



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112982** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

A61K 45/00

B82Y 5/00

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 37/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 05924**

(22) Дата подання заявки: **01.06.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.01.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.01.2017, Бюл.№ 1**

(72) Винахідник(и):

**Срібна Валентина Олександрівна (UA),
Литвиненко Аліна Петрівна (UA),
Вознесенська Тетяна Юріївна (UA),
Грушка Наталія Георгіївна (UA),
Блашків Тарас Вірославович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О.
БОГОМОЛЬЦЯ НАНУ,
вул. Богомольця, 4, м. Київ-24, 01601 (UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК НУЛЬВАЛЕНТНОГО ЗАЛІЗА НА РЕПРОДУКТИВНУ ТА ІМУННУ СИСТЕМИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ У МИШЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки впливу наночастинок нульвалентного заліза на репродуктивну та імунну системи в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження у мишей, що базується на внутрішньовенному введенні наночастинок металу, причому в ньому як наночастинок використовують нульвалентне залізо сферичної форми, розміром 40 нм та 100 % вмістом заліза і вводять його в дозі 1,68 мг/кг, після чого оцінюють функціональні характеристики органів репродуктивної та імунної систем.

UA 112982 U

Корисна модель стосується галузі медицини та репродуктивних технологій. Зокрема, вона може бути використана для застосування нових матеріалів, наприклад наночастинок нульвалентного заліза для діагностики, профілактики й лікування різних захворювань у людини, що мають імунокомплексний компонент.

На сьогодні імуноопосередковане ушкодження відіграє суттєву патогенетичну роль при значній кількості захворювань. Останнім часом засвідчують широку розповсюдженість патологічних процесів із наявністю імунокомплексного компонента при аутоімунних, алергічних, запальних та інфекційних хворобах (системний червоний вовчак, гломерулонефрити, ревматоїдний артрит, системні васкуліти тощо) [1, 2, 3]. Відомо, що запальні процеси здатні збільшувати перекисне окиснення ліпідів, ушкодження білків та ДНК і переклювати клітинну загибель з апоптозу на некроз [4], таким чином посилюючи запалення, а також впливати на органи репродуктивної системи, зокрема на функціонування яєчників та скоротливість міометрія [4, 5, 6], що може спричинити порушення імплантації та передчасні пологи, а також призвести до безпліддя й нерезультативних спроб при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій.

На теперішній час нанотехнології займають провідне місце в науково-практичній діяльності людини і набувають широкого застосування в лікуванні та діагностиці захворювань різної етіології. Новітнім напрямком нанофармакології є використання нанопрепаратів як субстанції для нових лікарських засобів [7]. Перспективними в цьому аспекті є наночастинок металів [8]. Серед сучасних досліджень з нанобіотехнологій зовсім незначна їх частина присвячена дослідженню впливу тих чи інших нанопродуктів, наприклад наночастинок металів (вплив свинцю, наночастинок золота та срібла [9, 10]) на органи жіночої репродуктивної системи.

Існують дані, що різні речовини й матеріали при переведення їх у форму наночастинок значно змінюють свої фізико-хімічні властивості, а це може відображатися на їх фізіологічних ефектах в процесі всмоктування [11]. Аналіз даних літератури дозволяє припускати, що можливі зміни гострої токсичності хімічного елемента при переході до наноформи не перевищують одного порядку. Найбільшу ймовірність становить поява у наночастинок специфічної токсичності, зокрема розвиток порушень репродуктивної функції.

Ряд дослідників вивчали безпеку перорального введення наночастинок колоїдного срібла [12]. Вищезгадані автори провели вивчення впливу наночастинок срібла на репродуктивну функцію самок, стан здоров'я і кількість отриманого потомства в групах тварин, які одержували наночастинок. Дослідники показали, що у всіх групах (експериментальній та контрольній) не виявлено достовірної відмінності за кількістю і станом здоров'я приплоду (в середньому від 7 до 9 дитинчат) у першому та другому потомстві. Зовнішній вигляд і поведінка тварин не відрізнялися від приплоду в контрольній групі. Прирости маси тіла піддослідних тварин в першому і другому поколіннях розрізнялися незначною мірою. Тобто, отримані ними дані свідчать про відсутність токсичності препаратів наночастинок срібла на жіночу репродуктивну функцію.

Однак введення наночастинок срібла не досліджувалось на фоні імунних ушкоджень організму, тому ми вважаємо, що важливим є вивчення впливу наноматеріалів, зокрема наночастинок нульвалентного заліза (використання якого є найбільш перспективним з точки зору імунної системи) на жіночу репродуктивну функцію в умовах експериментальних імунних розладів.

Тому нами були досліджені властивості і зроблена оцінка дії на функціональну активність репродуктивної та імунної систем наночастинок нульвалентного заліза (Fe^0) (HCH_3).

Задачею корисної моделі було оцінити вплив наночастинок нульвалентного заліза на функціонування органів репродуктивної і імунної систем за умов моделювання імунокомплексного ушкодження у самок мишей.

Технічним результатом корисної моделі, що заявляється, є висока ефективність тестування наночастинок нульвалентного заліза для лікування хвороб з наявністю імунокомплексного компонента в патогенезі.

Суть корисної моделі полягає в тому, що спочатку в ньому викликають системне імунокомплексне ушкодження органів репродуктивної та імунної систем за допомогою введення мишам антигену - бичачого сироваткового альбуміну, а потім вводять експериментальну субстанцію наночастинок нульвалентного заліза (HCH_3) за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження мишам, яка впливає на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів, клітин тимуса і лімфатичних вузлів, на ступінь ушкодження ДНК клітин імунокомпетентних органів та фолікулярних клітин, а також на мейотичне дозрівання ооцитів та скоротливість матки.

Приклад

Дослідження проводилися на статевозрілих самицях мишей лінії СВА масою 18-22 г. При роботі дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Тварини були поділені на IV групи:

5 I - контроль (вводили фізіологічний розчин за схемою імунізації, N=6);

II - моделювання системного імунокомплексного ушкодження (внутрішньовенна імунізація мишей зростаючими дозами антигену - бичачого сироваткового альбуміну (БСА) раз на тиждень протягом 6 тижнів за такою схемою: 1 введення - 150 мг БСА/кг; 2 - 200 мг/кг; 3 - 250 мг/кг; 4 - 250 мг/кг; 5 - 300 мг/кг; 6 - 300 мг/кг маси миші, N=6);

10 III - введення субстанції наночастинок нульвалентного заліза (НЧНЗ - сферичної форми, розміром 40 нм, з 100 % вмістом заліза, синтезовані в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України) (НЧНЗ вводили внутрішньовенно (в/в), в дозі 1,68 мг/кг, N=6);

IV - моделювання системного імунокомплексного ушкодження + введення НЧНЗ (за 1 годину перед кожною імунізацією вводили в/в НЧНЗ в дозі 1,68 мг/кг, N=6).

15 На 7 добу після останньої імунізації тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники, матку, тимус, пахові лімфатичні вузли для подальшого дослідження.

Показано, що системне імунокомплексне ушкодження, відтворене за допомогою імунізації мишей БСА, призводить до патологічних змін в різних органах у тварин. Було встановлено, що генералізований імунокомплексний патологічний процес призводить до пошкодження ДНК і загибелі фолікулярних клітин та імунокомпетентних клітин як центрального (тимуса), так і периферичних органів імунної системи (лімфовузлів, селезінки). Встановлено суттєве ушкодження яєчників мишей. Виявлене ушкодження скоротливої активності матки.

20 Застосування наночастинок нульвалентного заліза для діагностики, профілактики й лікування різних захворювань матиме важливе не тільки медичне, але і соціально-гуманітарне значення.

25 Тому нами була досліджена можлива протективна або токсична дія наночастинок нульвалентного заліза (НЧНЗ) на органи репродуктивної і імунної систем мишей при розладах імунного ґенезу (моделювання системного імунокомплексного ушкодження).

30 Проведені дослідження показали, що за умов імунізації БСА у мишей введення НЧНЗ призводило в оваріальному відділі матки (ОВ), розташованому ближче до яєчника до зменшення величин амплітуди в 4,3 разу ($p < 0,001$), індекс скорочень (IC) в 4,5 разу ($p < 0,001$), частоти скорочень на 19,3 % ($p < 0,05$) у порівнянні з такими величинами у тварин, імунізованих БСА. У нижньому або цервікальному (ЦВ), розташованому ближче до шийки матки відділу, теж відбувалось зменшення величин амплітуди в 8,9 разу ($p < 0,001$), IC в 8,7 разу ($p < 0,001$), частоти скорочень в 1,6 разу ($p < 0,001$) у порівнянні з імунізованими БСА тваринами.

35 Отже, застосування НЧНЗ за умов імунізації БСА зумовлювало зменшення величин амплітуди, IC та частоти скорочень як в ОВ, так і в ЦВ, що наближувало дані до значень контролю.

40 Застосування НЧНЗ на тлі імунізації БСА сприяло змінам параметрів скоротливості в напрямку контрольних значень, однак такі зміни призводили до пригнічення скоротливості в порівнянні з інтактними тваринами, що свідчить про певний інгібуючий ефект даної субстанції за умов імунного запалення. Інгібуючий ефект НЧНЗ на параметри скоротливості у імунізованих мишей був сильніше виражений у ЦВ матки, і проявлявся у надмірному зменшенні величин амплітуди та IC до значень, статистично нижчих від контрольних.

45 Таким чином, вперше показано, що застосування НЧНЗ за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження пригнічувало скоротливість матки, особливо ЦВ міометрія. Отже, показано, що досліджувані НЧНЗ за супутніх розладів імунного ґенезу можуть мати інгібуючий вплив на скорочувальну функцію матки.

50 Вперше показано, що введення мишам НЧНЗ за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження спричиняє зменшення пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів (табл. 1) як на стадії розчинення зародкового пухирця (Метафаза I), так і на стадії формування першого полярного тільця (Метафаза II), відповідно на 18 % і 12 % у порівнянні з такими величинами при імунокомплексному ушкодженні.

Таблиця 1

Групи тварин	Стадія мейотичного дозрівання ооцитів	
	метафаза I, %	метафаза II, %
Контроль	80,99±0,79	46,67±2,13
Імунізація БСА	56,70±2,81**	25,33±1,69**
НЧНЗ	78,47±1,28	30,69±1,96*
БСА + НЧНЗ	74,89±1,66	37,29±2,14*

* - $p<0.05$; ** - $p<0.01$ - відносно контролю

- 5 Введення експериментальної субстанції наночастинок нульвалентного заліза за умов моделювання системного імунотоксичного ушкодження мишам призводить до зменшення пригнічення життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів - кількість живих клітин зростає у порівнянні з величинами за умов моделювання системного імунотоксичного ушкодження (табл. 2, апоптоз і некроз клітин фолікулярного оточення).

Таблиця 2

Група тварин	Живі клітини, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	88,0±0,97	10,50±0,96	1,50±0,22
Імунізація БСА	58,14±1,24**	29,86±0,86**	12,00±0,82**
НЧНЗ	81,80±1,64	15,80±1,11	2,40±0,36
БСА + НЧНЗ	70,40±1,07*	24,80±0,97**	4,80±0,46*

* - $p<0.05$; ** - $p<0.01$ - відносно контролю

- 10 У тимусі і лімфатичних вузлах - кількість живих клітин зростає (табл. 3 - апоптоз і некроз клітин тимуса та табл. 4 - апоптоз і некроз клітин лімфатичних вузлів) у порівнянні з величиною за умов моделювання системного імунотоксичного ушкодження, а кількість імунотоксичних клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу зменшується ($p<0,01$).

15

Таблиця 3

Група тварин	Живі клітини, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	89,86±0,8	5,57±0,53	4,57±0,54
Імунізація БСА	62,6±0,4**	27,96±0,95**	9,41±0,83*
НЧНЗ	86,2±0,7	11,4±0,81**	2,4±0,28
БСА + НЧНЗ	77,07±0,8*	18,32±0,78**	4,61±1,78

* - $p<0.05$; ** - $p<0.01$ - відносно контролю

Таблиця 4

Група тварин	Живі клітини, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	82,14±1,5	13,57±3,2	4,29±1,2
Імунізація БСА	62,87±1,2**	24,22±2,2**	12,9±1,7**
НЧНЗ	93,05±2,7**	5,43±1,9**	1,50±1,9*
БСА + НЧНЗ	88,85±2,1	6,43±0,9**	4,71±2,9

* - $p<0.05$; ** - $p<0.01$ - відносно контролю

- 20 Вперше встановлено, що введення тваринам НЧНЗ при моделюванні імунотоксичного патологічного процесу, не призводить до пошкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів (табл. 5), тимуса (табл. 6) і лімфатичних вузлів (табл. 7).

Таблиця 5

Група тварин	0-/1-(%)	2-(%)	3-(%)	4-(%)
Контроль	88,72±1,33	9,1±2,11	2,18±0,54	0±0
Імунізація БСА	15,23±2,45	21,53±2,11	33,39±3,61	29,85±3,97
НЧНЗ	70,11±2,55	24,06±2,19	5,83±3,П	0±0
БСА + НЧНЗ	33,81±3,23	44,51±1,86	19,45±2,82	2,23±1,67

Таблиця 6

Група тварин	0-/1-(%)	2-(%)	3-(%)	4-(%)
Контроль	97,41±7,43	2,3±2,16	0,29±0,78	0±0
Імунізація БСА	8,36±6,72	17,53±3,20	36,31±12,67	37,80±10,61
НЧНЗ	72,17±8,53	22,67±8,91	5,17±3,43	0±0
БСА + НЧНЗ	29,51±7,63	48,55±11,13	21,65±5,82	0,29±0,76

Таблиця 7

Група тварин	0-/1-(%)	2-(%)	3-(%)	4-(%)
Контроль	93,50±4,05	4,17±1,94	2,33±1,37	0±0
Імунізація БСА	12,16±7,25	18,16±13,28	34,25±10,91	35,43±15,97
НЧНЗ	55,71±5,32	27,39±5,61	16,90±3,19	0±0
БСА + НЧНЗ	25,00±5,56	27,40±5,41	33,20±8,61	14,40±7,02

- 5 Таким чином, введення експериментальної субстанції наночастинок нульвалентного заліза (НЧНЗ) за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження мишам призводить до зменшення пригнічення життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів, клітин тимуса і лімфатичних вузлів, а саме до зростання кількості живих клітин і зменшення клітин з морфологічними ознаками некрозу і апоптозу, а також до зменшення ушкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів. Мейотичне дозрівання ооцитів відновлюється на рівні контрольних значень. Проте наночастинки нульвалентного заліза при розладах імунного генезу проявляють пригнічуючу дію на скоротливість міометрія.

Джерела інформації:

1. Скрипченко и др. // Журнал инфектологии. - 2010. - Т. 2, № 1. - С. 7-17.
- 15 2. Шмагель, Черешнев // Биохимия. - 2009. - Т. 74, № 5. - С. 581-592.
3. Jancar, Crespo // TRENDS in Immunology. - 2005. - Vol. 26, № 1. - P. 48-55.
4. Grushko N.G. et al. // Physiological Journal. - 2014. - Т. 61, № 1. - P. 28-35.
5. Voznesenska T.Y. et al. // Journal of Medical and Biological Problems. - 2013. - Vol. 2(100). - P. 125-128.
- 20 6. Volkov N.O. et al. // Pathology. - 2014. - Vol. 1(30). - P. 100-104.
7. Rosenfeld L.G. et al. // Ukr. med. Journal. - 2008. - Vol. 67 (5). - P. 63-68.
8. Kapse-Mistry S. et al. // Front Pharmacol. - 2014. - Vol. 5. - P. 159.
9. Савенкова О.О. та інші // Світ медицини та біології. - 2013. - №3. - С. 35.
10. Handy R.D et al. // Health, Risk & Society. - 2007. - Vol. 9. - P. 125
- 25 11. Levinski N. et al. // Small J. - 2008. - Vol. 4, № 1. - P. 26-49.
12. Петрицкая Е.Н. и др. // Альманах клинической медицины. - 2011. - № 25. - С. 1-12.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 30 Спосіб оцінки впливу наночастинок нульвалентного заліза на репродуктивну та імунну системи в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження у мишей, що базується на внутрішньовенному введенні наночастинок металу, який **відрізняється** тим, що в ньому як наночастинки використовують нульвалентне залізо сферичної форми, розміром 40 нм та 100 % вмістом заліза і вводять його в дозі 1,68 мг/кг, після чого оцінюють функціональні
- 35 характеристики органів репродуктивної та імунної систем.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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

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