



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101200** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**G01N 33/00**  
**G01J 3/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: <b>u 2015 03220</b>	(72) Винахідник(и): <b>Фальфушинська Галина Іванівна (UA), Столяр Оксана Борисівна (UA), Гнатишина Леся Любомирівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>06.04.2015</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.08.2015</b>	(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ", Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.08.2015, Бюл.№ 16</b>	

**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ БЕЗПЕКИ ПРОМИСЛОВИХ МЕТАЛОВІСНИХ НАНОМАТЕРІАЛІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ БІОМАРКЕРІВ****(57) Реферат:**

Спосіб оцінки безпеки промислових металовмісних наноматеріалів із застосуванням біомаркерів включає визначення їх здатності до біодеградації та ефекту для біоти. У тканині травної залози двостулкового молюска перлівниці клиноподібної *Unio tumidus* визначають вміст металотіонеїнів (MT), активність каспази-3 та катепсину Д (загальної, вільної (в), лізосомальної (л)), обраховують їх співвідношення (MT+Катепсин Д (л))/(Каспаза-3+Катепсин Д (в)). Відповідь організму на дію цинк-вмісного матеріалу класифікують за силою як "адапторна" або "токсична" та за механізмом як "ефект нанорозмірності" або "ефект металу" залежно від величини цього співвідношення і варіабельності абсолютного рівня його складових відносно запропонованих референтних значень.

**UA 101200 U**



Корисна модель належить до області збереження довкілля, а саме до біомоніторингу забруднення водойм, і може бути використана для оцінки забруднення водних екосистем внаслідок їх експлуатації, прогнозу безпеки промислових металовмісних наночастинок у середовищі, аналізу фізико-хімічного забруднення річок та внесення екологічних оцінок у бізнес-плани інвестиційних проєктів.

Відомий спосіб контролю токсичності наночастинок золота ["Control of the toxicity of gold nanoparticles", US 20110300532 A1, 2010] з використанням культури клітин HeLa та визначенням у ній МТТ-тесту, вмісту ДНК, мітотичного індексу, активностей каспаз 3/7, мітохондріальної дисфункції та рівня активних форм кисню. Недоліками способу є висока собівартість, невідповідність моделі вимогам до умов водного середовища, відсутність конкретних і універсальних рекомендацій та чітких критеріїв оцінки токсичності наночастинок.

Відомий спосіб прогнозування негативного впливу наночастинок срібла на організм [UA 59442, 2011; автори Мінченко О.Г., Мінченко Д.О., Божко І.В., Зінченко Т.О., Яворський О.І.], що ґрунтується на виділенні тотальної РНК із легень, головного мозку, сім'яників, серця і нирок щурів після введення в організм наночастинок срібла з подальшим проведенням полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК (кДНК) та виявлення змін в експресії мРНК 6-фосфоглюкозо-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатази (PFKFB-2) та її альтернативних сплайс-варіантів. За змінами рівнів експресії прогнозують негативний вплив наночастинок срібла на організм та ймовірність патологічних станів. Пропонований спосіб має низку переваг, зокрема висока точність, специфічність, однак працездатність методологічних підходів (експресія генів, полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу тощо) та необхідність висококваліфікованих працівників для його реалізації утруднює використання способу державними службами контролю їх рівня. Модель не диференціює впливу нанорозмірного матеріалу та іонів срібла.

Відомий "Спосіб оцінки безпеки введення наночастинок міді в організм" [RU 2477485, 2013 р.; автори Сізова О.А., Мірошников С.О., Полякова В.С., Глушченко І.М.], що ґрунтується на визначенні зміни показника експресії антигену каспази-3 в мікрогліоцитах сепсомоторної зони кори головного мозку після введення наночастинок міді в порівнянні з контрольною групою тварин шляхом підрахунку мікрогліоцитів, які експресують каспазу-3 на умовній одиниці площі ідентичних сенсомоторних зон. Пропонований спосіб дозволяє визначити допустиму дозу препарату, що вводиться, органі-мішені, вибрати найбільш оптимальний спосіб введення препарату в організм.

У технічному рішенні [див. Заявку US № 20090269279, публ. 29.10.2009 р.] запропонований спосіб оцінки рівня токсичності, стресових реакцій, пошкоджень ДНК епітеліальних клітин, нормальних кератиноцитів та фібробластів людини за впливу на них багатошарових карбонових нанотрубок з діаметром від 10 до 50 нм, що використовуються, зокрема, з хіміко-терапевтичною метою в онкології. Для оцінки впливу названих наноматеріалів на зазначені клітинні культури у відомому технічному рішенні використовують тести для вимірювання клітинної проліферації, ступеня апоптозу і некрозу з використанням методу цитофлуориметрії.

Відомий також спосіб оцінки впливу наночастинок на клітинні культури [US № 20080295187, публ. 27.11.2008 р.], що полягає в проведенні тестів *in vitro* на тест-культурі і клітин, що містять суспензії тестованих наночастинок, по визначенню впливу наночастинок на продукцію активних форм кисню, утворення апоптотичних і некротичних тілець, порушення функцій мітохондрій з використанням цитологічних флуоресцентних маркерів з подальшим аналізом на проточному цитофлуориметрі. Оцінка впливу наночастинок на клітини тест-культури здійснюється шляхом порівняння отриманих показників з відповідними показниками контрольних зразків клітин тест-культур, що не містять тестовані наночастинок.

Найбільш близьким до запропонованого способу є спосіб оцінки впливу наночастинок на життєдіяльність клітинних структур [RU 2460997, автори: Григор'єв А.І. та ін.], який включає інкубацію первинних культур мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, що виділяються з стромально-васкулярної фракції жирової тканини людини і мононуклеарних клітин лімфоцитів периферичної крові людини з суспензіями наночастинок. Після завершення інкубації визначають вплив наночастинок на продукцію активних форм кисню, на утворення апоптотичних і некротичних клітин, на функції мітохондрій, на стан лізосомального компартменту, а також оцінюють внутрішньоклітинне накопичення аналізованих наночастинок. Отримані показники порівнюють з відповідними показниками контрольних зразків досліджуваних клітин.

Промислові або синтетичні наночастинок виготовляють для застосування у різноманітних сферах техніки, медицини та побуту. Серед промислових наноматеріалів, з якими найбільш ймовірно контактують живі організми, належать наноформи оксидів металів (TiO<sub>2</sub>, ZnO, CuO),

простих речовин металів (срібла, золота) та карбону (одностінні та багатостінні карбонові нанотрубки, C60-фулерени). На підставі розрахованих концентрацій у довкіллі вважають, що нанотрубки та наносрібло несуть мінімальний ризик, тоді як до найбільш небезпечних потенційно належать нано-оксиди титану та цинку (Johnston et al., 2010).

Наноформа цинк оксиду (n-ZnO) широко використовується у складі зубної пасти, косметичних продуктів, сонцезахисних кремів, харчовій промисловості тощо. Паралельно із збільшенням обсягів виробництва та галузей використання наноматеріалів все більша їх кількість потрапляє в навколишнє середовище і становить потенційну небезпеку для біоти через високу реакційну здатність і біодоступність. Це зумовлює необхідність розробки нових методологічних підходів оцінки їх екологічного ризику для тварин та ефективної екстраполяції результатів для визначення рівня небезпеки для людини.

Проаналізувавши наведені вище способи та технічні рішення, можна дійти висновку, що системи тестів, яка здатна оцінити біологічну активність, токсичність і безпеку наноматеріалів та наночастинок цинку, як одних з найбільш використовуваних у народному господарстві, по відношенню до живих організмів не існує. Розробники, в основному, пропонують вузькоспеціалізовані і недостатньо стандартизовані методики і тести з використанням клітинних культур, які не повною мірою відображають ефекти пошкоджуючих речовин на біологічні системи.

Прояви токсичності металовмісних наноматеріалів здебільшого пов'язують із впливом іонів металів, що вивільняються за умов біодеградації цих комплексів у клітинах чи позаклітинному середовищі. Відтак, внутрішньоклітинні термостабільні білки металотіонеїни, які індукуються у присутності підвищених концентрацій іонів металів (Roesijadi, 2000), належать до найбільш ймовірних молекулярних мішеней їх впливу.

Лізосоми - це субклітинні структури, що володіють високо специфічними системами транспорту частинок. Зменшення стабільності лізосомальних мембран вважається індикатором запального фізіологічного стресу. Згідно з рекомендаціями UNEP/RAMOG, цей тест разом із показниками оксидативного стресу складають перший етап виявлення токсичності оточуючого середовища (Viarengo et al., 2007).

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу оцінки стабільності цинк-вмісних матеріалів та їх ефекту для біоти на підставі визначення мінімального набору біохімічних показників у травній залозі молюска. Для реалізації способу з досліджуваної водойми виловлюють 6 екземплярів двостулкового молюска роду Unionidae перлівниці клиноподібної *Unio tumidus*. Обраний індикаторний вид безхребетних тварин володіє низкою переваг для біоіндикації: його використання не потребує дозвільних документів офіційних служб та біоетичних комісій, широко розповсюджений та належить до пасивних фільтраторів води у водоймах, що сприяє концентруванню в його тканинах забруднювачів водного середовища, зокрема іонів металів, поліхлорбіфенілів, поліароматичних вуглеводнів тощо. Відповідно, у двостулках активно функціонують молекулярні системи детоксикації (включно з металотіонеїнами та лізосомами) та знищення пошкоджених клітин шляхом апоптозу. У тканині травної залози тварин визначають вміст металотіонеїнів (MT), активність ензимів апоптозу каспази-3 (цитозоль) та катепсину Д (лізосоми, вільний). Дія пошкоджуючого чинника класифікується за силою як "адапторна" або "токсична" та за механізмом як "ефект нанорозмірності" або "ефект металу". Поєднане визначення цих показників та обчислення їх співвідношення  $(MT + Катепсин\ Д\ (л)) / (Каспаза-3 + Катепсин\ Д\ (в))$  становить важливий діагностичний інструмент для прогнозування стабільності цинк-вмісних матеріалів та їх ефектів для біоти.

Вміст MT у 30 % гомогенаті тканини в 20 мМ тріс-сахарозному буфері визначають за методом A. Viarengo та співавт. (1997) за взаємодією із 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) після хлороформ-етанольної екстракції MT. Для цього приготований гомогенат центрифугують протягом 45 хв при 12000 g, 4 °C. Екстракцію супернатанту проводять сумішшю 0,5 мл охолодженого етанолу (до -20 °C) та 0,04 мл хлороформу з наступним центрифугуванням при 6000×g протягом 10 хв. До супернатанту додають 3 мл охолодженого етанолу, змішують протягом 15 с і переносять пробу на 1 год. в морозильну камеру. Після цього до суміші додають 1 мл 0,2 М фосфатного буферу pH 8,0 і пробу центрифугують протягом 12 хв при 6000 g. Супернатант декантують, а осад промивають 2 мл 20 мМ тріс-буферного розчину в етанолі, що містить 1 % хлороформу та 0,5 мМ сахарози та знову центрифугують протягом 20 хв при 3000 g, 4 °C. Після цього супернатант знову декантують, а осад ресуспендують в 0,3 мл 5 мМ тріс-ЕДТА буферу, після чого додають 4,2 мл 0,43 мМ розчину ДТНБ в 0,2 М фосфатному буфері pH 8,0 і центрифугують 10 хв при 3000 g, 4 °C. Вимірюють світлопоглинання проби при 412 нм.

Вміст МТ у пробі визначають за калібрувальною кривою, побудованою на глутатіоні та обчислюють, вважаючи, що в 1 молі МТ міститься така ж кількість SH-груп, як і в 20 молях глутатіону і виражають в мкг/г вологої тканини.

Загальну активність катепсину Д [КФ 3.4.23.5] визначають спектрофотометрично за кількістю утвореного тирозину у 50 % гомогенаті тканини травної залози за модифікованим методом Dingle J. T. (1971) (Falfushynska et al., 2014 c). Метод ґрунтується на спектрофотометричному визначенні кислоторозчинних продуктів ферментативного гідролізу гемоглобіну при довжині хвилі 280 нм. Інкубацію проб проводили при 37 °С протягом 30 хв. Ферментну реакцію зупиняють додаванням 10 % розчину трихлороацетатної кислоти з наступним центрифугуванням за 4000 об/хв протягом 10 хв. Для визначення загальної активності катепсину Д проби попередньо обробляють 1 % розчином тритону Х-100 при 37 °С протягом 10 хв, а вільну активність катепсину Д визначають за відсутності денатуруючого агента. Лізосомальну активність катепсину Д визначають за різницею між загальною та вільною активністю ензиму. Активність виражають у нмоль тирозину /(хв·мг білка).

Для визначення активності каспази-3 травну залозу молюска гомогенізують у К-фосфатному буфері, центрифугують при 10,000×g, 4 °С (Bonomini et al., 2004, Falfushynska et al., 2014a, b). Одержану суспензію клітин змішують з лізуючим буфером у співвідношенні 1:3 (4 % Тритон Х-100, 5 мМ 1-ДТА, 5 мМ дитіотреїтолу, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> та інкубують протягом 10 хв. на льоду. Центрифугують протягом 5 хв, 12 000 об/хв. До аліквоти супернатанту, що містить 100 мкг білка додаємо 50 мкл буферу та 10 мкл 2 мМ розчину синтетичного тетрапептиду ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп п-нітроаніліду та інкубуємо протягом 2 год. при 37 °С. Визначають інтенсивність світлопоглинання при 405 нм, яка прямо пропорційна продукту гідролізу ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп п-нітроаніліду каспазою 3-п-нітроаніліну ( $\epsilon_{\text{мм}}=10.5$ ).

Для молюска референтні значення становлять відповідно для вмісту металотіонеїнів 18,2±2,5 мкг/г тканини, загальної активності катепсину Д - 0,64±0,09 пмоль /(хв·мг білка), вільної активності катепсину Д - 0,32±0,07 пмоль/(хв·мг білка), каспази-3-75,9±10,7 пмоль/(хв·мг білка).

Кваліфікують дію цинк-вмісного наноматеріалу за реакцією організму як:

"Ефект нанорозмірності" - Цинк-вмісні препарати акумулюються у лізосомах, не піддаються біодеградації" - загальна активність катепсину Д у травній залозі молюска  $\geq 1,0$  пмоль /(хв·мг білка), а лізосомальна активність катепсину Д перевищує 0,75 пмоль /(хв·мг білка);

"Ефект металу" - Цинк-вмісні препарати піддаються біодеградації, цинк акумулюється у складі металотіонеїнів" - загальна активність катепсину  $\leq 0,95$  пмоль /(хв·мг білка), вміст металотіонеїнів на 30-50 % вищий за значення показників контрольної групи; активність каспази-3 більш ніж на 50 % вища за референтні значення, а відношення (МТ+Катепсин Д (л))/(Каспаза-3+Катепсин Д (в))<1.

"Адапторна" - реакція організму відбувається в межах адаптивного потенціалу. Активність ефектора апоптозу каспази-3 на 20-80 % нижча від референтних значень, а вільна активність катепсину Д складає менше 25 % від загальної активності;

"Токсична" - діапазон адаптивного потенціалу перевищене), з'являються ознаки цитотоксичності. Активність каспази-3 більш ніж вдвічі перевищує референтні значення, вміст МТ подібний або нижчий за значення показників контрольної групи та відношення (МТ+Катепсин Д (л))/(Каспаза-3+Катепсин Д (в))<1.

Реалізацію корисної моделі проілюстровано на прикладах оцінки стабільності цинк-вмісних матеріалів та їх ефекту для біоти на підставі визначення у травній залозі двостулкового молюска *Unio tumidus* вмісту металотіонеїнів, активності каспази-3 та катепсину Д.

Приклад 1. Порівнювали вміст металотіонеїнів, активність каспази-3 та катепсину Д (загальної, вільної, лізосомальної) у травній залозі молюска *Unio tumidus* (Unionidae) з референційного ставу у верхів'ї р. Серет за впливу нано-цинк оксиду (3,1 мкМ) та вільних іонів цинку (3,1 мкМ) в лабораторних акваріумах протягом 14 діб. Одержані результати представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Оцінка стабільності нано-цинк оксиду у водному середовищі  
на підставі визначення мінімального набору біохімічних показників у травній залозі  
молюска за його модельної дії на організм у фізіологічно реальній концентрації протягом 14 діб

Показник	Контроль	ZnO	Zn
Вміст металотіонеїнів, мкг/г тканини	18,2±2,5	31,2±3,7*	30,5±3,6*
Активність каспази-3, пмоль/(хв·мг білка)	75,9±10,7	53,1±8,6*	175,0±10,5*

Продовження таблиці 1

Загальна активність катепсину Д, пмоль /(хв.·мг білка)	0,64±0,09	2,81±0,24*	0,91±0,15*
Вільна активність катепсину Д, пмоль /(хв.·мг білка)	0,32±0,07	0,46±0,09*	0,54±0,08*
Лізосомальна активність катепсину Д, пмоль /(хв.·мг білка)	0,32±0,03	2,35±0,27*	0,37±0,05
(МТ+Катепсин Д (л))/(Каспаза-3+Катепсин Д(в))		4,24	0,71
Механізм дії чинника		Ефект нанорозмірності	Ефект металу
Сила дії чинника		Адапторна	Токсична

Примітка. Тут і далі \* - відмінності в дослідній групі порівняно з контролем вірогідні,  $p < 0,05$ .

Приклад 2. Порівнювали вміст металотіонеїнів, активність каспази-3 та катепсину Д (загальної, вільної, лізосомальної) у травній залозі молюска *Unio tumidus* (Unionidae) з референційного ставу у верхів'ї р. Серет за поєднаного впливу нано-цинк оксиду (3,1 мкМ) та іншого додаткового пошкоджуючого чинника у фізіологічно та, або екологічно реальних концентраціях, зокрема підвищеної температури (25 °C), Zn, Mn-вмісного тіокарбаматного фунгіциду ТАТТУ (Та, 91 мкг/л) та блокатора кальцієвих каналів ніфедипіну (Nif, 10 мкМ) в лабораторних акваріумах протягом 14 діб. Одержані результати представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Оцінка стабільності цинк-вмісних препаратів у водному середовищі на підставі визначення мінімального набору біохімічних показників у травній залозі молюска за поєднаного впливу пошкоджуючих чинників на організм у фізіологічно та екологічно реальних концентраціях протягом 14 діб

Показник	Контроль	ZnO+t°C	ZnO+Ta	ZnO+Nif
Вміст металотіонеїнів, мкг/г тканини	18,2±2,5	20,2±2,5	35,3±4,2*	34,5±3,5*
Активність каспази-3, пмоль/(хв.·мг білка)	75,9±10,7	303,4±66,8*	17,8±1,8*	31,6±5,9*
Загальна активність катепсину Д, пмоль /(хв.·мг білка)	0,64±0,09	1,08±0,11*	1,09±0,24*	0,99±0,24*
Вільна активність катепсину Д, пмоль /(хв.·мг білка)	0,32±0,07	0,31±0,03	0,32±0,05	0,21±0,04*
Лізосомальна активність катепсину Д, пмоль /(хв.·мг білка)	0,32±0,03	0,77±0,07*	0,77±0,08*	0,78±0,08*
(МТ+Катепсин Д (л))/(Каспаза-3 + Катепсин Д (в))		0,71	3,52	4,03
Механізм дії чинника		Ефект напо-розмірності	Ефект нано-розмірності	Ефект нано-розмірності
Сила дії чинника		Токсична	Адапторна	Адапторна

Найбільш помітним проявом дії нано-ZnO як окремо так і в поєднанні з додатковим пошкоджуючим чинником є активація катепсину Д в лізосомах травної залози молюсків, тоді як дії цинку в іонній формі ( $Zn^{2+}$ ) - активація каспази-3. Вміст МТ є менш специфічними, але чутливим показником, оскільки може зростати в результаті як посиленої експресії цього стресорного протеїну внаслідок адаптивної реакції на стрес, так і внаслідок ефекторної дії вільних іонів цинку.

Різномісна відповідь інструментів апоптозу до дії нано-ZnO (активація катепсину Д) та вільних іонів цинку (активація каспази-3) може відображати роль цих ензимів у реалізації альтернативних шляхів апоптозу, які селективно ініціюються різними екологічними стресорами (Conus et al., 2008). Каспаза-3 є цистеїновою протеазою та ключовим ензимом каспазо-опосередкованого шляху апоптозу, тоді як катепсин Д, аспартильна протеаза, - лізосомально-опосередкованого та бере участь у лізосомальному протеолізі (Conus et al., 2008; Venugopal et al., 2013). У нейтрофілах ссавців вивільнення катепсину Д з азурофільних гранул залежить від

рівня активних форм кисню та не залежить від каспазної активності (Conus et al., 2008). Збільшення вільної активності катепсину Д у молюсків *Unio tumidus* (Falfushynska et al., in press) також корелює з рівнем оксирадикалів, але не з активністю каспази-3, що підтверджує гіпотезу щодо активації різних механізмів апоптозу. Активація катепсину Д за дії нано-ZnO в молюсків

може відображати як посилення лізосомального протеолізу (наприклад через пошкодження клітинних білків) так і безпосередній вплив на активність протеази через накопичення наночастинок ZnO у лізосомах. Здатність до акумуляції наночастинок в лізосомах відома для інших двостулкових молюсків (Canesi et al., 2010).

МТ внутрішньоклітинні низькомолекулярні стресорні протеїни, які депонують іони цинку, міді та кадмію. Синтез МТ може індукуватися різноманітними ендогенними та екзогенними субстанціями, насамперед металами та активними формами кисню. Збільшення їх вмісту у клітинах повинно сприяти зменшенню специфічної токсичності іонів металів, а також пошкоджуючих впливів прооксидантних сполук через регуляцію внутрішньоклітинного вмісту фізіологічних металів, зокрема цинку та міді. Наприклад, показано, що зв'язування цинку з МТ сприяє стабілізації лізосомальних мембран та захисту клітин від окисного ушкодження

(Falfushynska et al., 2014 c). У проаналізованих нами прикладах вміст МТ переважно збільшувався. Лише за поєднаного впливу цинк-нанооксиду та підвищеної температури їх вміст відповідав рівню контролю і саме в цій групі за набором показників реакція організму була визначена як прояви токсичності.

Джерела інформації:

1. Diversity of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels / H. I. Falfushynska, L. L. Gnatyshyna, O.Yu. Osadchuk, A. Farkas, A. Vehovszky, D.O. Carpenter, J. Gyori, O.B. Stoliar // *Comp. Biochem. Physiol.* - 2014 a. - Vol. 164. - P. 51-58.

2. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae). / H. Falfushynska, L. Gnatyshyna, I. Yurchak, A. Ivanina, O. Stoliar, I.Sokolova// *Science of the Total Environment.* - 2014 b. - Vol. 500-501. - P. 339-350.

3. Responses of hepatic metallothioneins and apoptotic activity in *Carassius auratus gibelio* witness a release of cobalt and zinc from waterborne nanoscale composites. / H. Falfushynska L. Gnatyshyna, O. Turta, Stoliar O., N. Mitina, A. Zaichenko, R. Stoika // *Comp. Biochem. Physiol.* - 2014c. - P. 66-74.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки безпеки промислових металовмісних наноматеріалів із застосуванням біомаркерів, який включає визначення їх здатності до біодеградації та ефекту для біоти, який **відрізняється** тим, що у тканині травної залози двостулкового молюска перлівниці кліноподібної *Unio tumidus* визначають вміст металотіонеїнів (МТ), активність каспази-3 та катепсину Д (загальної, вільної (в), лізосомальної (л)), обраховують їх співвідношення (МТ+Катепсин Д (л))/(Каспаза-3+Катепсин Д (в)), відповідь організму на дію цинк-вмісного матеріалу класифікують за силою як "адапторна" або "токсична" та за механізмом як "ефект нанорозмірності" або "ефект металу" залежно від величини цього співвідношення і варіабельності абсолютного рівня його складових відносно запропонованих референтних значень.

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601