



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **51142** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 39/12
A61K 33/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ПРЕПАРАТУ З ВИКОРИСТАННЯМ ІНФУЗОРІЇ ТЕТРАХІМЕНІ ПІРІФОРМІС

1

2

(21) u200911162

(22) 03.11.2009

(24) 12.07.2010

(46) 12.07.2010, Бюл.№ 13, 2010 р.

(72) КОВАЛЕНКО ВЯЧЕСЛАВ ЛЕОНІДОВИЧ, ТЕ-
РЕЩЕНКО СВІТЛАНА МИХАЙЛІВНА

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Спосіб оцінки токсичності дезінфікуючого пре-
парату з використанням інфузорії тетрахімени пі-

ріформіс, що включає постановку і підтвердження
діагнозу за допомогою визначення кінцевого ре-
зультату, який **відрізняється** тим, що після вне-
сення її в кількості 20 особин у дану речовину з
5мл, підрахунок ведуть з самого початку протягом
1 години за рахунок процентної кількості тетрахі-
нем піріформіс, що вижили, відносно загальної
кількості початкових інфузорій, що характеризує
інтенсивність гострого процесу та знаходиться в
прямому зв'язку з рівнем клітин організму тварин.

Корисна модель відноситься до галузі ветери-
нарної експертизи та токсикології і може бути ви-
користаний в роботі наукових та науково-
виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

Кілька речень щодо важливості оцінки дезпре-
паратів за ступенем впливу на макроорганізм, а
саме - за рівнем токсичності.

Для вивчення оцінки гострої токсичності пре-
паратів використовують методи на біологічних
об'єктах. Виявлено, що щури і миші, хоча і дають
вихід токсикологічної інформації на організм лю-
дини і сільськогосподарських тварин, але все ж
такі не дозволяють прослідкувати процес дії без-
посередньо на клітину. До того ж традиційні мето-
ди дорогі, громіздкі і не дають можливості швидко
виявляти тератогенний і канцерогенний ефект, тому
актуально запропонувати експрес-метод з викори-
станням тетрахімени для оцінки впливу на орга-
нізм ксенобіотиків, зокрема, дезінфектантів [1]. В
клінічній практиці застосовуються різні методи
оцінки ступеню токсичності, які визначають її
вплив на стан організму тварин. Такими рутинними
клінічними методами є, наприклад, визначення
певних показників лейкоцитарних реакцій. Вони
методично нескладні, проте не є адекватними при
гострих станах [2].

Непрямі методи (хімічні і фізичні), які викорис-
товують в практиці часто дають результати, не
співпадаючі з даними біологічної оцінки, які прово-
диться безпосередньо на живому організмі.

Діагностика токсичності з використанням біо-
логічних об'єктів (лабораторні тварини) вимагає
додаткового біометаріалу та досить значного часу
для отримання результатів [3,4]. Неспецифічним,
але динамічним і інформативним показником ен-
догенної інтоксикації вважають рівень продуктів
перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), зокрема,
кінцевого метаболіта - малонового діальдегіду
(МДА) [5,6].

Використання тетрахімени піріформіс для ток-
сико-біологічної оцінки обумовлено тим, що в бі-
льшості випадків цей тест-організм реагує на дію
хімічних і біологічних чинників адекватно біотвари-
ною. Крім того, використання останні у ряді випад-
ків не представляється можливим або експериме-
нти на них складні і тривалі, тоді як застосування
тетрахімени піріформіс дозволяє швидко отримати
достовірну інформацію.

Його використання дає можливість протягом 1
години зробити попередній висновок про наявність
рівня токсинів хімічного походження і дозволяє
визначити в 7 разів швидше, ніж на білих щурах.

Таким чином, використання війчастої інфузорії
тетрахімена піріформіс в дослідженнях на токсич-
ність є перспективним напрямком, особливо при
розробці хімічних препаратів.

Метод не вимагає дефіцитних дорогих реакти-
вів і устаткування, дає зрізавні результати з дослі-
дженнями на вищих тваринах, а також дозволяє
дати оцінку в тих випадках, коли їх неможливо

(13) **U**

(11) **51142**

(19) **UA**

вивчити на вищих тваринах. Тривалість дослідження складає 1 година.

Найбільш близьким за технічною суттю до заявляемого способу є визначення токсичності води за допомогою інфузорії.

Визначення токсичності води проводиться наступним чином [7,8]:

1. Принцип методу: за певний проміжок часу проходить гибель інфузорій в розчинах дезінфектанту, за рахунок чого можна визначити його токсичність.

2. Реактиви.

2.1. Пептон бактеріологічний.

2.2. Екстракт дріжджів.

2.3. Вода дистильована.

2.4. Глюкоза (порошок).

3. Устаткування і апаратура.

3.1. Термостат.

3.2. Центрифуга лабораторна.

3.3. Автоклав.

3.4. Терези аналітичні.

3.5. Пробірки хімічні та центрифужні.

3.6. Колби.

3.7. Піпетки вимірювальні.

3.8. Пастерівські піпетки.

4. Матеріал для дослідження.

Матеріалом для дослідження є розчини дезінфектанту.

5. Хід визначення.

5.1. Відібрані проби розливають по 2мл у флакони, потім додають в кожен по 0,04мл (одну краплю) 3-добової культури інфузорій, вирощених на лептонному середовищі. Кожну пробу води досліджують в трьох повторностях.

Контролем при аналізі служать наступні флакони:

- що містять тільки 0,56%-ний розчин аптечної морської солі;

- що містять відстояну водопровідну воду;

5.2. Флакони ретельно струшують і поміщають в термостат при температурі +25°C, або залишають при кімнатній температурі (+18-25°C) на 24 години. Протягом доби флакони 3-4 рази струшують з метою аерації середовища.

5.3. Через 1, 4, 6, 24 години пастерівською піпеткою беруть краплю культури інфузорій і переглядають під мікроскопом.

5.4. Після попередньої оцінки досліджуваної води проводять підрахунок кількості інфузорій в дослідних та контрольних пробах. Показником живильної цінності служить число (виражене у відсотках) інфузорій, що виросли за 3 дні, на дослідному зразку по відношенню до числа клітин, що виросли в контролі.

Після попередньої оцінки зразків приступають до підрахунку кількості інфузорій в дослідних і контрольних пробах. Отримані результати порівнюють. Обчислюють відсоток росту, що визначає живильну цінність в порівнянні з контролем.

Недоліком відомого способу є те, що він потребує досить значного часу для постановки реакції та аналізу отриманих результатів.

Метою корисної моделі є розробка універсального та швидкого способу оцінки наявності чи відсутності токсичного впливу дезінфікуючих пре-

паратів на інфузорію та встановлення максимально допустимого рівня робочих розчинів дезінфектантів за показниками їх життєдіяльності.

Поставлена задача вирішується тим, що після використання дезінфікуючого засобу контроль за рівнем токсичності на інфузорію здійснюється за допомогою процентної кількості їх виживших.

Метод визначення токсичності заснований на встановленні відмінностей між кількістю інфузорій в дослідженій пробі та контрольній пробі.

Критеріями токсичності є показники статистичне достовірне зниження росту чисельності інфузорій в досліді в порівнянні з контролем за 1 год. (гостра токсичність), а також швидкість ділення, фагоцитоз і поведінкові реакції (хемотаксис і фототаксис).

Оцінка токсичності проводиться шляхом визначення функціональної активності і підрахунку простих в динаміці за допомогою оптичної техніки.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином.

Як тест-об'єкт використовують лабораторну культуру інфузорію-тетрахімена піріформіс. Температурний оптимум 24-28°C, pH6,5-7,5. Температура приміщення 13-18°C.

Для підтримки стандартних умов культивування користуються культурою в стаціонарній фазі росту. Для цього пересадку інфузорій і зміну середовища проводять при температурі 24°C один раз в тиждень, при 12°C і нижче - один раз в два тижні. При пересадці культури 1-2мл культурального середовища з великою кількістю інфузорій з верхньої частини пробірки переносять в нову пробірку, зі свіжим живильним середовищем (до 5 мл).

Контролем служить рідка фаза (розчинник) в якій вноситься дезінфектант. Умова: нетоксичність рідкої фази.

Культивують інфузорію в лептонному середовищі наступного складу, г: пептон - 2,0, глюкоза - 0,5, дріжджовий екстракт - 0,1, хлористий натрій - 0,1, вода - до 100см³ (pH7). Середовище розливали по 5см³ в пробірки скляні місткістю 25см³ з ватяно-марлевими корками, стерилізують при 0,5атм 30хв, охолоджували. У пробірки з підготовленим середовищем засівають по 0,1см³ суспензії культури з обов'язковим її бактеріологічним контролем на стерильність шляхом посіву на мясо-пептонний агар або бульйон. Після цього пересівають культуру зберігають при кімнатній температурі в затіненому місці [8, 9, 10, 11]

У досліді використовують інфузорії 3-5 добової культури *Tetrahymena pyriformis*, які найбільш стійкі до дезінфектантів.

Проведення дослідження

Для швидкого визначення летальних концентрацій дезінфектанта краплю густої культури інфузорій (із заздалегідь певним середнім числом клітин) вносять до розчину дезінфектанта - вода - живильне середовище (відповідно 200 міліграм - 0,9мл - 0,9мл). Використовують 3-4 розведення. Визначають концентрацію, в якій за 0,01-1год. загинуло більше 50% інфузорій. Для гострого досліді в пробірках на 5мл готують ряд концентрацій дезінфектанта що відрізняються на порядок (5-6) в трьох повторностях. До кожної з досліджених і ко-

нтрольних систем вносять капіляром по 20 інфузорій. Для цього весь об'єм рідкої фази (РФ) переносять на скло за допомогою капіляра (краплями) і прораховують в них число інфузорій.

Потім з кожного флакона пастерівської піпеткою беруть по одній краплі культури на скло і переглядають під малим збільшенням мікроскопа. При цьому визначають наявність мертвих інфузорій, форму, величину, рухливість, густину росту. За наявності мертвих і деформованих інфузорій флакони бракують і дослідження повторюють.

Реєстрацію тест-організмів виконують візуально мікроскопом, які повністю входили в поле зору мікроскопа при збільшенні 2X8.

Кожні 5 хвилин ведуть рахунок інфузорій з постійною реєстрацією. Через 30-60хв. експозиції ведуть процентний підрахунок за формулою:

$$n = \frac{n_2 \times 100}{n_1}$$

де: n_2 - загальна кількість початкових інфузорій

n_1 - загальна кількість через 60хв.

Ступінь токсичності	Вживаємість інфузорій у % після посадки через 60хв. досліду (n)
Нетоксичний	100-81
Слаботоксичний	80-50
Токсичний	49-50

Переваги методу з тест-організмом тетрахімена пиріформіс перед аналогічними методами та з використанням біотварин полягають в наступному:

на тварину впливає лише той продукт, який їм спожитий; на тетрахімену - додаткове і надмірне її потребам кількість продукту, що впливає на інфузорію ззовні;

із-за вищої інтенсивності обміну речовин тетрахімена швидше реагує на шкідливі включення;

можлива одночасна постановка великої кількості проб;

простота, низька вартість, компактність, професійна нешкідливість методу, можливість його використання там, де відсутні умови для проведення експерименту на біотваринах.

Спосіб, який пропонуємо, забезпечує, в порівнянні з прототипом, скорочення часу на тестування, значне спрощення методичної та матеріальної бази аналізів. Крім того, використання даного показника розширило можливості застосування способу, оскільки динаміка показника інфузорії, який визначено в будь-якій хімічній рідині, може бути екстрапольована на всі клітини організму.

Спосіб технологічно нескладний, вимагає обладнання вітчизняного виробництва і може бути використаний в роботі наукових і виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

Джерела інформації:

1. Беленький Н.Г. и др. Методические рекомендации по биологической оценке продуктов животноводства и кормов с использованием тест-организма тетрахимена пириформис. М., 1977.

2. Рецкий М.И., Бузлама В.С., Шахов А.Г.. Значение антиоксидантного статуса в адаптивной гетерогенности и иммунологической резистентности животных /Мат.международной научно-практ. конф. Актуальные вопросы болезней молодняка в современных условиях 23-25 сент.2002 г.Воронеж. - С.33-36.

3. Степанова И.П., Дмитриева Л.М., Патюков А.Г. и др. Взаимосвязь между пероксидным окислением липидов, активностью антиоксидантной системы защиты и содержанием веществ низкой и средней молекулярной массы при интоксикации животных ацетальдегидом // С.-х. биология, 2004, №6. - С.16-19.

4. Способ диагностики эндогенной интоксикации / А.А. Тогайбаев, А.В. Кургузкин, И.В. Рикун, Р.М. Карибджанова / Лаб. дело. - №9, 1988. - С.22-24. 2. Цикуниб А.Д. Определение эндогенной интоксикации по токсикоурии с использованием *Tetrahymena pyriformis* / Клини. лаб. диагн. - 2001.- №6. - С.50-52. Использование инфузории тетрахимены пириформис как тест-объекта при биологических исследованиях в сельском хозяйстве. Игнатьев А.Д., Шабалин В.Я. ВАСХНИЛ.- М.,1978. 52с.

5. Everhart L.P. Methods with *Tetrahymena*. In Methods in cell physiology, 1972, v.5, p.219-288.

6. Reynolds H., Wragg J. B. Effect of type of carbohydrate on growth and nitrogen utilization in cultures of *Tetrahymena pyriformis*. -Bacteriological proceedings, 1960, v.60, N40, p.A39.

7. Методические рекомендации. Микрометод токсико-биологической оценки рыбы и других гидробионтов / П.В. Микитюк. Б.Ц. БЦСХИ им.Погребняка., К.-1987. 20с.

8. Tingle L.F. Davlat W.A. Cameron I.V. Sublethal cytotoxic effect of mercuric chloride on the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. -Journal protozoology, 1973. v.20, N2, p.301-304.

9. Hamana Koei, Koichi Iwai. Effects of steroid hormones on the growth of *Tetrahymena*. -Journal biochemistry (Tokyo), 1974, v.69, N3, p.463-469.

10. Виноходов Д.О. Токсикологическое исследование кормов с использованием инфузорий. - Спб, 1995, 80с.