



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92804** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
B01J 13/00
C01G 49/00
C10L 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 01499	(72) Винахідник(и): Романько Марина Євгенівна (UA), Оробченко Олександр Леонідович (UA), Куцан Олександр Тихонович (UA), Ушкалов Валерій Олександрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.02.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.09.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2014, Бюл.№ 17	(73) Власник(и): Романько Марина Євгенівна, вул. Луї Пастера, 322, кв. 176, м. Харків, 61176 (UA), Оробченко Олександр Леонідович, вул. Блюхера, 35/81, кв. 422, м. Харків, 61123 (UA), Куцан Олександр Тихонович, вул. Н. Ужвій, 80, кв. 196, м. Харків, 61195 (UA), Ушкалов Валерій Олександрович, вул. Антонова, 17, кв. 17, м. Київ, 03151 (UA)

(54) НАНОКОМПОЗИТ МЕТАЛІВ, ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ КОМПОНЕНТ БІОПРЕПАРАТІВ І КОРМОВИХ ДОБАВОК ДЛЯ ТВАРИН**(57) Реферат:**

Наноккомпозит металів як потенційний компонент біопрепаратів і кормових добавок для тварин, що містить металеві наночастки, переважно сферичної форми, в якому розміри наночасток складають від 30 нм до 100 нм, метали вибрані з групи, що складається з срібла (Аргентуму), міді (Купруму), заліза (Феруму), оксиду марганцю (Мангану). Наночастки синтезовані за методом хімічної конденсації, та за умов дослідження in vitro на моделі субклітинних фракцій культури клітин СНО-K1 не проявляють загальної токсичності і генотоксичності та має наступний структурний, якісний та кількісний склад за співвідношенням компонентів, об'єм %:

колоїдний розчин наночасток Аргентуму (з концентрацією 1600,0 мкг/см³ за металом, середнього розміру (~31,5±0,9) нм) - 0,625 %;

колоїдний розчин наночасток Феруму (з концентрацією 10000,0 мкг/см³, (~100,0±10,0) нм) - 0,100 %

колоїдний розчин наночасток двоокису Мангану (з концентрацією 2785,0 мкг/см³, (~50,0±3,0) нм) - 0,359 %;

колоїдний розчин наночасток Купруму (з концентрацією 2560,0 мкг/см³, (~70,0±5,0) нм) - 0,391 %;

вода дистильована - 98,525 %.

UA 92804 U

Корисна модель належить до області нанобіотехнологій, а саме до використання нанотехнологій у ветеринарній медицині та тваринництві для підвищення продуктивності та якості сільськогосподарської продукції.

Відомий колоїдний розчин металу, що містить частинки сполук рідкоземельного елемента, кислоти і розчинник, вибраний з неполярних вуглеводнів, причому щонайменше 90 % часток є монокристалічними, а сама дисперсія може бути отримана реакцією солі рідкоземельного елемента з дугою в лужному середовищі (Патент РФ №2242275. Органическая коллоидная дисперсия монокристаллических частиц соединения редкоземельного элемента. МПК 1301J13/00, C10L1/10. Опубл. 2004.12.20).

Недоліком відомого колоїдного розчину є обмежена область застосування, що належить до присадок до палива для двигунів внутрішнього згорання.

Найбільш близьким аналогом до того, що заявляється, є колоїдний розчин наночасток металу або суміші металів (Патент України № 27080, МПК B01J 13/00, C01G 49/00, C10L 10/00 (2007) / Колоїдний розчин наночасток металу або суміші металів [Текст] / Косінов М.В., Каплуненко В.Г. Заявник і власник патенту Косінов М.В., Каплуненко В.Г.; заявл. 10.07.2007. - № у 2007 07776; опубл. 10.10.2007. - Бюл. № 16.-3 е.), що містить металеві наночастки, в якому розміри наночасток складають від 1 нм до 100 нм, метали вибрані з групи, що складається з срібла, золота, платини, паладію, міді, родію, іридію, нікелю, заліза, марганцю, ванадію, вольфраму, молібдену, кобальту, танталу, титану, алюмінію, магнію, цинку, олова. Металеві наночастки мають переважно сферичну форму, мають електричний поверхневий заряд, а молекули діелектричної рідини наелектризовані і утворюють оболонки навколо металевих наночасток.

Основним недоліком цього колоїдного розчину є використання металів у нанорозмірній формі, що можуть мати генотоксичні властивості (Кобальт, Цинк та ін.), що унеможлиблює використання його у ветеринарній медицині та тваринництві.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити наноконпозиційну суміш металів (НкМе) для застосування у тваринництві та ветеринарній медицині, що відрізняється дослідженням загальної токсичності наночасток металів за умов *in vitro* на моделі субклітинних фракцій культури клітин CHO-K1, визначенням їх гено- і загальнотоксичних властивостей за умов *in vitro* та включає використання суміші колоїдних розчинів наночасток Аргентуму, Феруму, двоокису Мангану та Купруму, які мають сферичну геометрію, синтезовані за методом хімічної конденсації і в розмірному діапазоні (27,0-100,0) нм за наступного співвідношення компонентів, об'єм%:

Колоїдний розчин наночасток Аргентуму (з концентрацією 1600,0 мкг/см³ за металом, середнього розміру (~31,5±0,9) нм) - 0,625 %;

Колоїдний розчин наночасток Феруму (з концентрацією 10000,0 мкг/см³, (~100,0±10,0) нм) - 0,100 %

Колоїдний розчин наночасток двоокису Мангану (з концентрацією 2785,0 мкг/см³, (~50,0±3,0) нм) - 0,359 %;

Колоїдний розчин наночасток Купруму (з концентрацією 2560,0 мкг/см³, (~70,0±5,0) нм) - 0,391 %;

Вода дистильована - 98,525 %.

Порівняльний аналіз технічного рішення з прототипом дозволяє зробити висновок, що спосіб, який заявляється, відповідає критерію "новизна".

Наноконпозиційну суміш металів (НкМе) складали за результатами визначення гено- та загальнотоксичної дії таких наночасток (NP) металів - Аргентуму, Феруму, двоокису Мангану, Купруму, гексаціаноферату Кобальту, Кобальту та Цинку на моделі ізольованих субклітинних фракцій тест-культури клітин CHO-K1. Дослідні зразки NP металів синтезовані за методом хімічної конденсації [Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / под ред. А.В. Перцова. - М.: Изд-во МГУ, 1976. - 132 с.] та мають сферичну геометрію

Приклад 1. Визначення генотоксичності дослідних зразків наночасток металів за методом лужного гель-електрофорезу ("ДНК- комет") на моделі еукаріотичних тест-клітин CHO-K1.

Визначення генотоксичних властивостей наночасток металів здійснювали за методом лужного гель-електрофорезу еукаріотичних клітин яєчника китайського хом'ячка CHO-K1 [Didenko, V. Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols [Текст] / Edited by Vladimir V. Didenko. - Humana Press, 2002. - V. 203. - 279 p.]. Клітини культури CHO-K1 нарощували на середовищі F10 ("Sigma", США), що містить 5 % ембріональної сироватки ВРХ ("Gibco", США) до титру (5·10⁵)кл/см³. Кількість живих клітин, визначених за допомогою фарбування 0,3 % розчином трипайового синього, складала не менш ніж 90 %.

Визначення генотоксичності NP металів здійснювали у реакційній суміші, що містить 67 мкл суспензії тест-клітин і 33 мкл NP за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Час інкубації клітин CHO-K1 із зразками NP металів складав 18 год. "Позитивним" контролем вважали клітини CHO-K1, оброблені N-нітрозометилсечовиною (тест-мутаген) в концентрації 1 мМ протягом 48 год.;

5 "негативним" контролем - клітини CHO-K1 в розчині ДМСО.

Для фарбування мікропрепаратів "ДНК-комет" використовували флуоресцентний барвник акридиноий жовтогогарячий.

10 Флуоресцентну мікроскопію мікропрепаратів здійснювали за умов: збуджуючий фільтр 490 нм, дихроїчне дзеркало 510, відтинаючий фільтр 530 нм, збільшення $\times 200-400$. На кожний мікропрепарат аналізували не менш ніж 100 "ДНК-комет" без накладень "хвостів".

Аналіз "ДНК-комет" проводили візуально. При цьому "ДНК-комети" розподіляли на п'ять умовних типів із відповідним для кожного числовим значенням від 0 до 4. Ступінь пошкодження ДНК при цьому виражали як індекс "ДНК-комет" ($I_{\text{ДНК}}$), який обчислювали за формулою 1:

$$2_{\text{AI}} = \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{\Sigma}, (1)$$

15 де $n_0 - n_4$ - число "ДНК-комет" кожного типу,

Σ - сума "ДНК-комет".

Експерименти виконані в 6 повторях та у двох паралелях.

20 Статистичну обробку результатів проводили по кожній експериментальній точці шляхом порівняння показників ушкодження ДНК в дослідній та контрольних групах. Критерієм позитивного результату слугував статистично достовірний відтворюваний ефект.

Результати дослідження генотоксичності NPCo, гексаціаноферату NPCo і NPZn свідчить про наявність такої властивості у даних наночастинок у всьому вивченому концентраційному діапазоні. Так, клітини лінії CHO-K1, оброблені такими дискретними наночастиками, фіксували наявність первинних ДНК-пошкоджень. На фіг. 1 зображено приклади типових пошкоджень "ДНК-комет"

25 завдяки генотоксичного впливу NPCo (фіг. 1, А) і NPZn (фіг. 1, Б).

Значення індексу "ДНК-комет", який характеризує рівень пошкоджень генетичного апарата еукаріотичних клітин, сягає значень, що близькі до таких у "позитивному" контролі (табл. 1). Таким чином, дослідні зразки гексаціаноферату NPCo, саме NPCo і NPZn проявляють гепотоксичну дію щодо ізолюваних тест-клітин CHO-K1 у діапазоні концентрацій $(0,12-830,00)$ мкг/см³ за металом, тобто вони є небезпечними. Наночастки таких металів можуть бути промутагенами і впливати на генетичний апарат клітин з подальшим утворенням ДНК-аддуктів, алкільованої ДНК тощо.

30 Дослідження генотоксичності NPCu, NPFe, NPAg та двоокису NPMn показало відсутність для них такої властивості у всьому вивченому концентраційному діапазоні. Так, в зразках еукаріотичних клітин CHO-K1, оброблених такими дискретними наночастиками, не реєстрували первинних ДНК-пошкоджень. На фіг.2 проілюстровано типове зображення непошкодженої ДНК клітин лінії CHO-K 1 на прикладі впливу NPFe.

Значення індексу "ДНК-комет" сягають таких у "негативному" контролі та становлять у середньому $(0,010 \pm 0,001) \%$ (табл. 1). Тобто, дослідні зразки NPCu, NPFe, NPAg та двоокису NPMn в вивченому концентраційному діапазоні можна вважати біобезпечними.

Приклад 2. Визначення загальної токсичності дослідних зразків наночастинок металів за біохімічними маркерами на моделі ізолюваних фракцій тест-клітин CHO-K1.

45 Дослідження загальної токсичності дослідних зразків NP металів проводили, використовуючи біохімічні маркери - активність АТР-ази (КФ 3.6.3.6) та лактатдегідрогенази (ЛДГ-аза, К Ф 1.1.1.27), - на моделі субклітинних фракцій еукаріотичних клітин CHO-K 1.

Для цього проводили преінкубацію зразків NP металів протягом 3 хв з препаратами сумарної мембранної фракції тест-клітин (кінцева концентрація білка - $(150-200)$ мкг/см³) у кінцевій концентрації 1 мкг/мл за кожним металом за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

50 При визначенні активності АТР-ази використовували середовище інкубації, що містить 50 мМ Трис-НСІ, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ АТР (рН=7,5). В "контрольну" пробу замість NP металів додавали 20 мМ Трис-НСІ буфер. Час інкубації тривав 10 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1 см³ 10 % розчину ТХО. Величину АТР-ої активності визначали спектрофотометрично за накопиченням неорганічного фосфору (P_i) методом Фіске-Суббароу, обчислювали за формулою 2:

55
$$A = \frac{D_h \times 4 \times \text{Ctg}\alpha \times 1000}{B \times t}, (2)$$

де А - активність АТР-ази;

В - кількість білка в пробі, мкг;

t - час інкубації, що складає 10 хв;

1000 - перерахунок мкг у мг;

D_p - оптична густина проби, яка відповідає P_i за калібрувальною кривою;

$\text{ctg}\alpha - \text{ctg}$ кута нахилу калібрувальної кривої, який дорівнює 1,8;

4 - коефіцієнт перерахунку (враховують кювету при побудові калібрувальної кривої (0,25 см - 1,00 см)).

Результати виражали у відносних одиницях A/A_0 ,

де A_0 - величина АТР-ної активності МФ "контрольної" проби;

A - величина АТР-ної активності МФ після взаємодії з наночастками металів ("дослідна" проба).

10 Активність ЛДГ-ази у "дослідній" та "контрольній" пробах визначали спектрофотометрично за швидкістю окиснення NADH у середовищі інкубації, що містить 50 мМ К-фосфатний буфер, 0,3 мМ піруват-Na та 9 мМ NADH (рН 7,5). Активність ЛДГ-ази виражали у мкмоль NADH /хв•мг білка та розраховували за формулою 3:

$$A = \frac{\Delta D \times V}{6,2 \times 2 \times a}, \quad (3)$$

15 де ΔD - середнє значення зміни оптичної густини проби за 1 хв;

V - кінцевий об'єм проби, що дорівнює 3,15 см³;

6,22 - коефіцієнт мікромолярної екстинкції відновленої форми піридинових нуклеотидів;

a - кількість білка в пробі, визначеного методом Лоурі, мг.

20 Результати виражали у відносних одиницях, порівнюючи абсолютні величини ферментативних активностей "дослідного" та "контрольного" зразків.

Токсичними вважали зразки NP металів у випадку стимуляції активності ЛДГ-ази за взаємодії з цитозольною фракцією клітин CHO-K1 не менш, ніж на 20 %, та інгібіції активності АТР-зи з мембранною фракцією не менш ніж на 50 %, відносно їх рівня у "контрольній" пробі.

25 Результати досліджень загальної токсичності дослідних зразків гексаціаноферрату NPCo, саме NPCo, NPZn, NPAg, NPFe, NPCu та двоокису NPMn з субклітинними фракціями клітин CHO-K1 за визначенням величин біохімічних маркерів у порівнянні з такими в "контролі" наведені в таблиці 2. Так, визначено, що під впливом гексаціаноферрату NPCo і саме NPCo визначено вірогідне гальмування активності мембранної АТР-ази та посилення цитозольної ЛДГ-ази відносно їх значень в "контрольній" пробі. За додавання у інкубаційну суміш NPZn встановлювали тенденцію до зміни активностей індикаторних ферментів.

30 Результати щодо активності ферментів у субклітинних фракціях клітин CHO-K 1 внаслідок взаємодії з NPAg, NPFe, NPCu та двоокису NPMn дозволяють вважати їх нетоксичними, а враховуючи відсутність їх генотоксичної та мутагенної дії щодо тест-клітин, біобезпечними.

35 За підсумком одержаних даних, було вибрано безпечні зразки NPAg, NPFe, NPCu та двоокису NPMn, як складові наноконструкції металів (НкМе) у аліквотному співвідношенні з кінцевою концентрацією 100 мкг/см³ за кожним металом. Даний НкМе знайде широке впровадження і використання у технологіях отримання як біологічних засобів, так й кормових добавок (нанонутрицевтиків) з перспективою застосування у ветеринарній медицині та тваринництві.

40

Таблиця 1

Значення індексу "ДНК-комет" за умов впливу дослідних наночасток металів щодо генетичного апарата ізолюваних тест-клітин CHO-K1 ($M \pm m$; $n=6$)

Наночастки металів, робоча концентрація, С,	Індекс "ДНК-комет", $I_{\text{ДНК}}$
NPCo, вихідна C=1991,6 мкг/мл за металом	
NPCo (C=664,00 мкг/мл)	3,8±0,2*л
NPCo (C= 124,00 мкг/мл)	3,4±0,2*
NPCo (C=0,12 мкг/мл)	3,1±0,2*
гексаціаноферат NPCo, вихідна C=2489,0 мкг/мл за металом	
гексаціаноферат NPCo (C=830,00 мкг/мл)	3,4±0,2*
гексаціаноферат NPCo (C=155,00 мкг/мл)	3,0±0,2*
гексаціаноферат NPCo (C=0,16 мкг/мл)	3,0±0,2*
NPCu, вихідна C=2678,6 мкг/мл за металом	
NPCu (C=823,00 мкг/мл)	0,30±0,02*
NPCu (C=226,00 мкг/мл)	0,10±0,02
NPCu (C=0,22 мкг/мл)	0,10±0,02
NPZn, вихідна C=2407,0 мкг/мл за металом	
NPZn (C=802,00 мкг/мл)	3,9±0,2*
NPZn (C=150,00 мкг/мл)	3,8±0,2*
NPZn (C=0,25 мкг/мл)	3,1±0,2*
двоокис NPMn, вихідна 02785,0 мкг/мл за металом	
NPMn (C=928,00 мкг/мл)	0,03±0,01
NPMn (C=433,00 мкг/мл)	0,02±0,01
NPMn (C=238,00 мкг/мл)	0,02±0,01
NPMn (C=0,24 мкг/мл)	0,02±0,01
NPFe, вихідна C=3174,0 мкг/мл за металом	
NPFe (C=1061,00 мкг/мл)	0,010±0,001
NPFe (C=255,00 мкг/мл)	0,010±0,001
NPFe (C=0,25 мкг/мл)	0,010±0,001
NPAg, вихідна C=86,4 мкг/мл за металом	
NPAg (C=27,80 мкг/мл)	0,010±0,001
NPAg (C=0,28 мкг/мл)	0,010±0,001
контроль	
«Негативний" контроль	(0,010±0,001)-(0,100±0,001)
«Позитивний" контроль	3,9±0,1

Примітка. * - різниця значень вірогідна при ($p \leq 0,05$) відносно значень такого показника у "негативному" контролі.

Таблиця 2

Активність мембранної АТР-ази та цитозольної ЛДГ- ази тест-клітин лінії CHO-K1 за впливу дослідних зразків наночастинок металів ($M \pm m$; $n=5$).

Наночастки металів/контроль	Активність ЛТР- ази, ум.од.	Активність ЛДГ- ази, ум.од.
Контроль (субклітинні фракції інтактних клітин)	1,300 \pm 0,030	0,970 \pm 0,020
Субклітинні фракції + гексаціаноферат NРСо	1,080 \pm 0,006*	1,460 \pm 0,040*
Субклітинні фракції + NРСо	1,020 \pm 0,002	1,520 \pm 0,052*
Субклітинні фракції + NPZn	1,100 \pm 0,030	1,270 \pm 0,080
Субклітинні фракції + NРAg	1,220 \pm 0,005	0,900 \pm 0,002
Субклітинні фракції + NPFe	1,120 \pm 0,007	1,140 \pm 0,006
Субклітинні фракції + NРCu	1,250 \pm 0,008	1,250 \pm 0,015
Субклітинні фракції + двоокису NPMn	1,310 \pm 0,025	1,080 \pm 0,004

Примітка. * - різниця значень вірогідна при ($p \leq 0,05$) відносно значень такого показника у контролі.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Наноккомпозит металів, як потенційний компонент біопрепаратів і кормових добавок для тварин, що містить металеві наночастки, переважно сферичної форми, в якому розміри наночастинок складають від 30 нм до 100 нм, метали вибрані з групи, що складається з срібла (Аргентуму), міді (Купруму), заліза (Феруму), оксиду марганцю (Мангану), який **відрізняється** тим, що наночастки синтезовані за методом хімічної конденсації та за умов дослідження in vitro на моделі субклітинних фракцій культури клітин CHO-K1 не проявляють загальної токсичності і генотоксичності та має наступний структурний, якісний та кількісний склад за співвідношенням компонентів, об'єм %:

10

колоїдний розчин наночастинок Аргентуму (з концентрацією 1600,0 мкг/см³ за металом, середнього розміру (~31,5 \pm 0,9) нм) - 0,625 %;

15

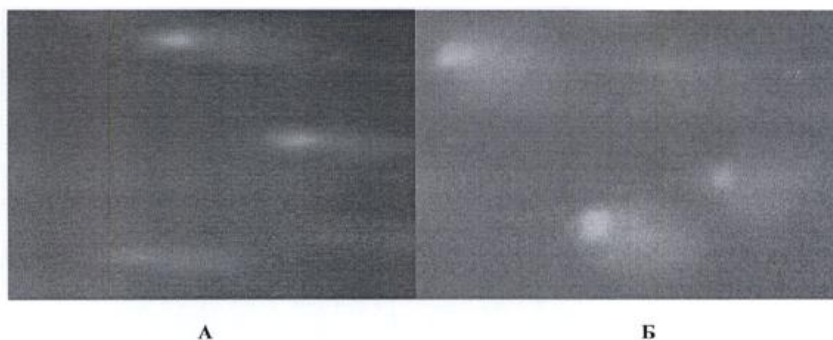
колоїдний розчин наночастинок Феруму (з концентрацією 10000,0 мкг/см³, (~100,0 \pm 10,0) нм) - 0,100 %

колоїдний розчин наночастинок двоокису Мангану (з концентрацією 2785,0 мкг/см³, (~50,0 \pm 3,0) нм) - 0,359 %;

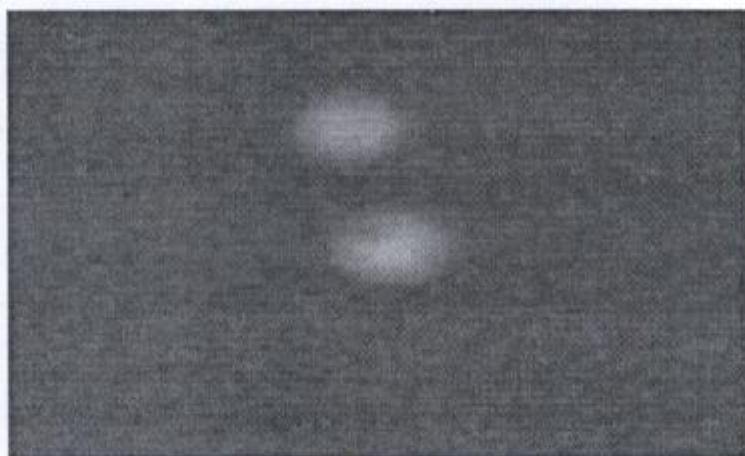
20

колоїдний розчин наночастинок Купруму (з концентрацією 2560,0 мкг/см³, (~70,0 \pm 5,0) нм) - 0,391 %;

вода дистильована - 98,525 %.



фіг.1



фіг.2

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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