УДК: 619:08.4535/088.8/

ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПОЛІМЕРНИХ ВИРОБІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕСТ-ОБ'ЄКТУ — СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

В. П. Музика[1], І. Є. Атаманюк[1], О. І. Чайковська[1], О. П. Панич[1], Д. Д. Остапів[2], О. І. Сергієнко[1]

[1]Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок
[2]Інститут біології тварин НААН

Інтеграція України в Європейські економічні структури вимагає застосування методів досліджень, які мають високу вірогідність, знижують вартість та час досліджень. За останні роки запропоновано різноманітні біологічні об`єкти (від простіших до риб і ссавців) для токсикологічних досліджень як в медицині, так і у ветеринарії. Поруч із класичними дослідженнями на тваринах все вагоміше місце займають альтернативні методи досліджень з використання рухливості статевих клітин в якості тест-об'єкту.

Оцінка цитотоксичності є поширеним методом, який застосовується при токсикологічних дослідженнях в медицині, ветеринарії, хімічній промисловості тощо.

У країнах Європи використання рухливості клітин в якості тест-об'єкту дозволило розробити технологію її інструментальної оцінки та автоматизувати процес токсикологічних досліджень за допомогою аналізаторів токсичності. Мотивація введення альтернативних методів досліджень в основному економічна: здешевлення досліджень, скорочення часу їх проведення і етичний стимул — гуманне відношення до тварин та обмеження їх використання в експериментальних випробуваннях. Ситуація спрощується при використанні сперми бугаїв, яка широко використовується в практиці штучного осіменіння, і є стандартизована. Чутливості даної культури більш, ніж достатньо для оцінки загальної токсичності, місцево-подразнюючої дії матеріалів та виробів найбільш широкого спектру. Переваги даного методу дозволили поширити його в медичній, ветеринарній, харчовій, хімічній промисловості, центрах гігієни, епідеміології та інших сферах.

З кожним роком збільшується випуск різних виробів із гуми, поліетилену та інших полімерних виробів. Враховуючи різні галузі застосування тих чи інших виробів з гуми та інших сполук, різні способи їх стерилізації, а також час контакту біологічних об'єктів, необхідно їх по різному обробляти. Стерилізацію приладів, які застосовуються при штучному осіменінні, проводять кип'ятінням у дистильованій воді, автоклавуванням сухою парою води, дією високих температур, опромінюванням ультрафіолетовими променями, використанням дезінфектантів. Тому гумові камери доцільно перевіряти на нешкідливість, обробляючи парою з метою одержання конденсату або кип'ятінням у дистильованій воді, оскільки при таких способах обробки з них швидше виділяються токсичні компоненти. Поліетиленові флакони для введення, транспортування та зберігання сперми мають тривалий контакт із сперміями. В даному випадку необхідно враховувати тривалість контакту полімера із сперміями.

На даний час немає універсальної методики, яка поєднує кілька способів перевірки на токсичність певної групи виробів чи зразків матеріалів і дає змогу робити висновок про придатність їх до практичного застосування.

Метою нашої роботи було вивчення параметрів токсичності полімерних матеріалів за зниженням якості сперми — рухливості сперміїв, показників абсолютного виживання та часу виживання сперміїв при прямому контакті з полімерними виробами і при використанні водних витяжок із них.

Матеріали і методи. Для дослідження на токсичність використовували гуму штучних вигін, поліетиленові спермоприймачі, катетери для штучного осіменіння, поліетиленові флакони для введення і транспортування сперми.

Принцип методу грунтується на визначенні впливу безпосередньо досліджуваного матеріалу або витяжки з нього на рухливість статевих клітин великої рогатої худоби.

Досліджуваний матеріал попередньо кип'ятили у 2 % розчині натрію двовуглекислого протягом 20 хвилин, потім промивали його дистильованою водою, вміщували в інший посуд і знову кип'ятили у дистильованій воді 40 хвилин. Після зазначеної обробки досліджувані зразки використовували для отримання водних екстрактів та для прямого контакту з сперміями.

При використанні водних екстрактів подрібнені зразки матеріалу (3–4 %) 20 хвилин кип´ятили у дистильованій воді і витримували 3 години. Одержаний екстрат використовували для виготовлення цитратно-жовткового середовища (2,9 % натрію цитрат і 10 % жовтка курячих яєць) розбавляли сперму.

При використанні способу прямого контакту спермиїв з досліджуваним матеріалом подрібнені зразки (3–4 %) вносили у цитратно-жовткове середовище. Контролем було цитратно-жовткове середовище, приготовлене на дистильованій воді без додавання полімерів. Незалежно від способу приготування дослідних зразків ступінь розведення сперми не змінювався — 0,2–0,3 см³ сперми додавали в 2–4 см³ розбавника. Проби сперми зберігали при температурі 2–5 ºС і досліджували за рухливістю до повної їх загибелі, вираховували показник абсолютного виживання та виживання спермиїв у годинах.

Рухливість спермиїв (P_c) у балах вираховували за формулою:

$$P_c = (n_1 \cdot 10) / n,$$

де: n — загальна кількість підрахованих спермиїв;

n_1 — кількість підрахованих спермиїв з прямолінійним поступальним рухом;

10 постійний коефіцієнт.

Показник абсолютного виживанті спермиїв (S) вираховували за формулою:

$$S = a_1 + \sum(at),$$

де: $\sum$ — сума;

a — рухливість спермиїв за інтервали часу, бали;

a_1 — рухливість спермиїв після робавлення сперми, бали;

t — послідовні інтервали часу між перевірками рухливості спермиїв, год.

Результати й обговорення. При використанні водних витяжок із гуми штучних вагін токсичність матеріалів проявлялася у більшій мірі ніж при використанні методу безпосереднього контакту матеріалів із сперміями. Показник абсолютного виживання спермиїв (S) становив, відповідно, 960 і 984 (80,8 і 82,8 % від контролю) Аналогічно токсичність проявлялася при дослідженні флаконів для транспортування сперми S — 1056 і 1087 (88,8 і 95 % від контролю). Отже, при використанні водних витяжок полімерів для середовища — розбавника сперми швидше виділяються токсичні компоненти (табл.). Різниці у значенні показників виживаності для спермоприймачів та катетерів для штучного осіменіння не відмічалося, що свідчить про їхню нетоксичність.

Таблиця

Вплив досліджуваних матеріалів (безпосередній контакт) і витяжок із них на показники абсолютного виживання (S) і час виживання спермиїв (Ч) (n=6)

Досліджуваний матеріал	Прямий контакт із сперміями				Водна витяжка полімеру			
	S	% від контролю	Ч (год.)	% від контролю	S	% від контролю	Ч (год.)	% від контролю
Гума штучної вагіни	984	82,8	204	85,00%	960	80.8	204	85
Спермоприймач	1104	92,2	216	90	1004	92,9	216	90
Катетер для штучного осіменіння	1104	92,2	216	90	1004	92,9	216	90
Флакони для введення і транспортування сперми	1087	95,5	228	95	1056	88,8	216	90
Контроль	1188	100	240	100	1188	100	240	100

Таким чином, параметри ступеня токсичності полімерних виробів визначають за зниженням якості сперми — активністю спермиїв, показником абсолютного виживання та часу виживання у годинах. Враховуючи різні способи застосування тих чи інших виробів, різні способи їх стерилізації, строки контакту з ними статевих клітин, необхідно їх по різному досліджувати. Так, гумові вироби камери штучних вагін стерилізують автоклавом, тому їх доцільно перевіряти на нешкідливість

кип'ятінням і використанням водних екстрактів. Досліджуючи флакони для введення, транспортування, зберігання сперми необхідно враховувати тривалий контакти сперміїв з полімерами.

В И С Н О В К И

1. При використанні водних витяжок із полімерних матеріалів для приготування середовища — розбавника сперми швидше виділяються токсичні компоненти, які знижують виживання сперміів.

2. Різниці у значенні показників виживання для спермоприймачів та катетерів для штучного осіменіння не відмічалося, що свідчить про їхню нетоксичність.

Перспективи подальших досліджень. Буде розроблена методика оцінки токсичності полімерних виробів з використанням тест-об'єкту сперміів великої рогатої худоби.

DEFINITION OF CYTOTOXIC POLYMER PRODUCTS USING TEST-OBJECT—BULLS SPERMATOZOA

V. P. Muzyka[1], I. E. Atamanjuk[1], O. I. Chajkovska[1], O. P. Panych[1], D. D. Ostapiv[2], O. I. Sergienko[1]

[1]State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives
[2]Insitute of animal biology of NAAS

S U M M A R Y

Ukraine's integration into European economic structures requires the use of research methods that are highly reliable, reduce the cost and time studies. In recent years, a variety of biological objects (from the simplest to fish and mammals) for toxicological studies in medicine and in veterinary medicine had been offered. Next to the classic researches on animals, stronger positions take the alternative methods with the use of gametes mobility research as the test object.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИМЕРНЫХ ИЗДЕЛИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-ОБЪЕКТА — СПЕРМИЕВ БЫКА

В. П. Музыка[1], И. Е. Атаманюк[1], А. И. Чайковская[1], А. П. Паныч[1], Д. Д. Остапив[2], А. И. Сергиенко[1]

[1]Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок
[2]Институт биологии животных НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Интеграция Украины в Европейские экономические структуры требует применения методов исследований, которые имеют высокую достоверность, снижают стоимость и время исследований. За последние годы предложены разнообразные биологические объекты (от более простых к рыбам и млекопитающим) для токсикологических исследований как в медицине, так и в ветеринарии. Рядом с классическими исследованиями на животных все более весомое место занимают альтернативные методы исследований с использованием подвижности половых клеток в качестве тест-объекта.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Балалашов Н. Г. Ветеринарный контроль при искусственном осеменени жывотных. М. Колос, 1980 — С. 194.

2 *Наружный Н. П, Завьялов Н. В., Еськов А. П.* Экспресс-метод определения цитотоксичности материалов с использованием в качестве тест-объекта спермы крупного рогатого скота. Методические рекомендации. Москва, 2001.

3. Методика определения токсического действия вытяжек из материалов и изделий на половых клетках крупного рогатого скота//Сборник руководящих методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения. Утверждена МЗ СССР 27 ноября 1985 г.

4. Количественный экспресс — метод оценки токсичности полимеров с использованием клеточного тест-объекта (Методические рекомендации). Утверждены МЗ СССР 14 мая 1987 г.

Рецензент — д. вет. н., професор О. Г. Малик, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок**.**