

## ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСОВУВАННЯ НАНОМАТЕРІАЛІВ У ТЕХНОЛОГІЇ РАЦІОНАЛЬНОГО ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ СВИНЕЙ

**О. В. ЩЕРБАК**

*Інститут розведення і генетики тварин НААН (Чубинське, Україна)*

*ov19792006@yandex.ru*

*Застосовано наноматеріали різного походження при удосконаленні методу кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів. Здійснено оцінку in vitro біологічної активності трьох концентрацій (0,1%-, 0,01%- та 0,001%-і ) наноматеріалу на основі високодисперсного кремнезему (ВДК), альбуміну сироватки крові великої рогатої худоби (БСА) та N-ацетилнейрамінової кислоти (ВДК/БСА/N-АНК) та двох концентрацій ( $10^{-2}$  M та  $20^{-3}$  M) фулерену  $C_{60}$ . Показано, що стимулюючий ефект наноматеріалів на життєздатність кріоконсервованих сперматозоїдів залежить від природи поверхні наноматеріалу. Показано, що після перебування сперматозоїдів із додаванням 0,001%-ї концентрації ВДК/БСА/N-АНК упродовж 30 хвилин відбулось зростання активності сперматозоїдів на 13,3 %. Подовження до семи годин загального періоду виживаності сперматозоїдів забезпечила  $20^{-3}$  M концентрація фулерену  $C_{60}$ . Відображено перспективність проведення подальших біотехнологічних досліджень з використанням наноматеріалів різного походження у системі збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин.*

**Ключові слова:** свині, наноматеріал, високодисперсний кремнезем, еякульовані сперматозоїди, фулерен  $C_{60}$ , збереження генофонду, кріоконсервація

### EFFICIENCY OF APPLICATION OF NANOMATERIALS IN TECHNOLOGY OF THE RATIONAL USE OF GENETIC RESOURCES OF PIGS

**O. V. Shcherbak**

*Institute of animal breeding and genetics NAAS (Chubynske, Ukraine)*

*Nanomaterials of different origin are applied at the improvement of method of cryopreservation of ejaculation spermatozoa of boars. The estimation of is carried in vitro of biological activity of three concentrations of nanomaterial on the basis of ultrafine silica (UFS), bovine albumin serum (BSA) and N-acetylneuraminic acid (UFS/BSA/N-ANA) and two concentrations ( $10^{-2}$  M and  $20^{-3}$  M) of fullerene  $C_{60}$ . It is shown that the stimulant effect of nanomaterials on viability of the cryopreserved spermatozoa depends on nature of surface of nanomaterial. It is shown that after the stay of spermatozoa with addition the 0,001% concentration of UFS/BSA/N-ANA during 30 minutes growth of activity of spermatozoa took place on 13.3 %. Extending to seven hours total sperm survival period ensured a  $20^{-3}$  M concentration of fullerene  $C_{60}$ . The represented perspective of lead through of subsequent biotechnological researches is with the use of nanomaterials of different origin in the system of preservation and rational use of genetic resources of agricultural animals.*

**Keywords:** pigs, nanomaterials, ultrafine silica, ejaculating of spermatozoa, fullerene  $C_{60}$ , preserve the gene pool, cryopreservation

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОМАТЕРИАЛОВ В ТЕХНОЛОГИИ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ СВИНЕЙ

## О.В. Щербак

*Институт разведения и генетики животных НААН (Чубинское, Украина)*

*Представлены результаты применения наноматериалов различного происхождения при совершенствовании метода криоконсервации эякулированных сперматозоидов хряков. Осуществлена оценка *in vitro* биологической активности трех концентраций (0,1% -, 0,01% - и 0,001% -й) наноматериала, синтезированного с использованием высокодисперсного кремнезема (ВДК), альбумина сыворотки крови крупного рогатого скота (БСА) и N-ацетилнейраминовой кислоты (ВДК/БСА/N-АНК) и двух концентраций ( $10^{-2}$  М и  $20^{-3}$  М) фуллерена  $C_{60}$ . Выявлено, что стимулирующий эффект наноматериалов на жизнеспособность криоконсервированных сперматозоидов зависит от природы поверхности наноматериала. Показано, что после пребывания сперматозоидов с добавлением 0,001% -й концентрации ВДК/БСА/N-АНК в течение 30 минут произошло увеличение активности сперматозоидов на 13,3 %. Продление до семи часов общего периода выживаемости сперматозоидов обеспечила  $20^{-3}$  М концентрация фуллерена  $C_{60}$ . В статье представлена перспективность проведения дальнейших биотехнологических исследований с использованием наноматериалов различного происхождения в системе сохранения и рационального использования генетических ресурсов сельскохозяйственных животных.*

**Ключевые слова:** свиньи, наноматериал, высокодисперсный кремнезём, эякулированные сперматозоиды, фуллерен  $C_{60}$ , сохранение генофонда, криоконсервация

**Вступ.** Інтенсифікація галузі свинарства передбачає максимальне використання генетичного потенціалу тварин, яке ґрунтується на застосуванні біотехнологічних прийомів репродукції. Це можливо за умови ефективного поєднання технологічних прийомів та біологічних особливостей свиней [1, 2]. Наразі актуальними є питання підвищення інтенсивності використання репродуктивного потенціалу кнурів-плідників за рахунок застосування технології криоконсервації еякульованих сперматозоїдів [3].

В останнє десятиріччя особливу увагу приділяють вивченню впливу наноматеріалів на процеси обміну клітин, розвитку тканин та організму, що і обумовлює пріоритетність таких завдань для сучасної біології та медицини. Наразі інтенсивно створюються та практично використовуються нанорозмірні об'єкти синтетичного та біологічного походження. Широке впровадження нанотехнологій у різні галузі народного господарства підтверджується практичним застосуванням у біології, хімії, фармакології, практичній медицині, а також ембріотехнологічній системі репродукції сільськогосподарських тварин [4, 5, 6].

Сучасними дослідженнями показана можливість переносу наночастинками багатьох речовин (ДНК, білків, сполук з невеликою молекулярною масою). Встановлено, що ліпосоми та полімерні наночастинки підлягають біодеградації та є нездатними до кумуляції [7]. Цільова доставка протиракових препаратів (паклітаксель, 5-флюорурацил, доксорубіцин) встановлена експериментальними дослідженнями на тваринах [8, 9]. Для практичної реалізації таких нанофармакологічних підходів необхідні подальші дослідження, спрямовані на ретельний контроль за надходженням наносистеми до визначеного органу-мішені та вивільненням лікарського засобу із такої системи [10].

Також, наночастинки здатні впливати на метаболізм живої клітини, порушуючи його природний перебіг, в тому числі за рахунок утворення вільних радикалів. Крім того, є дані про властивість наноматеріалів проникати в мітохондрії та блокувати мітохондріальну дихальну активність. В останні роки досить широко висвітлюються результати експериментів саме на культурах клітин [11, 12]. В дослідях на ізольованих клітинах показано, що наночастинки здатні викликати ушкодження ДНК, в тому числі за рахунок блокування активності рибосом [10, 13, 14, 15]. Однак більшою мірою ці дослідження

стосуються цитотоксичності наноматеріалів у не низьких концентраціях (тобто гомеопатичних), коли не реєструються ті незначні зміни, яких недостатньо для загибелі клітин, але внаслідок яких організм зазнає певних ризиків. В результаті цього необхідним є вивчення впливу наноматеріалів різного походження на статеві клітини (сперматозоїди, яйцеклітини). Найбільш важливим у цьому аспекті є вплив на репродуктивні клітини, оскільки дослідження дії наноматеріалів є ключовою ланкою визначення ризику нових фармацевтичних агентів чи хімічних речовин. Результати таких досліджень важливі, оскільки ушкодження ДНК може ініціювати злякисне переродження клітин, а в разі змін ДНК у статевих клітинах виникає небезпека для здоров'я потомків. Таким чином, вивчення особливостей впливу наноматеріалів різного походження є також актуальним завданням для сільськогосподарської біотехнології.

Одними із сучасних та перспективних наноматеріалів нині є ВДК та вуглецеві наноструктури (фулерен  $C_{60}$ ). Показано, що в разі додавання ВДК до стандартного кріосередовища в певних концентраціях можна стимулювати життєздатність сперматозоїдів бугаїв. Модифікація його поверхні деякими біомолекулами, наприклад, моно- та олігоцукрами дала можливість створити на їх основі перспективні наноматеріали, які в разі додаванні до кріосередовища із сперматозоїдами бугаїв, баранів та людини сприяють кращій їх рухливості та виживаності [16, 17, 18, 19].

Показано, що фулерен  $C_{60}$  за кінцевої концентрації у середовищі інкубації  $10^{-5}$  М не виявляє цитотоксичних ефектів – не впливає на кількість життєздатних тимоцитів, клітин асцитної карциноми Ерліха та лейкозу L1210 у суспензіях, на накопичення продуктів перекисного окислення ліпідів у гомогенатах печінки і мозку та стійкість еритроцитів до гемолізу [20].

Частинки малих розмірів здатні проникати через мембрани клітин та безпосередньо взаємодіяти з ДНК у ядрі. В разі відсутності безпосереднього проникнення до ядра наноматеріали накопичуються у клітинах і можуть контактувати з ДНК під час мітозу, коли цілість ядерної мембрани порушується, що знову таки може спричинити утворення аберацій ДНК [21]. Таким чином, тривалість контакту та концентрації наноматеріалів з якими контактують біологічні системи потребують ретельного дослідження. Тому метою наших досліджень було дослідити вплив додавання наноматеріалів різного походження на життєздатність кріоконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів миргородської породи. В Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин НААН розпочато створення кріоколекції еякульованих сперматозоїдів кнурів миргородської породи. Цю породу свиней згідно з «Програмою збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» віднесено до вітчизняного генофондового об'єкту, який наразі перебуває на межі зникнення [22].

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проведено в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин НААН. Використано наноматеріал на основі ВДК та біомолекул (Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України), а також вуглецевий наноматеріал – фулерен  $C_{60}$  (Київський національний університет імені Тараса Шевченка). Наноматеріал ВДК/БСА/N-АНК синтезовано з використанням ВДК, БСА та N-ацетилнейрамінової кислоти. Передбачалось, що використання саме цих наноматеріалів, які додані після деконсервації сперматозоїдів усуне наявні ускладнення та забезпечить зростання життєздатності такого генетичного матеріалу автохтонних порід свиней.

ВДК/БСА/N-АНК після розморожування сперматозоїдів додавали в трьох концентраціях – 0,1 %; 0,01 %; 0,001%. Фулерен  $C_{60}$  додавали концентрації  $10^{-2}$  М та  $20^{-3}$  М. Вплив наноматеріалів у вищевказаних концентраціях (дослідні групи) на життєздатність деконсервованих сперматозоїдів кнурів миргородської породи (Дніпро 641, Комиш 853, Коханий 289) оцінювали за активністю сперматозоїдів у відсотках та виживаністю у годинах.

**Результати досліджень.** Встановлено, що свіжоодержані сперматозоїди кнурів у середньому проявляли активність на рівні 86,7 % (табл. 1). Після розрідження і 3-х годинної

еквілібрації за температури +4°C активність сперматозоїдів знизилась у середньому на 5 %. Процес криоконсервації вплинув на них так, що після деконсервації активність сперматозоїди кнурів була на 65 % нижчою, порівняно з цим показником перед заморожуванням. Під час аналізу життєздатності сперматозоїдів після деконсервації встановлено, що їх виживаність в середньому становить близько 4,5 годин (табл. 1).

**1. Показники життєздатності еякульованих сперматозоїдів кнурів мизгородської породи**

Кличка, №	Активність еякульованих сперматозоїдів, %			Виживаність після розморожування, години
	свіжоотримані сперматозоїди	перед заморожуванням	після розморожування	
Дніпро 641	90	85	20	5
Комиш 853	90	80	20	4,5
Коханий 289	80	80	10	4
Середній показник	86,7±3,33	81,7±1,66	16,7±3,33	4,5±0,29

В дослідних групах (рис. 1) через 30 хв. найбільш активними в середньому були сперматозоїди, які перебували з 0,001 %-ою концентрацією ВДК/БСА/Н-АНК (30 % ± 0,58) та з 20<sup>-3</sup> М фулерену С<sub>60</sub> (28,3 % ± 2,40), що на 13,3 % та 11,6 % вище, порівняно з контролем (сперматозоїди без додавання наноматеріалів).

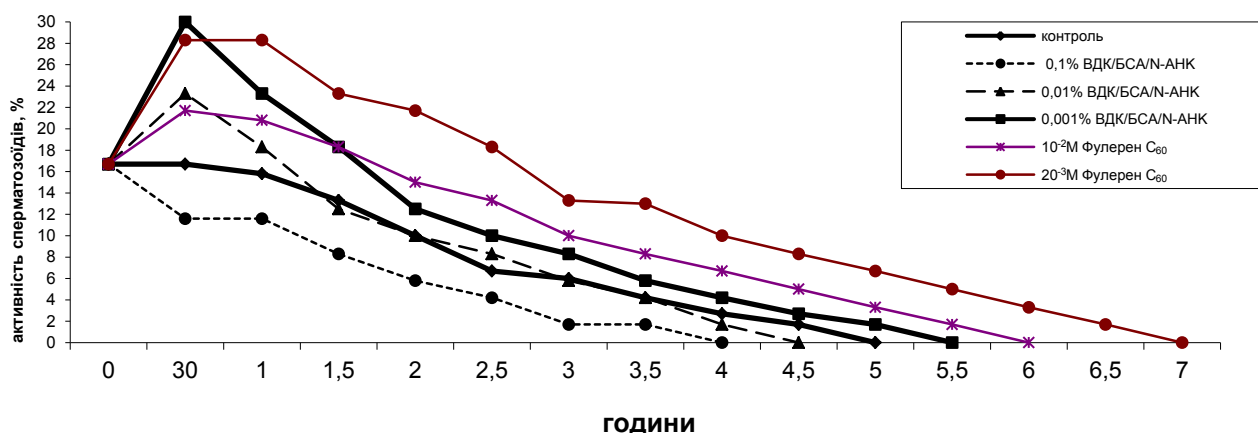


Рис. 1. Вплив різних наноматеріалів на життєздатність деконсервованих еякульованих сперматозоїдів кнурів

Найнижчу активність через 30 хв. мали сперматозоїди, які перебували із 0,1%-ою концентрацією ВДК/БСА/Н-АНК, їх активність знизилась, порівняно із контролем на 5,1 %. При аналізі активності сперматозоїдів решти дослідних груп із 0,1%-ою концентрацією наноматеріалу ВДК/БСА/Н-АНК встановлено, що їх активність знизилась на 18 %, порівняно із 0,001%-ою; на 11,7 %, порівняно з 0,01%-ою концентрацією ВДК/БСА/Н-АНК; на 10,1 %, порівняно із 10<sup>-2</sup> М фулерену С<sub>60</sub> та на 16,7 % в разі перебування сперматозоїдів із 20<sup>-3</sup> М фулерену С<sub>60</sub>. Отже, недоцільно додавати 0,1 % ВДК/БСА/Н-АНК до деконсервованих сперматозоїдів кнурів, оскільки відмічено суттєве зниження їх активності. Це вказує на те, що така концентрація наноматеріалу є високою, при цьому відбувається швидке насичення рецепторів клітинної поверхні сперматозоїдів цим наноматеріалом, що призводить до зниження їх активності.

Через 60 хвилин від початку дослідження найбільш активними були сперматозоїди із 20<sup>-3</sup> М фулерену С<sub>60</sub> (28,3 % ± 2,40) та 0,001 % ВДК/БСА/Н-АНК (23,3 % ± 3,33). В контролі на цей період спостерігалась суттєво нижча активність сперматозоїдів (15,8 % ± 3,0), порівняно з вищевказаними дослідними групами та 0,01%-ою концентрацією ВДК/БСА/Н-АНК і 10<sup>-2</sup> М фулерену С<sub>60</sub>.

Через 1,5 години від початку дослідження в контролі і в дослідних групах спостерігалось поступове зниження активності. Так відсутність активності сперматозоїдів у контролі відмічено через п'ять годин. На цей час у групі сперматозоїдів, які перебували із  $10^{-2}$  М фулерену  $C_{60}$  відмічено активність на рівні 3,3 %, в групі з  $20^{-3}$  М фулерену  $C_{60}$  спостерігали дещо вищу активність, яка становила 6,7 %.

В дослідній групі, яка перебувала із ВДК/БСА/Н-АНК в 0,1%-ій концентрації відсутність активності була відмічена вже на четверту годину досліду. Слід відмітити, що дослідні групи, які містили 0,001 % та 0,01 % ВДК/БСА/Н-АНК, так як і контроль мали подібний період їх виживаності, який не перевищував п'яти годин.

Отже, при вивченні впливу різних концентрацій та наноматеріалів на життєздатність сперматозоїдів кнурів найбільш активними виявились сперматозоїди в разі додавання  $20^{-3}$  М фулерену  $C_{60}$  та 0,001 %-ої концентрації ВДК/БСА/Н-АНК. Перший наноматеріал, який забезпечив початкове зростання активності сперматозоїдів (рис. 1) до рівня 28,3 %, в подальшому сприяв поступовому зниженню активності, яку не спостерігали лише через сім годин. ВДК/БСА/Н-АНК в 0,001%-вій концентрації початкову активність сперматозоїдів підвищив до 30,0 %, але відмічено її більш швидке зниження та відсутність через 5,5 годин.

Нами показано можливість підвищення рівня активності деконсервованих сперматозоїдів кнурів за рахунок додавання наноматеріалу фулерен  $C_{60}$  та наноматеріалу ВДК/БСА/Н-АНК, що надалі особливо важливо на початкових етапах процесу запліднення *in vitro*. Є підстави вважати, що ефект підвищення активності сперматозоїдів у присутності досліджених наноматеріалів забезпечується високим ступенем хімічної спорідненості поверхні до певних компонентів сім'яної рідини та відповідних клітинних рецепторів, що прискорює метаболічні перетворення в системі енергозабезпечення клітин.

Отже, нами запропоновано схему застосування наноматеріалів у технології декоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів, що вкрай необхідно для реалізації завдань системи збереження та раціонального використання генетичних ресурсів сільськогосподарських тварин та для відтворення зникаючих порід свиней.

**Висновки.** Отже, при вивченні впливу наноматеріалів різного походження найбільш активними виявились 0,001%-ва концентрація ВДК/БСА/Н-АНК та фулерен  $C_{60}$  в концентрації  $20^{-3}$  М. Присутність цих наноматеріалів у деконсервованих еякульованих сперматозоїдах кнурів забезпечувала позитивний вплив на життєздатність таких сперматозоїдів.

У представлених дослідженнях нами застосовано метод криоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів миргородської породи та встановлено ефективність використання ВДК/БСА/Н-АНК та фулерену  $C_{60}$  для підвищення життєздатності таких сперматозоїдів.

**Подяка.** За науковий супровід роботи висловлюємо вдячність старшому науковому співробітнику відділу біомедичних проблем поверхні Інституту хімії поверхні Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України Н. П. Галаган.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Ескин Г. В. Теория и практика искусственного осеменения свиней свежевзятной и замороженной спермой / Г. В. Ескин, А. Г. Нарижный, Г. С. Походня. – Белгород: «Везелица», 2007.– 253 с.

2. Ковтун С. І. Криоконсервация спермы хряков в системе методов сохранения генофонда животных / С. І. Ковтун, О. В. Щербак // «Современные технологии сельскохозяйственного производства»: материалы конференции, Гродно, 17 мая, 7 июня 2013 года. – Гродно, ГГАУ, 2013. – С. 378–280.

3. Комплексні біотехнології для реалізації завдань програми збереження генофонду сільськогосподарських тварин в Україні / С. Ю. Рубан, С. І. Ковтун, О. В. Щербак, О. Д. Бірюкова // Наук. - техн. бюл. / НААН, Ін-т тваринництва. – Х., 2013. – № 109. – С. 226–231.

4. Ковтун С. І. Застосування наноматеріалів у біотехнологічних дослідженнях / С. І. Ковтун // Конференція молодих вчених та аспірантів / Інститут розведення і генетики тварин УААН. – с. Чубинське, 2007. – С. 51–52.
5. Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда / В. П. Буркат, С. И. Ковтун, Н. П. Галаган // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных» – Дубровицы – Быково, 2007. – С. 450–452.
6. Застосуванням наноматеріалів у системі збереження біорізноманіття сільськогосподарських тварин України / С. І. Ковтун, О. В. Щербак, П. А. Троцький [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. – 2013. – Т. 13. – С. 57–61.
7. Nanotechnology in ocular drug delivery / Sahoo S. K., F. Dilnawaz, S. Krishnakumar // Drug Discov. Today. – 2008. – Vol.13, №3–4. – Pp. 144–151.
8. PEGylated peptide dendrimeric carriers for the deliver of antimalarial drug chloroquine phosphate / D. Bhadra, S. Bhadra, N. K. Jain // Pharm. Res. – 2006. – Vol. 23, №3. – P. 623–633.
9. Pegylated liposomal doxorubicin and mitomycin C in combination with infusional 5-fluorouracil and sodium folinic acid in the treatment of advanced gastric cancer: results of a phase II trial / Gnad-Vogt S. U., Hofheinz R. D., Saussele S., Kreil S. [et al.] // Anticancer Drugs. – 2005. – Vol.16, №4. – Pp. 435–440.
10. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells / Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M. [et al.] // Toxicol. in Vitro. 2005. – 19(7) – Pp. 975–983.
11. Cytotoxicity of nanoparticles / Lewinski N., Colvin V., Drezek R. // Small, 2008. – 4(1). – Pp. 26–49.
12. Ambient ultrafine particles: inducers of acute lung injury? / Oberdorster G., Gelein R., Johnston C. J. [et al.] // In: U. Mohr, D. L. Dungworth, J. D. Brain et al. (Eds.) Relationships between respiratory disease and exposure o airpollution, 1998. ILSI Press, Washington, Pp. 216–229.
13. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells / Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J. J., Hofmann M. C. // Toxicol. Sci., 2005. – 88(2). – Pp. 412–419.
14. Раділов, А. С. Обеспечение безопасности разработки нанотехнологий, оборота наноматериалов и продукции на их основе. Доклад на II Международном форуме по нанотехнологиям «Rusnanotech'08», 3–5 декабря 2008 г., Санкт-Петербург, 34 с.
15. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes *in vitro* / Colognato R., Bonelli A., Ponti J. [et al.] // Mutagenesis, 2008. – 23(5). – Pp. 377–382.
16. Галаган, Н. П. Наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема и биомолекул в средах с репродуктивными клетками / Н. П. Галаган // Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья : материалы II Всерос. науч. конф. с международным участием – М.; Белгород, 2006. – С. 55–59.
17. Effect of nanocomposites based of ultrafine silica on reproductive cells / N. P. Galagan, S. I. Kovtun, V. L. Osaulenko, N. M. Moshkivska // Ukrainian – German Symposium on Nanobiotechnology, December 14–16, 2006, Kyiv. – Pp. 62.
18. Nanocomposites in biotechnology for prolonged preservation of gene pool (synthesis and application) / N. P. Galagan, I. V. Siora, S. I. Kovtun, O. V. Shcherbak // XI Polish – Ukrainian Symposium «Theoretical and experimental studies of interfacial phenomena and their technological applications», August 22–26, 2007. – Krasnobrod – Zamosc, 2007. – Pp. 27.
19. Nanobiotechnologies are already preservation of gene pool of farm animals / S. I. Kovtun, N. P. Galagan, O. V. Shcherbak, O. S. Osypchuk // The International Summer School «Nanotechnology: from fundamental research to innovatiона» and International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO–2013), August 25 – September 1, 2013, Edited by Prof. L. Yatsenco. – Lviv: Eurosvit, 2013. – Pp. 374–375.

20. Прилуцька, С. В. Біохімічні ефекти фулеренів C<sub>60</sub> та C<sub>60</sub>-композитів у клітинах різних типів: автореф. дис. ... кандидата біологічних наук / Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ. – 2007. – 17с.

21. Ferrari M. (2005) Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer*, 5(3): 161–171.

22. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І.В. Гузева, консультація та специфікація Ю.Ф. Мельника. – К. : Арістей, 2009. – 132 с.

## REFERENCES

1. Eskin, G. V., A. G. Narizhnyy and G. S. Pokhodnya. 2007. *Teoriya i praktika iskusstvennogo oshemeniya sviney svezhevzyatoy i zamorozhennoy spermoy – Theory and practice of artificial insemination of pigs fresh and frozen semen*. Belgorod, Vezelica, 253 (in Russian).

2. Kovtun, S. I. and Shcherbak O. V. 2013. Kriokonservatsiya spermy khryakov v sisteme metodov sokhraneniya genofonda zhivotnykh – Cryopreservation of boar semen in the methods of preservation of the gene pool of animals. *Sovremennye tekhnologii sel's'kokhozyaystvennogo proizvodstva: materialy konferentsii, Grodno, 17 maya, 7 iyunya 2013 goda – Grodno, GGAU – Modern technologies of farm production: conference materials, Grodno, 17 May, 7 June 2013*. 378–280 (in Russian).

3. Ruban, S. Yu., Kovtun S. I., Shcherbak O. V. and Biryukova O. D. 2013. Kompleksni biotekhnolohiyi dlya realizatsiyi zavdan' prohramy zberezheniya henofondu sil's'kohospodars'kykh tvaryn v Ukrayini – Comprehensive biotechnology for program purposes preserve the gene pool of farm animals in Ukraine. *Nauk. – tekhn. byul. In-t tvarynnystva NAAN – Scientific and Technical Bulletin Institute of Animal*. 109:226–231 (in Ukrainian).

4. Kovtun, S. I. 2007. *Zastosuvannya nanomaterialiv u biotekhnolohichnykh doslidzhennyakh – The use of nanomaterials in biotechnological research* / S.I. Kovtun // Konferentsiya molodykh vchenykh ta aspirantiv Instytut rozvedennya i henetyky tvaryn UAAN – Conference of young scientists and graduate Institute of Animal Breeding and Genetics Agrarian Sciences. Chubyns'ke, 51–52 (in Ukrainian).

5. Burkat, V. P., S. I. Kovtun and N. P. Galagan. 2007. Nanobiotekhnologicheskie metody dlya sokhraneniya genofonda – Nanobiotechnology methods to preserve the gene pool. *Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii Aktual'nye problemy biologii vosproizvodstva zhivotnykh Dubrovitsy–Bykovo – Materials of the international scientific-practical conference Actual problems of reproductive biology of animals, Dubrovicy, Bikovo, 450–452* (in Russian).

6. Kovtun, S. I., Shcherbak O. V., Troc'kij P. A., Galic'ka T. V., Zjuzjun A. B. 2013. Zastosuvanniam nanomaterialiv u systemi zberezheniya bioriznomanittya sil's'kohospodars'kykh tvaryn Ukrayiny – The use of nanomaterials in the system preservation of biodiversity of farm animals Ukraine. *Fakty eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv: Zb. nauk. pr. – Factors Experimental evolution of organisms: Coll. Sciences. Av. 13: 57–61* (in Ukrainian).

7. Sahoo, S. K., F. Dilnawaz and S. Krishnakumar. 2008. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov. Today*. 13(3–4):144–151.

8. Bhadra, D., S. Bhadra and N. K. Jain. 2006. PEGylated peptide dendrimeric carriers for the deliver of antimalarial drug chloroquine phosphate. *Pharm. Res.* 23(3):623–633.

9. Gnad-Vogt, S. U., R. D. Hofheinz, S. Saussele, S. Kreil, A. Willer, F. Willeke, L. Pilz, R. Hehlmann and A. Hochhaus. 2005. Pegylated liposomal doxorubicin and mitomycin C in combination with infusional 5-fluorouracil and sodium folinic acid in the treatment of advanced gastric cancer: results of a phase II trial. *Anticancer Drugs*. 16(4): 435–440.

10. Hussain, S. M., K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss and J. J. Schlager. 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. in Vitro*, 19(7):975–983.

11. Lewinski, N., V. Colvin and R. Drezek. 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small-Journal*, 4(1): 26–49.

12. Oberdorster, G., R. Gelein, C.J. Johnston, P. Mercer, N. Corson and J. N. Finkelstein. 1998. Ambient ultrafine particles: inducers of acute lung injury? In: U. Mohr, D.L. Dungworth, J.D. Brain (Eds.) *Relationships between respiratory disease and exposure to air pollution*, ILSI Press, Washington, 216–229.
13. Braydich-Stolle, L., S. Hussain, J. J. Schlager and M. C. Hofmann. 2005. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.*, 88(2):412–419.
14. Radilov, A. S. 2008. Obespechenie bezopasnosti razrabotki nanotekhnologij, oborota nanomaterialov i produkcii na ih osnove – Securing the development of nanotechnology, nanomaterials turnover and products based on them. *Doklad na II Mezhdunarodnom forume po nanotekhnologijam «Rusnanotech'08», 3–5 dekabnja 2008 g.*, Sankt-Peterburg – *Report at the II International Forum on Nanotechnologies usnanotech'08, 3-5 December 2008*, St.-Petersburg, 34 (in Russian).
15. Colagnato, R., A. Bonelli, J. Ponti, M. Farina, E. Bergamaschi, E. Sabbioni, and L. Migliore. 2008. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes *in vitro*. *Mutagenesis*, 23(5):77–382.
16. Galagan, N. P. 2006. Nanomaterialy na osnove vysokodispersnogo kremnezema i biomolekul v sredah s reproduktivnymi kletkami – Nanomaterials based on ultra fine silica and biomolecules in environments with reproductive cells. *Sorbenty kak faktor kachestva zhizni i zdorov'ja : materialy II Vseros. nauch. konf. s mezhdunarodnym uchastiem*. Moskva-Belgorod, 55–59 (in Russian).
17. Galagan, N. P., S. I. Kovtun, V. L. Osaulenko, N. M. Moshkivska. 2006. Effect of nanocomposites based of ultrafine silica on reproductive cells. Ukrainian – *German Symposium on Nanobiotechnology*, December 14 – 16. Kyiv, 62.
18. Galagan N. P., I. V. Siora, S. I. Kovtun, O. V. Shcherbak. 2007. Nanocomposites in biotechnology for prolonged preservation of gene pool (synthesis and application). *XI Polish – Ukrainian Symposium «Theoretical and experimental studies of interfacial phenomena and their technological applications», August 22 – 26*. Krasnobrod, Zamosc, 27.
19. Kovtun S. I., N. P. Galagan, O. V. Shcherbak, and O. S. Osypchuk. 2013. Nanobiotechnologies are already preservation of gene pool of farm animals. *The International Summer School Nanotechnology: from fundamental research to innovation and International research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO–2013), August 25 – September 1, 2013*, Edited by Prof. L. Yatsenco. Lviv, Eurosvit, 374–375.
20. Pryluts'ka, S.V. 2007. *Biokhimichni efekty fulereniv S<sub>60</sub> ta S<sub>60</sub>-kompozytiv u klitynakh riznykh typiv: avtoreferat dysertatsiyi ... kandydata biolohichnykh nauk. Kyyivs'kyy natsional'nyy univertsytet imeni Tarasa Shevchenka – Biochemical effects of fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>60</sub>-composites in various types of cells: abstract of thesis of dissertation ... doctor of agricultural sciences*:Kyiv, 17 (in Ukrainian).
21. Ferrari M. 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer*, 5(3):161–171.
22. 2009. Prohrama zberezheniya henofondu osnovnykh vydiv sil'skohospodars'kykh tvaryn v Ukrayini na period do 2015 roku, zah. nauk. red. I.V. Huzyeva, konsul'tatsiya ta spetsyfikatsiya Yu. F. Mel'nyka. Kyiv, Aristey, 132 (in Ukrainian).