії нанорозмірних сполук з біомакромолекулами остаточно не з'ясовані і потребують подальшого детального дослідження.

Одним з найважливіших етапів дослідження безпечності будь-яких субстанцій є клінічні випробування їх на лабораторних тваринах, тому **метою даної роботи** и стало вивчення клінічних та органічних змін у щурів після введення наноконкомпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту.

Матеріали і методи. З метою створення ефективної кормової біодобавки спрямованої дії – нанонутрицевтика – нами було проведено низку попередніх досліджень щодо біобезпечності наночасток купруму, феруму, цинку, двоокису мангану, аргентуму, ауруму та кобальту у певному розмірно-концентраційному діапазоні за умов *in vitro* [9, 10]. Дослідні зразки наночасток металів отримували методами хімічної конденсації шляхом відновлення відповідних солей металів [11] у водному середовищі. Встановлено, що за такими системними біомаркерами як генотоксичність, мутагенність та загальна токсичність (на моделі субклітинних фракцій еукаріотичних клітин) наночастки купруму, феруму, аргентуму та двоокису мангану в колоїдному стані є безпечними.

Одержані результати стали підставою для складання композиційної суміші із наночасток металів (дослідний зразок наноконкомпозиту металів (НкМе) містить наночастки Ag, Cu, Fe та двоокису Mn в аліквотному співвідношенні з кінцевою концентрацією 100 мкг/см³ за кожним металом) та подальших досліджень токсикологічних параметрів у системі *in vivo*.

Як препарат – порівняння в дослідженнях використовували суміш солей відповідних металів у макродисперсній (іонній) формі. Концентрація відповідних металів у розчині суміші солей – AgNO₃, (CuSO₄ • 5H₂O), (MnSO₄ • 5H₂O) і (FeSO₄ • 7H₂O), відповідно дорівнювала 100 мкг/см³ за кожним металом.

Дослідження були проведені у відділі токсикології, безпеки та якості сільськогосподарської продукції ННЦ «ІЕКВМ». У якості об'єкта досліджень було використано 144 статевозрілих щура-самця лінії *Vistar* масою (200-250) г. За принципом аналогів було сформовано 6 груп тварин по 24 щури у кожній.

Тваринам контрольної групи вводили одноразово *per os* 2 см³/щура фізіологічний розчин натрію хлориду. Щурам I і II дослідних груп вводили одноразово *per os* біотичну дозу розчинів НкМе і суміші солей відповідних металів з розрахунку 3 см³/кг маси тіла, а тваринам III, IV і V дослідних груп – дози НкМе, що перевищували рекомендовану біотичну дозу препарату в 3,3, 6,7 і 13,3 рази, а саме – 10, 20 і 40 см³/кг маси тіла відповідно (табл. 1).

Впродовж досліду проводили спостереження за клінічним станом та поведінкою тварин усіх груп [12, 13].

Через 1, 3, 7 і 14 діб після введення НкМе, під час легкого хлороформного наркозу декапітували по 6 щурів з кожної групи та проводили патологоанатомічний розтин [12].

Експериментальні дослідження на тваринах проводили з урахуванням основних принципів біоетики: утримання, догляд за тваринами та їх годівлю здійснювали згідно з нормами та раціонами, рекомендованими для даного виду лабораторних тварин. За період досліду тварини всіх груп мали вільний доступ до води [13, 14].

Схема досліджу на статевозрілих білих щурах лінії Вістар (n=144)

Групи		Доза, см ³ /кг маси тіла	Терміни дослідження, діб			
			1	3	7	14
		Кількість забитих тварин для дослідження				
Контроль (n=24)		Фізіологічний розчин натрію хлориду – 2 см ³ на тварину	6	6	6	6
Дослідні	I (n=24)	НкМе, 3 см ³ /кг маси тіла	6	6	6	6
	II (n=24)	Суміш солей Ме, 3 см ³ /кг маси тіла	6	6	6	6
	III (n=24)	НкМе, 10 см ³ /кг маси тіла	6	6	6	6
	IV (n=24)	НкМе, 20 см ³ /кг маси тіла	6	6	6	6
	V (n=24)	НкМе, 40 см ³ /кг маси тіла	6	6	6	6

Результати досліджень. Клінічні спостереження за щурами протягом 14 діб показали, що загальний стан організму тварин як контрольної, так і дослідних груп був задовільний: щури були рухливі, адекватно реагували на зовнішні подразники. Загибелі тварин за весь термін спостереження не зафіксовано. Лише на першу добу після введення відмічали зменшення споживання води щурами III, IV і V дослідних груп, яким вводили нанокompозит 10, 20 і 40 см³/кг маси тіла відповідно, при цьому поїдання корму в III групі не відрізнялося від контрольної групи, тоді як у IV і V дослідних групах воно було приблизно на 25 % та 50 % нижчим за контроль. На другу добу після введення препаратів зміни споживання корму спостерігали лише у V дослідній групі воно приблизно на 25 % було нижчим за контроль, також на даному терміні досліджень спостерігали підвищене споживання води щурами I дослідної групи (нанокompозит 3 см³/кг маси тіла). Починаючи з третьої доби споживання корму і води нормалізувалося і було однаковим у всіх групах до завершення дослідження. На нашу думку дані ефекти пов'язані з надходженням нанокompозиту в організм щурів III, IV і V дослідних груп (так як тварини отримували від 5,0 до 8,0 см³ препарату) і є компенсаторною відповіддю організму на надмірне введення. Слід зазначити, що більшість металів, в тому числі купрум, ферум і манган, елімінуються нирками [15,16], тому підвищене споживання води щурами I дослідної групи можна пояснити спираючись на вище вказаний факт.

Патологоанатомічними дослідженнями на першу добу експерименту (Рис. 1) не встановлено відхилень у щурів контрольної, I, II та III дослідних груп, тоді як у тварин IV дослідної групи відмічено здуття шлунка, а в V групі здуття товстого відділу кишечника.

На третю добу досліджу (Рис. 2) відхилень не встановлено лише у щурів контрольної та II дослідної групи (суміш солей металів 3 см³/кг маси тіла), тоді як здуття шлунка відмічали у щурів III дослідної групи, здуття товстого відділу кишечника у щурів I, IV та V дослідних груп. Окрім того у щурів V дослідної групи печінка була нерівномірно забарвлена (з «мармуровим» відтінком).

На сьому добу досліджу (Рис. 3) відхилень не встановлено лише у щурів контрольної групи. У щурів I та II дослідних груп встановлено незначне здуття товстого відділу кишечника, тоді як у тварин III, IV та V дослідних груп товстий кишечник був значно здутий.

На 14-ту добу після введення препарату (Рис. 4) відхилень не встановлено у щурів контрольної та II дослідної групи. Тоді як у тварин I, III, IV та V дослідних груп відмічали порушення з боку шлунково-кишкового тракту (ШКТ): здуття шлунку (IV дослідна група) та товстого відділу кишечника (I, III та V дослідні групи).

Не дивлячись на вище сказане, слід зазначити, що ми не спостерігали запальних явищ у ШКТ по всій його довжині (гастритів, ентеритів, колітів виявлено не було на всіх термінах досліджень) у тварин всіх дослідних груп, хоча здуття (в основному товстого кишечника) було у щурів, що отримали наночастинки в різних дозах (I, III, IV та V групи). Тому можна зробити припущення, що здуття у різних відділах ШКТ можливо спричинене внаслідок зміни складу мікрофлори під дією наночастинок, тому необхідно це врахувати в подальших дослідженнях.



контроль



I дослід (нано
3 см³/кг маси тіла)



II дослід (солі Me)
3 см³/кг маси тіла)



III дослід (нано
10 см³/кг маси тіла)



IV дослід (нано
20 см³/кг маси тіла)



V дослід (нано
40 см³/кг маси тіла)

Рис.1. Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 1 добу експерименту (ножицями вказано на здуття шлунка у щурів IV дослідної групи та товстого кишечника – у щурів V дослідної групи).



контроль

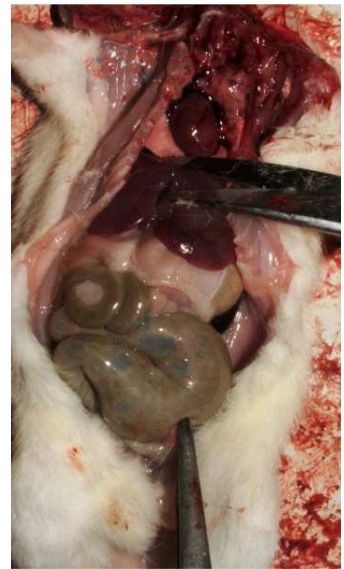
I дослід (нано
3 мл/кг маси тіла)II дослід (солі Me)
3 мл/кг маси тіла)III дослід (нано
10 мл/кг маси тіла)IV дослід (нано
20 мл/кг маси тіла)V дослід (нано
40 мл/кг маси тіла)

Рис.2. Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 3 добу експерименту (ножицями вказано на здуття шлунка у щурів III дослідної групи, здуття товстого відділу кишечника у I, IV та V дослідних групах та нерівномірне забарвлення печінки у щурів V дослідної групи).



контроль



I дослід (нано
3 мл/кг маси тіла)



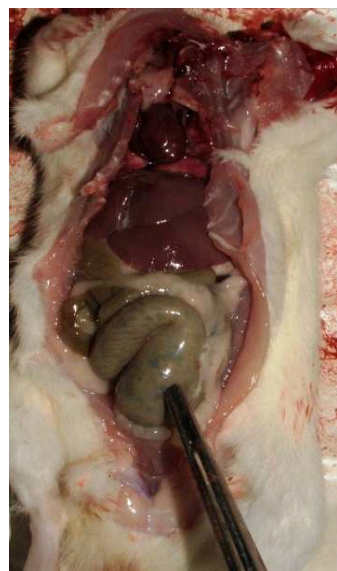
II дослід (солі Me)
3 мл/кг маси тіла)



III дослід (нано
10 мл/кг маси тіла)



IV дослід (нано
20 мл/кг маси тіла)

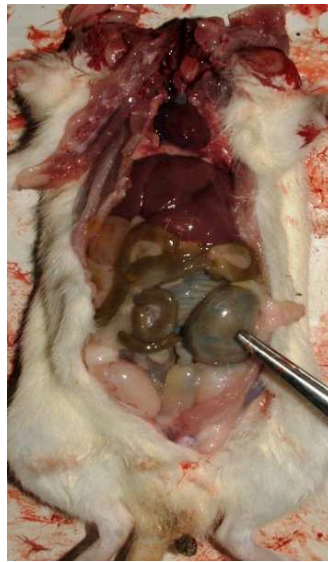


V дослід (нано
40 мл/кг маси тіла)

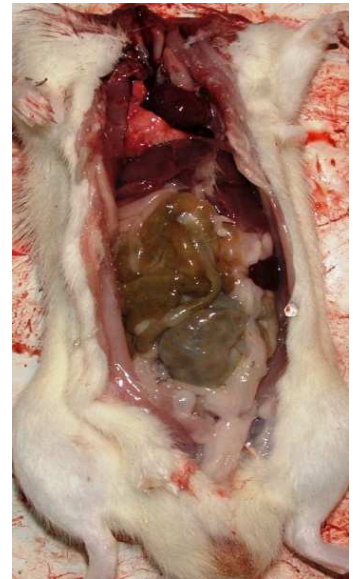
Рис.3. Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 7 добу експерименту (ножицями вказано на здуття товстого відділу кишечника у щурів IV і V дослідної групи).



контроль



I дослід (нано
3 мл/кг маси тіла)



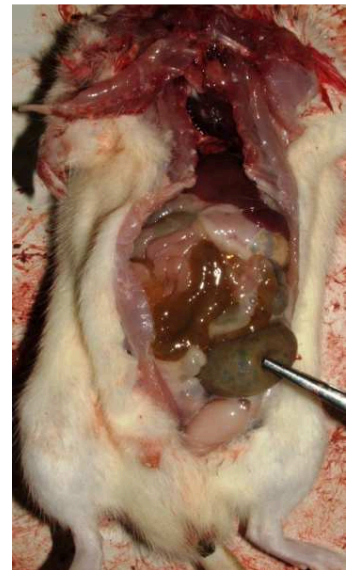
II дослід (солі Me)
3 мл/кг маси тіла)



III дослід (нано
10 мл/кг маси тіла)



IV дослід (нано
20 мл/кг маси тіла)



V дослід (нано
40 мл/кг маси тіла)

Рис.4. Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 14 добу експерименту (ножицями вказано на здуття шлунка та товстого відділу кишечника).

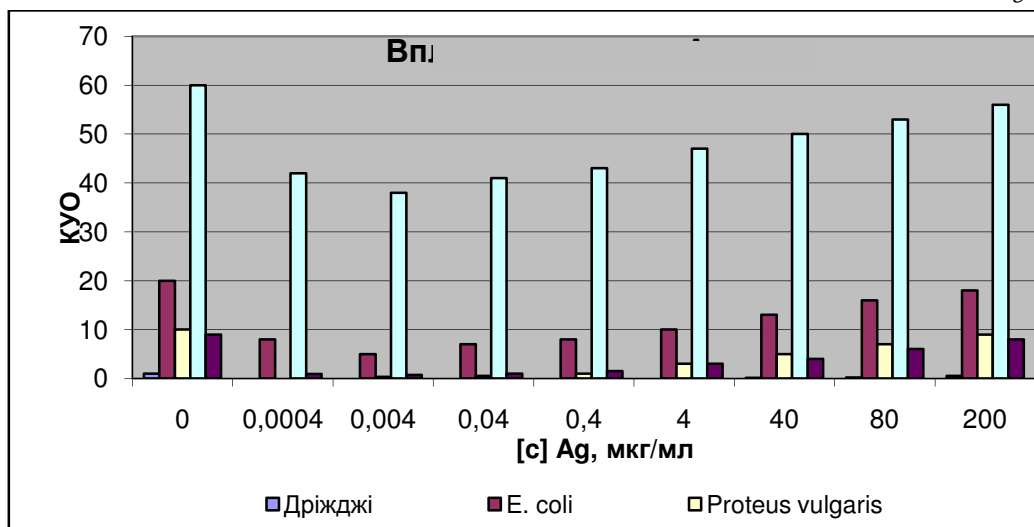


Рис. 1 Вплив наночастинок аргентуму на ростові процеси складових бактеріальної асоціації

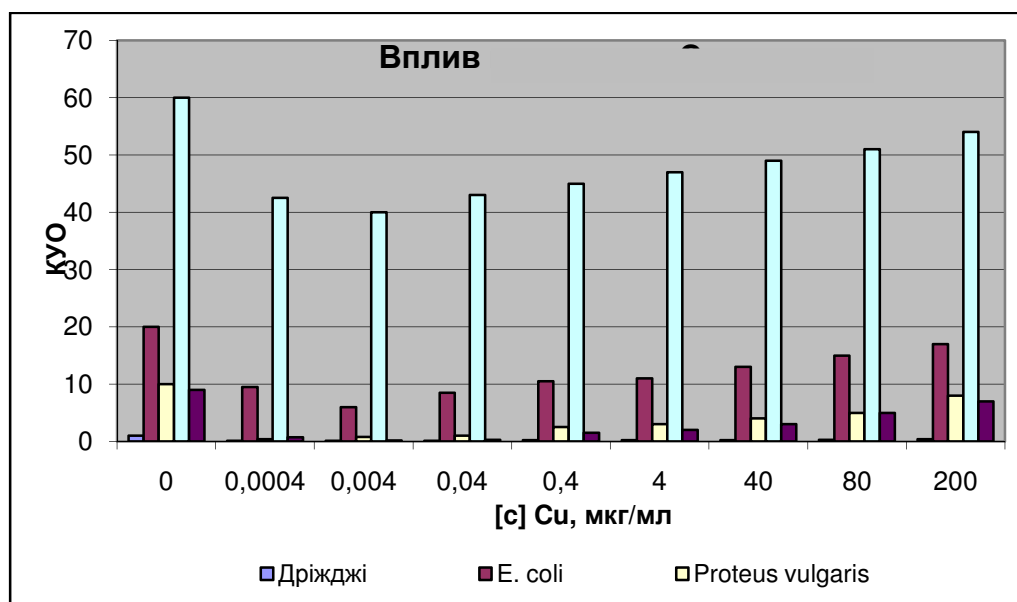


Рис. 2 Вплив наночастинок купруму на ростові процеси складових бактеріальної асоціації

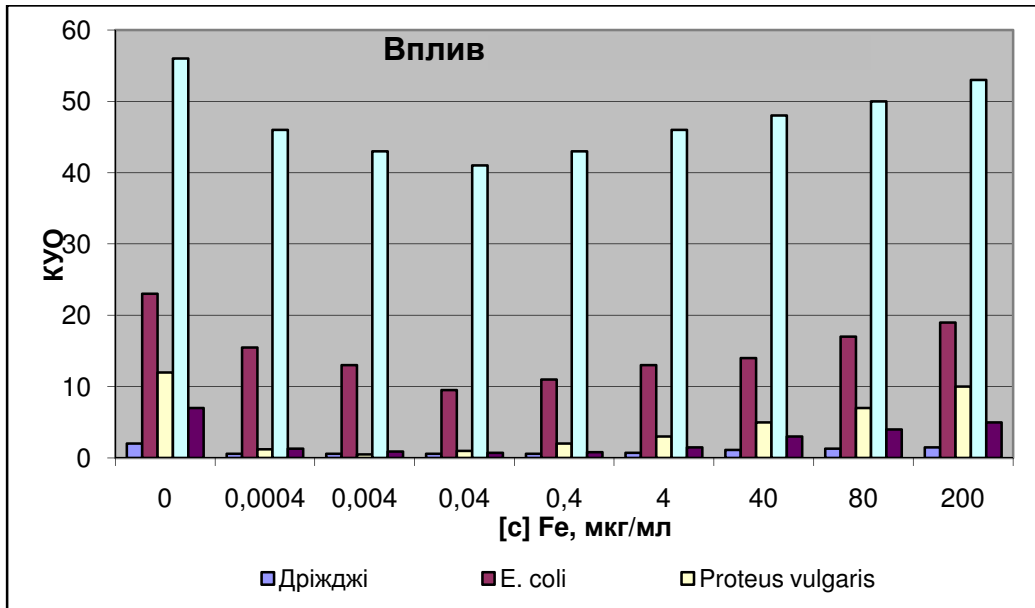


Рис. 3 Вплив наночасток феруму на ростові процеси складових бактеріальної асоціації

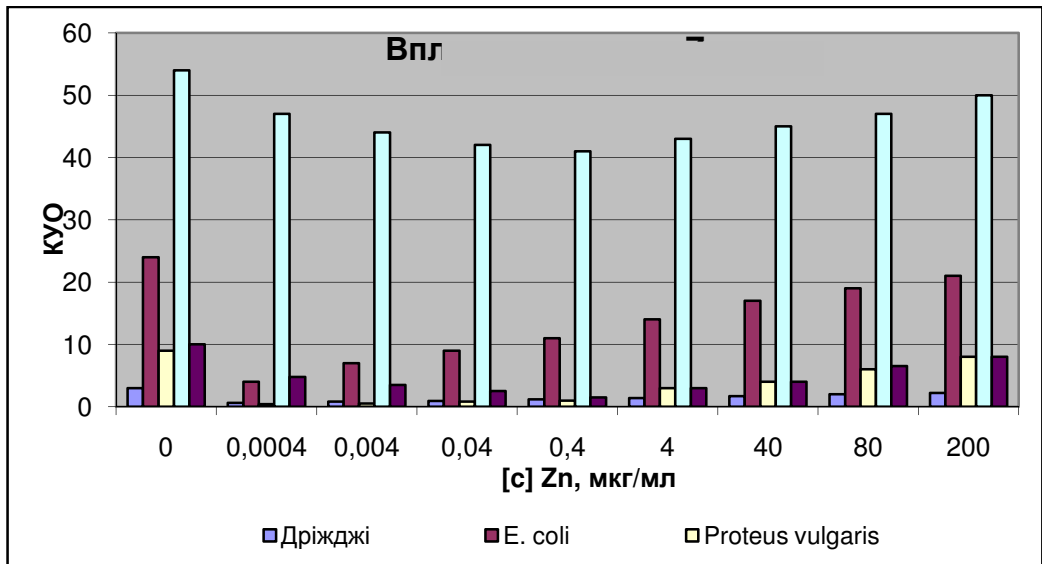


Рис. 4 Вплив наночасток цинку на ростові процеси складових бактеріальної асоціації

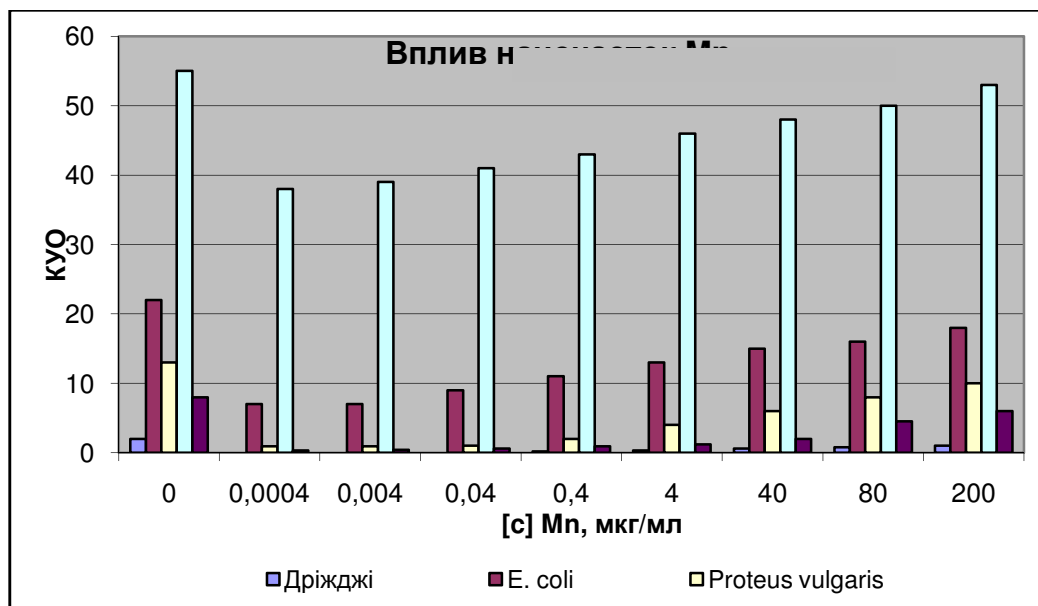


Рис. 5 Вплив наночастинок двоокису мангану на ростові процеси складових бактеріальної асоціації

Висновки та рекомендації.

1. Після введення експериментального зразка НкМе щурам за умов гострого токсикологічного експерименту не реєстрували їх загибелі, при цьому максимальна введена доза становила $40 \text{ см}^3/\text{кг}$ маси тіла ($4 \text{ мг}/\text{кг}$ кожного металу).

2. Зміни у клінічному стані щурів, яким одноразово ввели НкМе в дозах 10, 20 і $40 \text{ см}^3/\text{кг}$ маси тіла з 1- по 3-тю добу досліджу проявлялися зменшенням споживання води та корму.

3. При патологоанатомічному розтині щурів, що отримали НкМе у всьому дозовому діапазоні, починаючи з 3-ої доби досліджень, встановлені наступні органічні зміни: здуття шлунку та товстого відділу кишечника.

4. При доклінічному та клінічному оцінюванні токсичності наночастинок металів, як компонентів ветеринарних препаратів і біодобавок, в експериментах *in vivo* необхідно враховувати клініко-фізіологічні та патологоанатомічні параметри гострої токсичності.

Список використаної літератури

1. West J. L. Application of nanotechnology to biotechnology [Текст] / J. L. West, N. J. Halas // Current Opinion in Biotechnology. – 2000. – Vol. 11. – P.215–217.

2. Bawa R. Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey [Текст] / R. Bawa // Nanotechnology Law & Business. – 2008. – Vol. 5, No. 2. – P.135–155.

3. Sahoo S. K. The present and future of nanotechnology in human health care [Текст] / S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda // Nanomedicine. – 2007. – No. 3. – P. 20–31.

4. Chen Po.C. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing [Текст] / Po. C. Chen, S.C. Mwakwari, A.K. Oyelere// Nanotechnology, Science and Application. – 2008. – No. 1. – P. 45–66.

5. *Chah S.* Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes [Текст] / S. Chah, M.R. Hammond, R.N. Zare// Chemistry & Biology. – 2005. – Vol. 12. – P. 323–328.
6. *Aslan K.* Nanogold-plasmon-resonance-based glucose sensing [Текст] / K. Aslan, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes// Analytical Biochemistry. – 2004. – Vol. 330. – P. 145–155.
7. Polarization microscopy with stellated gold nanoparticles for robust, in-situ monitoring of biomolecules [Текст] / J. Aaron [et al.] // Optic Express. – 2008. – Vol. 16, No. 3. – P. 2153–2167.
8. Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer [Текст] / R.R. Letfullin [et al.] // Nanomedicine. – 2006. – Vol. 1, No.4. – P.473–480.
9. *Головка А. М.* Оцінювання та контролювання біологічної безпеки наноматеріалів у ветеринарній медицині [Текст] / А. М. Головка, В. О. Ушкалов, М. Є. Романько [та ін.] // Вісник аграрної науки. – 2011. – № 5. – С. 24-28.
10. *Дибкова С. М.* Оцінка генотоксичності та мутагенності наночастинок металів, перспективних компонентів ветеринарних нанонутрицевтиків [Текст] / С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Л. С. Рєзніченко [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – Бюл. № 19, 2011. – С. 61-69.
11. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии [Текст] / под ред. А. В. Перцова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132 с.
12. *Западнюк И. П.* Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте [Текст] / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. – 3-е изд., перераб. и доп. – К.: Вища школа, – 1983. – 383 с.
13. *Коцюмбас І. Я.* Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів [Текст] / І. Я. Коцюмбас. – Тріада плюс, Львів. – 2005. – 356 с.
14. Ст. 26 Закона України № 3447-ІУ от 21.02.2006 «О защите животных от жестокого обращения», Общими этическими принципами экспериментов на животных [Текст].
15. Биоэлементология: основные понятия и термины [Текст] : термин. словарь / А. В.Скальный [и др.]. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. – 50 с.
16. Особливості накопичення міді та цинку в тканинах курчат-бройлерів при їх вирощуванні на комбікормах з комплексними сполуками мікроелементів [Електронний ресурс] / Л. В. Малюга [та ін.] // Наукові доповіді НАУ. – 2008. – №2 (10)., – Режим доступу: <http://www.nbuu.gov.ua/e-Journals/nd/2008-2/08mlvcom>.

КЛИНИЧЕСКИЕ И ОРГАНИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОКОМПОЗИТА МЕТАЛЛОВ (Ag, Cu, Fe, двуокись Mn) В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА / Куцан О.Т., Оробченко О.Л., Романько М.Є.

Получены новые данные о клинико-органных изменениях у крыс в эксперименте по изучению острой токсичности наноконпозиата металлов (НкМе), а именно: отсутствие гибели крыс на протяжении 14 дней наблюдения; максимально возможно введенная доза НкМе – 40 см³/кг массы тела (4 мг/кг по каждому металлу); изменения в клиническом состоянии крыс, которым однократно per os вводили НкМе в дозах 10, 20 и 40 см³/кг массы тела с 1- по 3-ьи

сутки опыта (по снижению употребления воды и корма); при патологоанатомическом вскрытии на 1-, 3-, 7- и 14-ые сутки исследований изменения в ЖКТ крыс (вздутие желудка и толстого отдела кишечника), которым вводили опытный образец НкМе во всем дозовом диапазоне.

*Полученные результаты свидетельствуют, что при доклиническом и клиническом оценивании токсичности наночастиц металлов, как компонентов ветеринарных препаратов и биодобавок, в экспериментах *in vivo* необходимо учитывать клинико-физиологические и патологоанатомические параметры острой токсичности.*

Ключевые слова: острая токсичность, клинико-физиологическое состояние, нанокompозит металлов, патологанатомическое вскрытие, крысы.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук М. О. Ярошенко