

ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ КОМПЛЕКСІВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ З ПОЛІМЕРНИМИ НАНОНОСІЯМИ

В. В. Влізло¹, Д. Д. Остапів², Б. О. Чех², М. І. Нагорняк³, В. В. Олекса³
vlizlovodolodmyr@gmail.com

¹Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН,
вул. Грушевського, 5, с. Оброшино, Пустомитівський р-н, Львівська обл., 81115, Україна

²Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

³Національний університет «Львівська політехніка»,
пл. Св. Юра, 2, м. Львів, 79013, Україна

У роботі представлено результати дослідження цитотоксичності комплексів мікроелементів (Fe, Zn, Cu, Mn) у складі нанополімеру-транспортёру на основі псевдоамінокислот (поліоксietiленових похідних глутамінової кислоти).

Для виготовлення нанополімеру використовували поліоксietiленові N-похідні глутамінової кислоти з молекулярною масою поліоксietiленового фрагменту 400, 600 та 1500 Да. Їх з'єднували з водними розчинами солей мікроелементів ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Один грам комплексу полімеру з мікроелементами містив: Феруму — 0,03–0,05 ммоль, Цинку — 0,0319 ммоль, Мангану — 0,0359 ммоль, Купруму — 0,0222 ммоль. Для оцінювання цитотоксичності комплексів мікроелементів у складі полімерів-транспортёрів на основі псевдоамінокислот використовували тест-об'єкт — сперму бугаїв. Сперму, розріджену лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем, ділили на чотири частини: одну контрольну — без додавання та три дослідні — з додаванням мікроелементів у складі полімеру-транспортёра в кількості 0,01, 0,05 і 0,1 мл розчину комплексу. У контрольних і дослідних зразках розрідженої сперми визначали виживання спермійів, споживання ними кисню, відновну здатність і активність сукцинатдегідрогенази (СДГ).

Встановлено, що комплекси мікроелементів (Fe, Zn, Cu, Mn) у складі полімерів-транспортёрів на основі псевдоамінокислот у дозі 0,01 мл не впливають на інтенсивність окиснювальних процесів клітин (спермійів), а в дозах 0,05 і 0,1 мл — знижують її. Відповідно, дихальна активність і відновна здатність сперми також не змінюється за дії 0,01 мл вмісту препарату, проте зростання дози спричиняє негативний вплив на ці показники. Найвищий рівень негативної кореляції ($\eta = -0,769$) між вмістом полімеру-транспортёра на основі псевдополіамінокислот і активністю ензиму дихального ланцюга мітохондрій СДГ виявляється за збільшення доз Cu-поліоксietiленової N-похідної глутамінової кислоти до 0,1 мл. Високі дози (0,05 і 0,1 мл) комплексів мікроелементів нанополімеру-транспортёру в культурі клітин характеризуються цитотоксичним впливом на фізіологічні параметри клітин (виживання спермійів), а низькі (0,01 мл) не мають цитотоксичної дії.

Ключові слова: НАНОПОЛІМЕРИ-ТРАНСПОРТЕРИ, МІКРОЕЛЕМЕНТИ (Fe, Zn, Cu, Mn), ПСЕВДОАМІНОКИСЛОТИ, ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ

CYTOTOXICITY OF NANOPOLYMERS IN COMPLEXES WITH MICROELEMENTS

V. V. Vlizlo¹, D. D. Ostapiv², B. O. Chekh², M. I. Nahornyak³, V. V. Oleksa³
vlizlovodolodmyr@gmail.com

¹Institute of Agriculture Carpathian region NAAS,
5 Hrushevskoho str., Obroshyno village, Lviv region., 81115, Ukraine

²Institute of Animal Biology NAAS,
38 Vasyl Stus st., Lviv 79034, Ukraine

³National University "Lviv Polytechnic", department of Organic Chemistry,
2 St. Yura square, Lviv 79013, Ukraine

This article presents the studying of cytotoxicity of complexes of elements (Fe, Zn, Cu, Mn) and nanopolymer-transporter derived from pseudopolyamino acids (polyoxyethylene derivatives of glutamic acid).

Polyoxyethylene N-derivatives of glutamic acid with molecular weight of polyoxyethylene fragment 400, 600 and 1500 Dalton were used for nanopolymer synthesis. Nanopolymer were combined with aqueous solutions of microelements salts ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). One gram of complexes of nanopolymer and microelements contains: Fe — 0.03–0.05 mmol, Zn — 0.0319 mmol, Mg — 0.0359 mmol and Cu — 0.0222 mmol. We used bovine sperm for cells for studying the cytotoxicity of nanopolymer complexes. Sperm was diluted by lactose-yolk-glycerine diluent and divided into four groups: intact control group and three experimental groups with addition of researched nanopolymer in complexes with microelements in doses of 0.01, 0.05 and 0.1 ml. We determined sperm cells survival time, respiratory activity, red/ox activity and activity of succinate dehydrogenase (SDG) in control and experimental groups.

We found that nanopolymer in complexes with microelements (Fe, Zn, Cu, Mn) in dose 0.01 ml had no effect on red/ox activity of sperm cells, but doses of 0.05 and 0.1 ml reduced it. Results show unchanged respiratory and red/ox activity of sperm cells after addition of nanopolymer in complexes with microelements in dose 0.01 ml, but increased doses of complexes lead to negative impact on sperm cells respiratory and red/ox activity. The highest negative correlation ($\eta = -0.769$) between doses of nanopolymer-transporter derived from pseudo amino acids and mitochondrial SDG activity was detected at addition of Cu-N-polyoxyethylene derivative of glutamic acid in dose of 0.1 ml. Addition of nanopolymer in complexes with microelements in high doses (0.05 and 0.1 ml) to cell culture was characterized by cytotoxic effect on cell physiological parameters (time of sperm cells survival) and addition of nanopolymer in complexes with microelements in low dose (0.01 ml) was non-toxic for cells.

Keywords: TRANSPORTER NANOPOLYMERS, MICROELEMENTS (FE, ZN, CU, MN), PSEUDOPOLYAMINO ACIDS, CYTOTOXICITY

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСОВ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ С ПОЛИМЕРНЫМИ НАНОНОСИТЕЛЯМИ

В. В. Влизло¹, Д. Д. Остапів², Б. А. Чех², М. И. Нагорняк³, В. В. Олекса³
vlizlovoldymyr@gmail.com

¹Институт сельского хозяйства Карпатского региона НААН,
ул. Грушевского, 5, с. Оброшино, Пустомытовский р-н, Львовская обл., 81115, Украина

²Институт биологии животных НААН,
ул. В. Стуса, 38, г. Львов, 79034, Украина

³Национальный университет «Львовская политехника»,
пл. Св. Юра, 2, г. Львов, 79013, Украина

В работе представлены результаты исследования цитотоксичности комплексов микроэлементов (Fe, Zn, Cu, Mn) в составе нанополимера-транспортера на основе псевдоаминокислот (полиоксиэтиленовых производных глутаминовой кислоты).

Для изготовления нанополимера использовали полиоксиэтилен N-производные глутаминовой кислоты с молекулярной массой полиоксиэтиленового фрагмента 400, 600 и 1500 Да. Их соединяли с водными растворами солей микроэлементов ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). В 1 грамме комплекса полимера с микроэлементами содержалось: Ферума 0,03–0,05 ммоль, Цинка 0,0319 ммоль, Мангана 0,0359 ммоль, Купрума 0,0222 ммоль. Для оценки цитотоксичности комплексов микроэлементов в составе полимеров-транспортеров на основе псевдоаминокислот использовали тест-объект — сперму быков. Сперму, разбавленную лактозо-желтково-глицериновым разбавителем, разделяли на четыре части: одну контрольную — без добавления и три опытных — с добавлением микроэлементов в составе полимера-транспортера в количестве 0,01, 0,05 и 0,1 мл раствора комплекса. В контрольных и опытных образцах разбавленной спермы определяли выживаемость сперматозоидов, потребление ими кислорода, восстановительную способность и активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ).

Установлено, что комплексы микроэлементов (Fe, Zn, Cu, Mn) в составе полимеров-транспортеров на основе псевдоаминокислот в дозе 0,01 мл не влияют на интенсивность окислительных процессов клеток (сперматозоидов), а в дозах 0,05 и 0,1 мл ее снижают. Соответственно, дыхательная активность и восстановительная способность спермы также не меняется за действия 0,01 мл содержания препарата, однако увеличение дозы вызывает негативное влияние на данные показатели. Самый высокий уровень отрицательной корреляции ($\eta = -0,769$) между дозой нанополимера-транспортера на основе псевдоаминокислот и активностью энзима дыхательной цепи митохондрий СДГ выявлен при увеличении доз Си-полиоксиэтиленовой N-производной глутаминовой кислоты до 0,1 мл. Высокие дозы

(0,05 и 0,1 мл) комплексов микроэлементов нанополимера-транспортера в культуре клеток характеризуются цитотоксическим влиянием на физиологические параметры клеток (выживание сперматозоидов), а низкие (0,01 мл) не имеют цитотоксического действия.

Ключевые слова: НАНОПОЛИМЕРЫ-ТРАНСПОРТЕРЫ, МИКРОЭЛЕМЕНТЫ (Fe, Zn, Cu, Mn), ПСЕВДОАМИНОКИСЛОТЫ, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

Серед речовин, що відіграють важливу роль у живленні тварин, значне місце займають мікроелементи. Вони впливають на функції кровотворення, ендокринних залоз, захисні реакції організму, мікрофлору травного тракту, регулюють обмін речовин, беруть участь у біосинтезі білка, проникності клітинних мембран тощо [3, 6, 11]. Тварини отримують мікроелементи з кормами. Однак мінеральний склад останніх залежить від типу ґрунтів, кліматичних умов, виду рослин, фази вегетації, агрохімічних заходів, технології збирання, зберігання і підготовки до згодовування. Часто вказані фактори порушуються, що призводить до зниження вмісту мінеральних речовин у кормах. Крім цього, за інтенсивного росту й розвитку, високої продуктивності та багатоплідності потреба тварин у мікроелементах зростає. У зв'язку з цим, спостерігається їх нестача в організмі, що спричиняє погіршення ефективності використання корму, зниження продуктивності, якості продукції, порушення відтворення та обміну речовин, розвиток захворювань [6, 7].

Для забезпечення потреби у мікроелементах використовують різні сполуки, проте їхня біологічна доступність неоднакова. Технологічні властивості солей мінеральних речовин суттєво впливають на якість преміксів, кормових добавок і кормів. У тваринництві як мінеральні добавки використовують переважно неорганічні солі макро- та мікроелементів. На сьогодні доведено, що вони мають низку недоліків при використанні та зберіганні, а також володіють значною токсичністю. Проблема створення нових сполук макро- та мікроелементів може бути вирішена лише за умов глибокого та різнобічного вивчення їхньої хімічних і фізичних властивостей, здатності вступати в реакції з протеїнами, амінокислотами та пептидами, що містяться в біологічних рідинах організму тварин [12].

Взаємодія іонів металів з амінокислотами полягає у координації через аміно- та

карбоксильну групу. Сьогодні перспективним є використання штучно синтезованих псевдоамінокислот для доставки та вивільнення лікарських засобів в організмі [1, 10]. При тому, одним зі способів прогнозування та оцінювання дії речовин різного походження на організм, зокрема і новостворених комплексів мікроелементів з полімерами, є встановлення їх впливу на метаболізм клітин *in vitro*. До клітин, які здатні характеризувати зміни обмінних процесів за доданих фармакологічних й інших чинників, належать спермії [6].

Метою наших досліджень було вивчити цитотоксичність комплексів мікроелементів (Fe, Zn, Cu, Mn) у складі полімерів-транспортерів на основі псевдоамінокислот (поліоксietiленових похідних глутамінової кислоти) за використання тест-об'єкту (сперміїв).

Матеріал і методи

Для отримання комплексів мікроелементів у складі полімеру-транспортера на основі псевдоамінокислот використовували поліоксietiленові N-похідні глутамінової кислоти з молекулярною масою поліоксietiленового фрагменту 400, 600 та 1500 Да і водні розчини солей ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). До 1–2 % розчину солей додавали розчин гідроксиду натрію у співвідношенні 1:1,05 за еквівалентом. Осад відділяли центрифугуванням, декантували розчин і промивали дистильованою водою. Змішували 15–25 % розчин ліганду (N-заміщеного поліоксietiленового похідного глутамінової кислоти) в диметилформаміді з осадом гідроксиду металу при мольному співвідношенні від 0,5 до 1,5 ліганду на 1 моль гідроксиду металу. Перемішували отриману суміш протягом 1 год за кімнатної температури, після чого розчинник видаляли вакуумною відгонкою. Комплекс полімеру в 1 г містив таку кількість мікроелементів елементів: Феруму (Fe) — 0,03–0,05 ммоль,

Цинку (Zn) — 0,0319 ммоль, Мангану (Mn) — 0,0359 ммоль, Купруму (Cu) — 0,0222 ммоль.

Для оцінювання цитотоксичності комплексів мікроелементів у складі полімерів-транспортів на основі псевдоамінокислот використовували тест-об'єкт — спермії бугаїв. Сперму бугаїв отримували у Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси». Для дослідження відбирали еякуляти об'ємом 2–6 мл, концентрацією спермій 0,6– $1,5 \times 10^9$ клітин/мл та активністю 7,5–8,0 бала. Сперму, розріджену лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем, ділили на частини: одну контрольну — без додавання та три дослідні — з додаванням мікроелементів у складі полімеру-транспортера в кількості 0,01, 0,05 і 0,1 мл розчину комплексу.

У контрольних і дослідних зразках розрідженої сперми визначали виживання спермій (год.) за температури 2–4 °С до припинення прямолінійного поступального руху, споживання кисню — полярографічно (нг-атом O/хв \times 0,1 мл сперми; С) за температури 38,5 °С і відновну здатність — потенціометрично (mV/хв \times 0,1 мл С) з використанням системи відкритих мікроелектродів [9], активність сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.5.1) визначали, як описано в методиці, і виражали в од/год \times 0,1 мл С [2]. Дослідження інтенсивності дихання та відновну здатність сперми проводили у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ; NaCl — 0,8 г, KCl — 0,02 г, Na_2HPO_4 — 0,11 г, KH_2PO_4 — 0,02 г, MgCl_2 — 0,01 г, H_2O до 100 мл). Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за Н. А. Плохинським [8].

Результати й обговорення

Проведені дослідження виявили, що дихальна активність сперми за додавання мікроелементів у складі полімерів-транспортів на основі псевдоамінокислот залежала від дози внесеного комплексу (табл. 1). Так, за вмісту 0,01 мл Zn-поліоксиетилевої N-похідної глутамінової кислоти в мл сперми величина значення, порівняно з контролем, не змінювалася і становила $1,00 \pm \pm 0,23$ нг-атом O/хв \times 0,1 мл С, за додавання 0,05 мл/мл знижувалася на 42,4 %, за внесен-

ня 0,1 мл Zn-поліоксиетилевої N-похідної глутамінової кислоти — на 46 %.

Додавання комплексу Cu-поліоксиетилевої N-похідної глутамінової кислоти проявляло подібний вплив на споживання кисню спермою. У разі внесення 0,01 мл комплексу в мл сперми величина показника знижувалася на 22,9 %, за збільшення до 0,05 мл/мл сперми дихальна активність менша на 51,0 % ($P < 0,05$) і за максимальної дози (0,1 мл Cu-поліоксиетилевої N-похідної глутамінової кислоти) значення нижчі на 54,9 % порівняно з контролем (табл. 1). Отже, незважаючи на понижену дихальну активність за додавання наростаючих доз Zn- і Cu-поліоксиетилевої N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми, вказані сполуки мало впливали на використання кисню як статевими клітинами, так і процеси, які зумовлюють окиснення субстратів еякулятів.

За внесення 0,01 мл Mn- та Fe-поліоксиетилевої N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми споживання кисню знижувалося, відповідно, на 20,3 і 19,1 %, за 0,05 мл — на 47,2 і 48,6 % ($P < 0,05$), за 0,1 мл — на 58,7 % ($P < 0,05$) і 25,8 % порівняно з контролем (табл. 1). Таким чином, додавання Mn- чи Fe-поліоксиетилевої N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми гальмувало використання кисню як статевими клітинами, так і окиснення субстратів еякулятів.

Відновна здатність сперми за додавання 0,01 мл Zn-поліоксиетилевої N-похідної глутамінової кислоти в мл сперми знижувалася на 52,3 %, за внесення 0,05 мл/мл не змінювалася ($0,08 \pm 0,03$ mV/хв \times 0,1 мл С), а за внесення 0,1 мл вказаного комплексу була нижчою на 75,0 % порівняно з контролем (табл. 1). При цьому знижувалося число зразків, у яких встановлено підвищення відновної здатності (потіку протонів у середовище інкубування) порівняно з контролем. Подібний результат встановлено за додавання наростаючих доз Mn-поліоксиетилевої N-похідної глутамінової кислоти. Відновна здатність (потік протонів у середовище) знижувалася на 61,6 % ($P < 0,01$) за внесення 0,01 і 0,05 мл комплексу в мл сперми та на 84,7 % ($P < 0,001$) за внесення 0,1 мл Mn-поліоксиетилевої N-похідної глутамінової кислоти. Одночас-

но, за додавання вказаного комплексу зростала кількість зразків, у яких підвищувався потенціал середовища.

Додавання 0,01 та 0,05 мл Fe-поліоксидетиленової N-похідної глутамінової кислоти в мл сперми на 75,0 % ($P<0,01$) знижувало відновну здатність (нагромадження протонів), а 0,1 мл комплексу — навпаки, підвищувало на 77,8 % ($P<0,001$) порівняно з контролем (табл. 1). При цьому за додавання наростаючих доз Fe-поліоксидетиленового N-похідного глутамінової

кислоти знижувалася кількість зразків, у яких нагромаджуються протони у середовищі.

На відміну від досліджених комплексів, додавання Cu-поліоксидетиленового N-похідного глутамінової кислоти в мл сперми призводило до зростання потенціалу середовища (нагромадження протонів) у зразках порівняно з контролем. Крім цього, величина значення відновної здатності не залежала від дози доданого комплексу і була в межах 0,01–0,02 mV/хв \times 0,1 мл С (табл. 1).

Таблиця 1

Біохімічні характеристики тест-об'єкту (спермій) за впливу комплексів мікроелементів у складі полімерів-транспортів, $M\pm m$
Bovine sperm biochemical analysis under the influence of nanopolymer in complexes with microelements, $M\pm m$

Дози полімеру, мл Polymer doses, ml	n	Дихальна активність спермійів, нг-атом O/хв × 0,1 мл С Respiratory activity of sperm, ng-atom O min × 0,1ml C	Відновна здатність спермійів у середовищі, mV/хв × 0,1мл С Red/ox activity of sperm in the medium, mV/min × 0,1ml			
			n	«←→» поглинання протонів «←→» Protons intake	n	«→+» нагромадження протонів «→+» proton accumulation
Zn ²⁺						
Контроль Control	10	1,11±0,21	7	0,16±0,08	3	0,020±0,003
0,01	10	1,00±0,23	9	0,07±0,03	1	0,001±0,00
0,05	10	0,64±0,21	9	0,08±0,03	1	0,004±0,00
0,1	10	0,62±0,17	8	0,04±0,02	2	0,010±0,001
η	—	0,098	—	0,122	—	0,731
Cu ²⁺						
Контроль Control	10	2,06±0,43	9	0,16±0,03	—	—
0,01	10	1,59±0,31	—	—	9	0,010±0,002
0,05	10	1,01±0,16*	—	—	9	0,020±0,004*
0,1	10	0,93±0,44	—	—	9	0,02±0,002**
η	—	0,145	—	0,210	—	0,131
Mn ²⁺						
Контроль Control	10	1,38±0,34	10	0,13±0,02	—	—
0,01	10	1,10±0,23	9	0,05±0,01**	1	0,01±0,00
0,05	10	0,73±0,15	6	0,05±0,01**	4	0,003±0,001*
0,1	10	0,57±0,09*	6	0,02±0,004***	3	0,01±0,002
η	—	0,226	—	0,471	—	0,478
Fe ^{2+/3+}						
Контроль Control	6	1,05±0,14	6	0,08±0,02	—	—
0,01	6	0,85±0,09	3	0,02±0,01*	3	0,01±0,001
0,05	6	0,54±0,10*	3	0,02±0,01*	3	0,01±0,002
0,1	6	0,78±0,33	4	0,36±0,22	2	0,004±0,001**
η	—	0,129	—	0,272	—	0,058

Примітка: у цій і наступній таблицях різниця статистично вірогідна порівняно з контролем: * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$.

Note: in this and next tables statistically significant difference compared with control: * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$.

Аналіз кореляцій між зростаючим вмістом комплексів мікроелементів у складі поліоксидетиленових N-похідних глутамінової кислоти та досліджені біохімічні показники свідчить про низький вплив мінімальних доз (0,01 мл/мл зразка) комплексів на дихальну активність і потік протонів у позаклітинне середовище (за винятком комплексів Cu-поліоксидетиленових N-похідних глутамінової кислоти).

Додавання у зразки сперми мікроелементів у складі поліоксидетиленових N-похідних глутамінової кислоти по-різному впливало на активність сукцинатдегідрогенази статевих клітин. Так, у разі внесення 0,01 мл Zn-поліоксидетиленового N-похідного глутамінової кислоти в мл сперми активність ензиму не

змінювалася, за додавання 0,05 мл зростала на 11,6 %, а за додавання 0,1 мл комплексу — на 14,9 % порівняно з контролем (табл. 2). Подібні зміни виявлені за використання комплексів Fe-поліоксидетиленового N-похідного глутамінової кислоти — величина значення активності досліджуваного ензиму коливалася в межах 45,0–55,0 од/год \times 0,1 мл С, різниця становила 13,5–18,2 %.

Внесення 0,01 мл Mn-поліоксидетиленового N-похідного глутамінової кислоти в мл сперми підвищувало активність СДГ на 27,3 %, 0,05 мл комплексу — не змінювало величину цього показника ($40,0 \pm 8,66$ од/год \times 0,1 мл С), тоді як внесення 0,1 мл комплексу на 28,0 % знижувало активність ензиму порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив комплексів мікроелементів з полімерами-транспортерами на активність сукцинатдегідрогенази і виживання спермій, $M \pm m$
Succinate dehydrogenase activity and sperm cells survival time under the influence of nanopolymer in complexes with microelements $M \pm m$

Дози полімеру, мл Polymer volume, ml	n	Активність СДГ, од/год \times 0,1 мл SDH activity, U/h \times 0,1 ml	n	Вживання спермій, год Sperm cells survival time, h
Zn²⁺				
Контроль Control	5	46,00 \pm 6,07	13	142,10 \pm 12,79
0,01	5	50,00 \pm 4,00	13	134,30 \pm 11,57
0,05	5	52,00 \pm 7,69	13	120,00 \pm 14,70
0,1	5	54,00 \pm 9,21	13	96,00 \pm 16,97*
η	—	0,034	—	0,122
Cu²⁺				
Контроль Control	4	40,00 \pm 6,12	8	144,00 \pm 11,22
0,01	4	23,80 \pm 4,80	8	129,00 \pm 20,32
0,05	4	4,25 \pm 1,85***	8	108,00 \pm 21,63
0,1	4	4,25 \pm 1,85***	8	66,00 \pm 21,53**
η	—	0,769	—	0,227
Mn²⁺				
Контроль Control	4	40,00 \pm 6,12	12	136,00 \pm 10,39
0,01	4	55,00 \pm 8,29	12	126,00 \pm 11,60
0,05	4	40,00 \pm 8,66	12	112,00 \pm 8,36
0,1	4	28,80 \pm 6,22	12	78,00 \pm 9,32***
η	—	0,283	—	0,323
Fe^{2+/3+}				
Контроль Control	4	45,00 \pm 7,50	8	111,00 \pm 5,91
0,01	4	55,00 \pm 7,50	8	108,00 \pm 10,39
0,05	4	45,00 \pm 7,50	8	78,00 \pm 15,15
0,1	4	52,50 \pm 11,92	8	45,00 \pm 11,57***
η	—	0,060	—	0,413

Додавання наростаючих доз Cu-поліоксиетиленового N-похідного глутамінової кислоти в мл сперми призводило до зниження активності СДГ: на 40,5 % за внесення 0,01 мл була нижчою, а за 0,05 та 0,1 мл на однакову величину — 89,4 % ($P < 0,001$).

Оцінювання залежності СДГ від наростаючих доз у розріджувачі Zn-, Fe-, Mn-поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти свідчило про кореляцію слабкої сили ($\eta = 0,034-0,283$) між цими двома показниками, а в разі використання Cu-поліоксиетиленового N-похідного глутамінової кислоти — сильну негативну ($\eta = -0,769$). Інгибування активності СДГ Cu-поліоксиетиленовою N-похідною глутамінової кислоти зумовлюється надлишком мікроелемента, який у високих дозах чинить цитотоксичний вплив на метаболізм статевих клітин.

Виживання спермій за додавання наростаючих доз в розріджувачі комплексів мікроелементів у складі поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти знижувалося (табл. 2). Так, за введення 0,01 мл Zn-поліоксиетиленового N-похідного глутамінової кислоти в мл сперми виживання спермій не змінювалося ($134,3 \pm 11,57$ год), тоді як за додавання 0,05 мл дещо знижувалося — на 15,6 %, а за 0,1 мл — на 32,5 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Подібні зміни величини фізіологічного показника встановлені за використання Cu-, Mn-, Fe-поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми. За низької дози (0,01 мл у мл сперми) комплексів виживання спермій коливалося в межах контролю, а підвищення до 0,05 мл мікроелементів у складі поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми спричиняло незначне зниження, а за 0,1 мл — вірогідне на 42,7–59,5 % ($P < 0,01-0,001$).

Аналіз залежності виживання спермій від комплексу мікроелементів у складі полімерів-транспортів з псевдоамінокислот виявив слабку негативну кореляцію з вмістом у Zn- та Cu- поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми ($\eta = 0,122-0,227$) і середню за Mn-, Fe-поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми ($\eta = 0,323-0,413$).

Отже, дія низьких доз (0,01 мл) комплексу мікроелементів у складі поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти в мл сперми характеризується слабкою цитотоксичністю, а вищі дози (0,05 і 0,1 мл) гальмують метаболізм і знижують фізіологічні характеристики клітин.

Висновки

1. Додавання мікроелементів у складі полімерів-транспортів на основі псевдоамінокислот у дозі 0,01 мл до сперми не впливає на інтенсивність окиснювальних процесів клітин (спермій), а в дозах 0,05 і 0,1 мл спричиняє її зниження.

2. Дихальна активність і відновна здатність сперми не змінюється за дії 0,01 мл вмісту мікроелементів у складі поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти, зростання дози комплексу спричиняє негативний вплив на ці показники.

3. Найвища за силою негативна кореляція ($\eta = -0,769$) активності ензиму дихального ланцюга мітохондрій СДГ виявляється за збільшення доз Cu-поліоксиетиленового N-похідного глутамінової кислоти до 0,1 мл.

4. Високі дози мікроелементів у складі поліоксиетиленових N-похідних глутамінової кислоти в культурі клітин (0,05 і 0,1 мл) характеризуються цитотоксичним впливом на фізіологічні характеристики клітин (виживання спермій), а низькі не мають цитотоксичної дії.

Перспективи подальших досліджень.

У подальшому дослідження будуть присвячені вивченню впливу комплексів мікроелементів з полімерами-наноносіями на організм лабораторних тварин. Перш за все, буде досліджено токсичний вплив, а також засвоєння мікроелементів організмом тварин.

1. Chekh B., Ferens M., Martyn Y., Ostapiv D., Vlizlo V. Functional and structural state of rats' kidneys and liver under the influence of nano-polymer based on pseudopolyamino acids. *The Animal biology*, 2015, vol. 18, no. 3, pp. 107–113.

2. Chuhray B. N., Klevets L. A., Ostapiv D. D. Colorimetric method for determining succinate dehydrogenase activity in bovine sperm. *Journal of Agricultural Science*, 1995, vol. 11, pp. 73–75. (in Ukrainian)

3. Dirksen G., Gründer H.-D., Stöber (Hrsg.), M. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Berlin, Parey, 2002, 1283 p.
4. Klitsenko G. T., Kulyk M. F., Kosenko M. V. *Mineral nutrition of animals*. Kyiv, Svit, 2001, 576 p. (in Ukrainian)
5. Kuzminov O., Ostapiv D., Alekhina T. Evaluation of cytotoxic action of antihistamines — desloratadine and loratadine — using bulls spermatozoa as a test object. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.*, 2014, vol. 5, no. 1, pp. 3–6. (in Ukrainian)
6. Levcheko V. I., Vlizlo V. V., Kondrakhin I. P. *Veterinary clinical biochemistry*. Bila Tserkva, BNAU, 2002, 400 p. (in Ukrainian)
7. Levchenko V. I., Vlizlo V. V., Kondrakhin I. P. *Internal animal diseases*. Part 2. Bila Tserkva, BNAU, 2015, 610 p. (in Ukrainian)
8. Plohinsky N. A. *Biometrics*. Moscow, MNU, 1970, 367 p. (in Russian)
9. Stolz K. F., Mosolov I. M., Dronov L. A. *Amperometric determination of ferrocyanide in the presence of subcellular structures*. Biochemical methods, Nauka, 1980, pp. 147–150. (in Russian)
10. Varvarenko S. M., Samaryk V. V., Vlizlo V. V., Ostapiv D. D. Fluorescein-containing theranostics based on the pseudo-poly(amino acid)s for monitoring of drug delivery and release. *Polymer Journal*, 2015, vol. 37, no. 2, pp. 193–199. (in Ukrainian)
11. Vlizlo V. V., Sologub L. I., Yanovich V. G., Antonyak G. L., Yanovich D. O. Biochemical basis of valuation of cattle mineral nutrition. Trace minerals. *The Animal Biology*, 2006, vol. 8, no. 1, pp. 41–62. (in Ukrainian)
12. Zacharenko M. O., Shevchenko V. M., Mykhal'ska V. M., Maluga L. V., Skyba O. O. The role of trace elements in animal life. *Ukrainian veterinary medicine*, 2004, vol. 2, pp. 13–16. (in Ukrainian)