

Міністерство охорони здоров'я України
Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПЕТРЕНКО Яна Юріївна

УДК 577:616-099:[546.47-31-022.513.2+632.954]

ДИСЕРТАЦІЯ
ІНТЕГРАЛЬНІ БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ТОКСИЧНОСТІ
НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ ТА ГЕРБІЦИДУ ГЛІФОСАТУ

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Я. Ю. Петренко

Науковий керівник: **Корда Михайло Михайлович**, член-кореспондент
НАМН України, доктор медичних наук, професор

Тернопіль – 2023

АНОТАЦІЯ

Петренко Я. Ю. Інтегральні біохімічні механізми токсичності наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуального наукового завдання, яке полягає у з'ясуванні біохімічних і морфологічних механізмів інтегральних ефектів токсичності наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату та оцінці загальних ризиків для здоров'я, пов'язаних з одночасним введенням в організм наноматеріалів і хімічних речовин.

Експериментальні дослідження проведені на щурах–самцях масою тіла 160-180 г. Всі тварини були поділені на такі групи: I – інтактні (контрольні) щурі, яким щоденно внутрішньошлунково вводили фізіологічний розчин (0,5 мл/кг); II – щурі, яким щоденно внутрішньошлунково впродовж 14-и діб вводили 0,5 мл суспензії наночастинок ZnO у фізрозчині в дозі 100 мг/кг маси тіла; III – щурі, яким щоденно внутрішньошлунково впродовж 14-и діб вводили 0,5 мл розчину гліфосату у дозі 250 мг/кг маси тіла; IV – щурі, яким впродовж 14-и діб вводили 0,5 мл суспензії наночастинок ZnO у розчині гліфосату (دوزи наночастинок і гербіциду були такими ж, як у групах II і III). Евтаназію щурів здійснювали на 15-у добу, для досліджень використовували сироватку крові, тканини печінки, нирок і селезінки.

Результати досліджень функціонального стану печінки показали, що введення тваринам суспензії наночастинок призводить до незначного (в 1,27-1,34 рази) проте достовірного зростання активності ферментів-маркерів цитолізу гепатоцитів – аланін- і аспартатамінотрансфераз. При цьому активність лужної фосфатази, маркера холестази, не зазнавала суттєвих змін. Також після введення тваринам наноформ ZnO не змінювалася здатність гепатоцитів синтезувати білок і азотовмісні продукти, а також не порушувалася екскреторна функція печінки. Введення гліфосату призводило як до вираженого цитолізу гепатоцитів, так і до холестази, порушень білоксинтетичної та екскреторної функцій печінки: активність АлАТ і АсАТ в сироватці крові зростала в 1,8 і 1,7 рази, лужної фосфатази – в 1,4 рази ($p < 0,05$), вміст білка зменшувався на 13 % ($p < 0,05$), рівень загального білірубіну підвищувався в 1,9 рази, креатиніну – в 1,4 рази, вміст сечовини знижувався в 1,4 рази ($p < 0,05$). У найбільшому ступені досліджувані показники змінювалися у сироватці крові щурів, яким вводили наночастинки сумісно з гліфосатом. У цьому випадку активність амінотрансфераз, лужної фосфатази і вміст білірубіну були достовірно вищими порівняно з щурами, яким вводили тільки наночастинки чи тільки гліфосат.

Введення щурам наночастинок ZnO викликало достовірні зміни показників інтенсивності процесів ліпопероксидації і окислювальної модифікації білків: вміст ТБК-активних продуктів у сироватці збільшувався на 23 % ($p < 0,05$), альдегідо- і кетоніпохідних нейтрального характеру – на 45 %, основного характеру – на 66 % ($p < 0,05$). Застосування гліфосату призводило до вираженішої активації процесів пероксидації ліпідів і білків: вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові зростав на 42 %, альдегідо- і кетоніпохідних нейтрального і основного характеру – відповідно на 70 % і 100 % ($p < 0,05$). Наночастинок ZnO викликали достовірне зниження активності каталази (на 22 %) і вмісту церулоплазміну (на 14 %) в сироватці крові тварин. Гліфосат призводив до значно глибших порушень

антиоксидантної системи: активність каталази знижувалася більше, ніж в 1,5 раза ($p < 0,05$), вміст церулоплазміну – на 26 % ($p < 0,05$). Крім того під впливом гербіциду на 26 % знижувалася загальна антиоксидантна активність сироватки крові і на 29 % – вміст відновленого глутатіону ($p < 0,05$). Суттєвих змін під впливом досліджуваних агентів зазнавала також антиоксидантна система печінки: наночастинки пригнічували активність супероксиддисмутази в гепатоцитах в 1,3 раза, каталази 1,4 раза, гліфосат – відповідно в 1,6 раза і 1,7 раза ($p < 0,05$). Найсуттєвіше досліджувані показники оксидативного стресу проявилися у тварин, яким вводили наночастинки ZnO сумісно з гліфосатом. У цьому випадку зміни показників вмісту ТБК-активних продуктів, окислено-модифікованих білків і церулоплазміну в сироватці крові, загальної антиоксидантної активності сироватки і активності супероксиддисмутази в печінці були достовірно вираженішими порівняно як з групою тварин, яким вводили самі наночастинки, так і з групою, якій вводили тільки гербіцид.

Наночастинки ZnO викликали підвищення (в 1,3 раза, $p < 0,05$) загальної активності NO-синтази у печінці. Очевидно, що така активація ферменту призводила до збільшення (в 1,4 раза, $p < 0,05$) вмісту метаболітів оксиду азоту в крові. При введенні гліфосату активність NO-синтази підвищувалася в 1,7 раза ($p < 0,05$), при цьому вміст нітратів і нітритів в сироватці крові збільшувався в 1,8 раза ($p < 0,05$). Найбільшою мірою система оксиду азоту активувалася у тварин, яким гліфосат вводили разом з наночастинками, при цьому вплив комбінації досліджуваних чинників був достовірним в порівнянні з їх окремим введенням.

Введення тваринам наночастинок оксиду цинку не викликало достовірних змін показників як гуморальної ланки імунітету, так і показників цитокінового профілю сироватки крові. Застосування гліфосату призводило до достовірного підвищення концентрація Ig G (у 1,7 раза), а також концентрацій TNF- α (у 3,5 раза), IL-1 β (у 4,8 раза), IL-6 (у 3,3 раза), і

зниження концентрацій IL-4 (у 1,5 раза), IL-10 (у 1,4 раза) у сироватці крові щурів. Найбільш суттєво імунний та цитокиновий статус змінювався у сироватці крові щурів, яким вводили гербіцид гліфосат разом з наночастинками оксиду цинку.

Введення тваринам наночастинок ZnO не супроводжувалося достовірним зростанням генерації активних форм кисню нейтрофілами крові та кількості клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом. Натомість, застосування гліфосату зумовило інтенсифікацію (в 1,9 раза, $p < 0,05$) генерації активних форм кисню нейтрофільними лейкоцитами, а також підвищення (в 1,7 раза, $p < 0,05$) кількості нейтрофілів зі зниженим мітохондріальним потенціалом. У групі тварин, яким вводили комбінацію наночастинок і гліфосату, досліджувані показники були достовірно вищими як порівняно з тваринами, які отримували тільки наночастинки, так і з щурами, яким вводили тільки гліфосат.

Після введення щурам наночастинок ZnO досліджувана клітинна популяція нейтрофілів характеризувалася переважно живими і невеликою кількістю апоптичних і некротичних клітин. В той же час гліфосат викликав достовірні зміни показників вираженості апоптозу і некрозу нейтрофілів: рівень PI⁺-клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, перевищував показник норми в 1,6 раза ($p < 0,05$), відсоток ANV⁺ нейтрофілів, який відповідає за ранній апоптоз, перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин у 1,9 раза ($p < 0,05$). Найбільшою мірою інтенсивність процесів апоптозу і некрозу нейтрофілів крові підвищувалася у щурів, яким вводили наночастинки оксиду цинку разом з гліфосатом.

За умов введення щурам наночастинок ZnO спостерігалось достовірне (в 1,9 раза) підвищення в мікросомальній фракції печінки активності неспецифічної монооксигенази I-ї фази біотрансформації ксенобіотиків етоксирезорифін O-деетилази, а також УДФ-глюкуронілтрансферази (в 1,4 раза, $p < 0,05$), яка каталізує процес глюкуронування у II фазі детоксикації.

Гліфосат призвів до підвищення активності етоксирезорурфін О-деетилази в 2,6 раза ($p < 0,05$), УДФ-глюкуронілтрансферази – в 1,8 раза ($p < 0,05$), а також до зниження (в 1,8 раза, $p < 0,05$) активності глутатіонтрансферази, яка належить до ензимів II-ї фази детоксикації ксенобіотиків. Максимальні зміни показників функціонування ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків зафіксовано у тварин, яким вводили гліфосат разом з наночастинками ZnO.

Морфологічні дослідження показали, що введення тваринам наночастинок ZnO призводило до незначних пристосувальних змін судинного та паренхіматозного компонентів печінки. Застосування гліфосату викликало суттєві судинні розлади (розширення і повнокрів'я вен, спазмування просвітів міжчасточкових артерій, розширення синусоїдів із явищами тромбозу та складж феномену еритроцитів) та порушення гістоархітекtonіки печінки (порушення балкового розміщення гепатоцитів, втрата контурів каріолеми, ознаки вакуольної дистрофії цитоплазми).

Наночастинки ZnO викликали лише незначні реактивні зміни судинного русла нирок. Гліфосат призводив до виражених альтеративні (гіпертрофія ниркових тілець, звуження просвіту капсули, деформація ниркових тілець) та дистрофічних (гідропічна дистрофія епітеліоцитів проксимальних каналців, набряк та дистрофія нефроцитів) змін паренхіматозних компонентів нирок на тлі значних судинних розладів.

Наночастинки ZnO викликали незначні дисциркуляторні зміни і гіперплазію лімфатичних фолікулів білої пульпи в селезінці щурів. За умов введення гліфосату на фоні підвищеної проникності судинних стінок органу (судини повнокровні із формуванням у їх просвітах складжів та тромбів) відбувалася структурна перебудова стромального компоненту селезінки (підвищена гідратація основної речовини сполучної тканини, ретикулярних та колагенових волокон, ретикулярної сітки) та деструктуризація білої пульпи.

За умов поєднаного застосування гліфосату та наночастинок оксиду цинку спостерігався їх синергічний ефект – судинні та деструктивно-дегенеративні зміни структурних компонентів печінки, нирок і селезінки були найбільш значними порівняно з іншими експериментальними групами.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розкриті токсикологічні механізми синергічних ефектів наночастинок ZnO і гліфосату при їх спільному введенні тваринам. Вперше продемонстровано, що наночастинок ZnO посилюють гепатотоксичний ефект гліфосату, що може бути зумовлено потенціюванням здатності гліфосату викликати оксидативний стрес. Вперше показано, що наночастинок оксиду цинку посилюють негативний ефект гліфосату на систему синтезу оксиду азоту. Вперше показано, що наночастинок ZnO поглиблюють дисбаланс між про- і антизапальними цитокінами, викликаний гліфосатом. Уперше продемонстровано, що наночастинок ZnO посилюють здатність гліфосату підвищувати продукцію внутрішньоклітинних активних форм кисню, кількість клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, а також апоптично та некротично змінених нейтрофілів крові. Уперше встановлено, що наночастинок ZnO потенціюють негативний вплив хімічного токсиканта гліфосату на ендоплазматичну систему біотрансформації сторонніх речовин. Уперше показано, що введення експериментальним тваринам наночастинок оксиду цинку сумісно з гербіцидом гліфосатом призводить до більш виражених структурних патологічних змін в тканинах печінки, нирок і селезінки порівняно з такими при дії тільки хімічного токсиканта.

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень дозволяють зрозуміти механізми комбінованого токсичного впливу наночастинок оксидів металів і токсикантів хімічної природи на живі організми. Отримані токсикологічні характеристики сумісного застосування наночастинок оксиду цинку і гліфосату дадуть можливість попередити

негативні ефекти попадання в організм наноматеріалів і гербіцидів та можуть стати базою для оцінки інтегрального ризику їх виробництва і поширення та для гігієнічного нормування наночастинок оксиду цинку і фосфорорганічних гербіцидів в об'єктах навколишнього середовища.

Ключові слова: наночастинки ZnO, гліфосат, функціональний стан печінки, оксидативний і нітрооксидативний стрес, цитокіновий профіль, система детоксикації ксенобіотиків, апоптоз, морфологічні зміни.

SUMMARY

Petrenko Ya. Yu. Integral biochemical mechanisms of zinc oxide nanoparticles and herbicide glyphosate toxicity. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for obtaining a scientific degree of Doctor of Philosophy in the 222 «Medicine» (22 «Health Care»). – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

– Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

The dissertation provides a theoretical generalization and a new solution to an actual scientific problem, which consists in elucidating the biochemical and morphological mechanisms of the integral effects of zinc oxide nanoparticles and herbicide glyphosate toxicity and assessing the general health risks associated with the simultaneous introduction of nanomaterials and chemicals into the body.

Experimental studies were carried out on male rats with a body weight of 160-180 g. All animals were divided into the following groups: I – intact (control) rats, which were daily intragastrically administered with physiological solution (0.5 ml/kg); II – rats, which were administered daily intragastrically for 14 days with 0.5 ml of a suspension of ZnO nanoparticles in physiological solution at a dose of 100 mg/kg of body weight; III – rats, which were administered

intragastrically daily for 14 days with 0.5 ml of glyphosate solution at a dose of 250 mg/kg of body weight; IV – rats that were administered with 0.5 ml of a suspension of ZnO nanoparticles in a glyphosate solution for 14 days (the doses of nanoparticles and herbicide were the same as in groups II and III). Rats were euthanized on the 15th day; blood serum, liver tissue, kidney and spleen were used for research.

The results of studies of the liver functional state showed that the administration of nanoparticles suspension leads to a slight (1.27-1.34 times) but significant increase in the activity of enzymes-markers of hepatocyte cytolysis – alanine and aspartate aminotransferases. At the same time, the activity of alkaline phosphatase, a marker of cholestasis, did not change significantly. Also, after administration of ZnO nanoforms to animals, the ability of hepatocytes to synthesize protein and nitrogen-containing products did not change, and the excretory function of the liver was not disturbed. Administration of glyphosate led to pronounced cytolysis of hepatocytes, as well as to cholestasis, disorders of the protein synthetic and excretory functions of the liver: the activity of ALT and AST in the blood serum increased by 1.8 and 1.7 times, alkaline phosphatase – by 1.4 times ($p < 0.05$), the protein content decreased by 13% ($p < 0.05$), the level of total bilirubin increased by 1.9 times, creatinine by 1.4 times, the urea content decreased by 1.4 times ($p < 0.05$). To the greatest degree, the studied indicators changed in the blood serum of rats that were administered with nanoparticles in combination with glyphosate. In this case, the activity of aminotransferases, alkaline phosphatase and the content of bilirubin were significantly higher compared to rats that were administered only with nanoparticles or only with glyphosate.

Administration of ZnO nanoparticles to rats caused significant changes in the intensity of lipoperoxidation and oxidative modification of proteins: the content of TBA-active products in the serum increased by 23% ($p < 0.05$), neutral aldehyde and ketone derivatives – by 45%, basic – by 66% ($p < 0.05$). The use of glyphosate led to a more pronounced activation of lipid and protein peroxidation processes:

the content of TBA-active products in blood serum increased by 42%, neutral and basic aldehyde and ketone derivatives – by 70% and 100%, respectively ($p<0.05$). ZnO nanoparticles caused a significant decrease in catalase activity (by 22%) and ceruloplasmin content (by 14%) in the blood serum of animals. Glyphosate led to significantly deeper disorders of the antioxidant system: catalase activity decreased more than 1.5 times ($p<0.05$), ceruloplasmin content – by 26% ($p<0.05$). In addition, under the effect of the herbicide, the total antioxidant activity of blood serum decreased by 26% and the content of reduced glutathione decreased by 29% ($p<0.05$). The antioxidant system of the liver also underwent significant changes under the influence of the studied agents: nanoparticles suppressed the activity of superoxide dismutase in hepatocytes by 1.3 times, catalase by 1.4 times, glyphosate by 1.6 times and 1.7 times, respectively ($p<0.05$). The most significantly investigated indicators of oxidative stress appeared in animals that were administered with ZnO nanoparticles in combination with glyphosate. In this case, the changes in the content of TBC-active products, oxidized proteins and ceruloplasmin in the blood serum, the total antioxidant activity of the serum and the activity of superoxide dismutase in the liver were significantly more pronounced compared to both the group of animals that were administered with the nanoparticles themselves and the group that only herbicide was administered.

ZnO nanoparticles increased (by 1.3 times, $p<0.05$) the total activity of NO-synthase in the liver. It is obvious that this activation of the enzyme led to an increase (by 1.4 times, $p<0.05$) in the content of nitric oxide metabolites in the blood. When glyphosate was administered, NO-synthase activity increased 1.7 times ($p<0.05$), while the content of nitrates and nitrites in blood serum increased 1.8 times ($p<0.05$). To the greatest extent, the nitric oxide system was activated in animals that were administered glyphosate together with nanoparticles, while the effect of the combination of the studied factors was significant in comparison with their separate administration.

Administration of zinc oxide nanoparticles to animals did not cause significant changes in both humoral immunity the cytokine profile of blood serum. The use of glyphosate led to a significant increase in the concentration of Ig G (by 1.7 times), as well as the concentrations of TNF- α (by 3.5 times), IL-1 β (by 4.8 times), IL-6 (by 3.3 times), and a decrease in the concentrations of IL-4 (by 1.5 times), IL-10 (1.4 times) in blood serum of rats. The most significant change to the immune and cytokine serum levels was detected in the rats injected with herbicide glyphosate together with zinc oxide nanoparticles.

Administration of ZnO nanoparticles to animals was not accompanied by a significant increase in the generation of active forms of oxygen by blood neutrophils and the number of cells with reduced mitochondrial transmembrane potential. Instead, the use of glyphosate caused an intensification (by 1.9 times, $p < 0.05$) of the generation of reactive oxygen species by neutrophilic leukocytes, as well as an increase (by 1.7 times, $p < 0.05$) of the number of neutrophils with reduced mitochondrial potential. In the group of animals that were administered with a combination of nanoparticles and glyphosate, the studied indicators were significantly higher both compared to animals that received only nanoparticles, and to rats that were injected only with glyphosate.

After the administration of ZnO nanoparticles to rats, the studied cell population of neutrophils was characterized by mainly live cells and a small number of apoptotic and necrotic cells. At the same time, glyphosate caused significant changes in the severity of apoptosis and necrosis of hepatocytes: the level of PI $^{+}$ cells, which characterize the intensity of necrotic processes, exceeded the norm by 1.6 times ($p < 0.05$), the percentage of ANV $^{+}$ neutrophils, which are responsible for early apoptosis, exceeded the similar indicator of the control group of animals by 1.9 times ($p < 0.05$). The intensity of the processes of apoptosis and necrosis of blood neutrophils increased to the greatest extent in rats that were administered with zinc oxide nanoparticles together with glyphosate.

Under the conditions of administration of ZnO nanoparticles to rats, a significant (1.9-fold) increase in the activity of non-specific monooxygenase of the I-th phase of biotransformation of xenobiotics ethoxyresorufin O-deethylase, as well as UDP-glucuronyltransferase (1.4-fold, $p < 0.05$), which catalyzes the glucuronidation process in the II phase of detoxification was observed in the microsomal fraction of the liver. Glyphosate led to an increase in the activity of ethoxyresorufin O-deethylase by 2.6 times ($p < 0.05$), UDP-glucuronyltransferase – by 1.8 times ($p < 0.05$), and also to the decrease (by 1.8 times, $p < 0.05$) of the glutathione transferase activity, which belongs to the enzymes of the II phase of detoxification of xenobiotics. The maximum changes in indicators of the functioning of the xenobiotics biotransformation enzymatic system were recorded in animals that were administered with glyphosate together with ZnO nanoparticles.

Morphological studies showed that the administration of ZnO nanoparticles to animals led to minor adaptive changes in the vascular and parenchymal components of the liver. The use of glyphosate caused significant vascular disorders (dilation and hemoptysis of veins, spasm of the lumens of interlobular arteries, dilation of sinusoids with the thrombosis and sludge phenomenon of erythrocytes) and disruption of the histoarchitectonics of the liver (disruption of the beam arrangement of hepatocytes, loss of karyolemma contours, vacuolar cytoplasmic dystrophy).

ZnO nanoparticles caused only minor reactive changes in the vascular bed of the kidneys. Glyphosate led to pronounced alterative (hypertrophy of the renal corpuscles, narrowing of the capsule lumen, deformation of the renal corpuscles) and dystrophic (hydropic dystrophy of the epitheliocytes of the proximal tubules, swelling and dystrophy of the nephrocytes) changes in the parenchymal components of the kidneys on the background of significant vascular disorders.

ZnO nanoparticles caused minor dyscirculatory changes and hyperplasia of lymphatic follicles of the white pulp in the spleen of rats. In the administration of

glyphosate the restructuring of the stromal component of the spleen (increased hydration of the main substance of connective tissue, reticular and collagen fibers, reticular mesh) and destructuring of the white pulp took place on the background of increased permeability of the vascular walls of the organ (vessels are full of blood with the formation of sludge and blood clots in their lumens).

Under the conditions of combined use of glyphosate and zinc oxide nanoparticles, their synergistic effect was observed – vascular and destructive-degenerative changes in the structural components of the liver, kidneys and spleen were the most significant compared to other experimental groups.

Scientific novelty of the obtained results. For the first time, the toxicological mechanisms of the synergistic effects of ZnO nanoparticles and glyphosate when they are administered to animals were revealed. For the first time, ZnO nanoparticles have been shown to enhance the hepatotoxic effect of glyphosate, which may be due to the potentiation of glyphosate's ability to induce oxidative stress. It was shown for the first time that zinc oxide nanoparticles increase the negative effect of glyphosate on the nitric oxide synthesis system. For the first time, ZnO nanoparticles have been shown to exacerbate the imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines caused by glyphosate. It was demonstrated for the first time that ZnO nanoparticles enhance the ability of glyphosate to increase the production of intracellular reactive oxygen species, the number of cells with reduced mitochondrial transmembrane potential, as well as apoptotically and necrotically altered blood neutrophils. It was established for the first time that ZnO nanoparticles potentiate the negative effect of the chemical toxicant glyphosate on the endoplasmic system of biotransformation of foreign substances. For the first time, it was shown that the introduction of zinc oxide nanoparticles into experimental animals in combination with the herbicide glyphosate leads to more pronounced structural pathological changes in the tissues of the liver, kidneys, and spleen compared to those caused by the chemical toxicant alone.

Practical significance of the obtained results. The results of the research allow us to understand the mechanisms of the combined toxic effect of metal oxides nanoparticles and chemical toxicants on living organisms. The obtained toxicological characteristics of the combined use of zinc oxide nanoparticles and glyphosate will provide an opportunity to prevent the negative effects of nanomaterials and herbicides entering the body and can become a basis for assessing the integral risk of their production and distribution and for the hygienic regulation of zinc oxide nanoparticles and organophosphorus herbicides in environmental objects.

Key words: ZnO nanoparticles, glyphosate, functional state of the liver, oxidative and nitrooxidative stress, cytokine profile, xenobiotic detoxification system, apoptosis, morphological changes.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки оксиду цинку посилюють гепатотоксичний ефект гербіциду гліфосату. *Медицина та клінічна хімія*. 2019. Т. 21, № 4. С. 32–36. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i4.10824
2. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки оксиду цинку посилюють викликаний гербіцидом гліфосатом оксидативний та нітрооксидативний стрес. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 2. С. 7–82. DOI: 10.11603/1811-2471.2020.v.i2.11314
3. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату на стан гуморальної ланки імунної системи. *Медицина та клінічна хімія*. 2022. Т. 24, № 4. С. 62–66. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2022.i4.13574

4. Гапоненко Я. Ю., Корда М. М. Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокіновий профіль наночастинками оксиду цинку. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2023. № 1 (15). С. 5–9. DOI: 10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13444

5. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив наночастинок оксиду цинку на прооксидний та проапоптичний ефекти гліфосату. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2023. Т. 96, № 1. С. 5–11. DOI: 10.25040/espb2023.01-02.005

6. Петренко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Гістологічні зміни в органах тварин під впливом наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2023. № 2. С. 156–163. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13949

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Вплив наночастинок оксиду цинку на функціональний стан печінки щурів. *Матеріали XII українського біохімічного конгресу, 30 вересня. – 4 жовтня 2019р. Тернопіль. Медична та клінічна хімія*. 2019. Т. 21, № 3 (80). С. 172–173.

8. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки ZnO посилюють прооксидні ефекти гліфосату. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 червня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 141–142.

9. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Дозозалежний ефект токсичності наночастинок оксиду цинку і гліфосату. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 11 червня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 57.

10. Летняк Н. Я., Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату на продукцію активних форм кисню. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня*

фармакологічна корекція : матеріали IV наук.-практ. конф. з міжнародною участю, 18 листопада 2021 р. Харків, 2021. С. 171.

11. Гапоненко Я. Ю., Корда М. М. Нітрооксидативний стрес в патогенезі ураження печінки наночастинками ZnO і гліфосатом. В: *Особливості науково-педагогічного процесу в період пандемії COVID-19* : матеріали пленуму Українського наукового товариства патофізіологів, 15-17 вересня 2022 р.. Тернопіль, 2022. С. 18–19.

12. Петренко Я. Ю., Летняк Н. Інтегральні токсичні ефекти наночастинок хімічних речовин в біологічних системах. *Майбутнє за наукою* : матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених, 10-12 квітня 2023 р. Тернопіль, 2023. С. 242.

13. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив наночастинок ZnO та гліфосату на морфофункціональний стан печінки щурів. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали V наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, 18 травня 2023 р. Харків, 2023. С. 249–250.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень	19	
Вступ	20	
Розділ 1	Наноматеріали: сфери застосування, токсикологічні властивості (огляд літератури)	28
1.1	Наночастинки оксиду цинку: застосування в медицині і біології	28
1.2	Токсичність наночастинок ZnO	40
1.3	Гербіцид гліфосат: загальна характеристика і токсичність	44
Розділ 2	Матеріали та методи дослідження	55
2.1	Характеристика експериментального дослідження	55
2.2	Дослідження показників функціонального стану печінки	56
2.3	Методи дослідження інтенсивності оксидативного стресу	57
2.4	Методи дослідження стану системи оксиду азоту	61
2.5	Дослідження гуморальної ланки імунної системи	62
2.6	Дослідження цитокінового профілю сироватки крові	63
2.7	Методи дослідження функціональної та метаболічної активності нейтрофільних лейкоцитів крові	63
2.8	Методи дослідження біотрансформації ксенобіотиків	67
2.9	Морфологічне дослідження тканини печінки, нирки, селезінки	68
2.10	Методи статистичної обробки результатів	68
Розділ 3	Вплив наночастинок оксиду цинку на токсикологічні ефекти гербіциду гліфосату	69
3.1	Вплив наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату на функціональний стан печінки щурів	70

3.2	Вплив наночастинок оксиду цинку та гліфосату на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в сироватці крові й печінці щурів	75
3.3	Гуморальний імунітет у експериментальних тварин при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату.	84
3.4	Цитокіновий профіль експериментальних тварин при дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату	87
3.5	Вплив наночастинок оксиду цинку на прооксидний та проапоптичний ефекти гербіциду гліфосату	90
3.6	Функціональний стан ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків у тварин при дії наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату	94
Розділ 4	Гістологічні зміни печінки, нирок та селезінки тварин за умов введення наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату	101
4.1	Мікроскопічні зміни печінки щурів за умов введення наночастинок оксиду цинку і гліфосату	101
4.2	Мікроскопічні зміни нирки щурів за умов введення наночастинок оксиду цинку та гліфосату	106
4.3	Мікроскопічні зміни селезінки щурів за умов введення наночастинок оксиду цинку і гліфосату	111
Розділ 5	Аналіз та узагальнення результатів дослідження	118
	Висновки	147
	Список використаних літературних джерел	151
	Додатки	183

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

ЗАА – загальна антиоксидна активність

ЕРОД – етоксирезорурфін О-деетилази

ІІ – інтерлейкін

КТ – каталаза

НМ – наноматеріали

НЧ – наночастинки

Нано-ZnO – наночастинки оксиду цинку

ЛФ – лужна фосфатаза

ОМБ – окисна модифікація протеїнів

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ТБК-активні продукти

ЦП – церулоплазмін

G-SH – відновлений глутатіон

АФО – активні форми кисню

Ig – імуноглобулін

ФНП- α – фактор некрозу пухлин- α

ЦК – циркулюючі імунні комплекси

iNOS – індукційна форма синтази оксиду нітрогену

NOx – нітрати/нітрити

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Нанотехнологія – це галузь науки й техніки, яка останні декілька десятиліть надзвичайно бурхливо розвивається. Наноматеріали, зокрема наночастинки, сьогодні настільки масштабно застосовуються більшістю країн світу у різних сферах промисловості, сільського господарства, побуту, біології і медицини, що вони стають потенційно небезпечними для екологічних систем і здоров'я людини [1, 2]. При попаданні в організм наночастинки можуть реалізовувати свої токсичні ефекти як на тканинному рівні, після їх захоплення клітинами, так і опосередковано, за рахунок їх впливу на видовий склад, чисельність і активність компонентів кишкового мікробіоценозу.

Одними з найперспективніших видів наноматеріалів є наноструктурні оксиди металів, зокрема, високодисперсні наночастинки оксиду цинку (ZnO). Орієнтовний загальний річний обсяг виробництва наночастинок ZnO у світі становить приблизно 33400 тонн [3, 4]. Це треті за частотою використання металеві наночастинки у різних промислових продуктах, включаючи гуму, фарбу, лакові покриття, бетон, текстиль, електронні вироби та ін. [5]. Особливо багатообіцяючим є потенціал застосування наночастинок ZnO в косметології і медицині.

Вже сьогодні, завдяки здатності поглинати ультрафіолет, наночастинки оксиду цинку широко використовуються в косметичних та сонцезахисних засобах, а завдяки антибактеріальним властивостям – в антисептичних та дезинфікуючих препаратах [6]. Враховуючи протипухлинний, антиоксидантний, протидіабетичний та протизапальний ефекти наночастинок ZnO, а також їх здатність щодо таргентної доставки ліків та біовізуалізації, можна передбачити їх інтенсивне застосування в різних сферах медицини [7–10].

Незважаючи на широке використання наночастинок ZnO, їх безпека для людини досі не з'ясована. З одного боку, Управлінням з харчових продуктів і медикаментів (FDA) у США ZnO віднесений до класу загалом безпечних речовин [11], з іншого – є ряд повідомлень про токсичність і побічні дії наночастинок ZnO [12–16].

Потенційно небезпечною може бути ситуація коли наночастинок попадають в організм разом з хімічними чи біологічними токсинами, важкими металами, пестицидами тощо. Завдяки своїм специфічним властивостям – нанорозмірам і надзвичайно високій питомій площі поверхні, наночастинок здатні адсорбувати велику кількість токсину і проходити через біологічні бар'єри організму, і, таким чином, слугуючи суперпровідником для токсину, збільшувати його системну концентрацію в тканинах і клітинах [17,18]. Це зумовлює актуальність вивчення токсикологічних властивостей наночастинок при їх надходженні в організм разом із традиційними контамінантами довкілля.

У світі одними з найпоширеніших забруднювачів довкілля є гербіциди [19], а найбільш широко використовуваним гербіцидом є гліфосат [N-(фосфометил)гліцин] [20], який на сьогодні у величезних кількостях застосовується в сільському господарстві, лісівництві, присадибних ділянках і міських поселеннях проти багаторічних і однорічних бур'янів [21].

Гліфосат відомий під торговою маркою «Раундап». У 2022 році у світі було продано Раундапу на суму більше 34 мільярдів доларів [22]. Хоча цей гербіцид вважається відносно безпечним, його неконтрольоване і обширне застосування може призвести до негативних наслідків для здоров'я людини [23]. Зокрема, було показано, що дія гліфосату пов'язана з проблемами шлунково-кишкового тракту [24], а також продемонстровано його кардіотоксичний ефект [25, 26]. Було також показано, що хронічний вплив гліфосату є гепато- і нефротоксичним [27,28]. В кількох дослідженнях було виявлено, що гліфосат може спричиняти оксидативний стрес і призводити до

пошкодження органів внаслідок посиленої продукції кисневих радикалів [29,30].

У декількох недавніх роботах було показано, що наночастинки оксидів металів здатні посилювати токсичність хімічних сполук різної природи (хлор- і фосфорорганічних пестицидів і інсектицидів, поліциклічних ароматичних гідрокарбонів, синтетичних піретроїдів тощо) [31-35], проте механізм такого синергічного ефекту токсичності залишається не до кінця зрозумілим. Зважаючи на екстенсивне використання як наночастинок оксиду цинку, так і гліфосату та на можливість їх одночасного поступлення в організм, необхідним і актуальним є вивчення патогенетичних процесів пошкодження тканин і органів при комбінованій дії даних чинників.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової міжкафедральної теми Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Експериментальне дослідження метаболічних порушень в організмі за дії екзогенних токсикантів та при різних патологічних станах» (№ держреєстрації 0120U104148). Дисертант є співвиконавцем даної наукової роботи.

Мета дослідження. Дослідити інтегральні ефекти токсичності наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату в експериментальних тварин.

Завдання дослідження:

1. Дослідити зміни показників крові, що відображають цитоліз гепатоцитів, синтетичну і екскреторну функції печінки при пероральному введенні тваринам наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату.

2. Оцінити характер і ступінь порушень показників інтенсивності окислювальних процесів при застосуванні наночастинок оксиду цинку і гліфосату.

3. Дослідити роль системи оксиду азоту у механізмах токсичності наночастинок оксиду цинку і гліфосату.

4. З'ясувати вплив наночастинок оксиду цинку на характер і ступінь порушень цитокінової та гуморальної ланки імунітету, викликаних застосуванням гербіциду гліфосату.

5. Вивчити синергічний ефект наночастинок оксиду цинку і гліфосату на інтенсивність апоптозу та некрозу і трансмембранний потенціал мітохондрій в лейкоцитах крові експериментальних тварин.

6. З'ясувати функціональний стан ферментних систем I та II фази детоксикації ксенобіотиків при введенні тваринам наночастинок оксиду цинку і гліфосату.

7. Вивчити характер морфологічних змін в печінці, нирках і селезінці експериментальних тварин при окремому і сумісному застосуванні наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату.

Об'єкт дослідження – механізми синергічних ефектів поєданого застосування наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату.

Предмет дослідження – індуковані наночастинками оксиду цинку і гербіциду гліфосату біохімічні, імунологічні та морфологічні зміни в організмі експериментальних тварин.

Методи дослідження: експериментальні (для моделювання патологічного процесу); біохімічні (для встановлення функціональних змін гепатоцитів, порушень систем прооксиданти-антиоксиданти, визначення функціонального стану ферментних систем I та II фази детоксикації ксенобіотиків); морфологічні (для аналізу структурних змін в печінці, нирках і селезінці експериментальних тварин); статистичні (для опрацювання отриманих результатів та встановлення достовірності змін).

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше на підставі комплексних досліджень розкриті токсикологічні механізми синергічних ефектів наночастинок оксиду цинку і гербіциду

гліфосату при їх спільному введенні експериментальним тваринам. Доведено, що наночастинки посилюють негативні ефекти хімічного токсиканта гліфосату на фундаментальні біохімічні процеси в організмі, що дозволяє оцінити інтегральний ризик для здоров'я при одночасному надходженні в організм наноматеріалів і хімічних токсикантів.

Вперше продемонстровано, що наночастинки оксиду цинку посилюють гепатотоксичний ефект гербіциду гліфосату, що може бути зумовлено потенціюванням здатності гліфосату викликати оксидативний стрес – стимулювати процеси ліпопероксидації і окисної модифікації білків, пригнічувати антиоксидантну систему.

Вперше показано, що наночастинки оксиду цинку посилюють негативний ефект гліфосату на систему синтезу оксиду азоту, що проявляється інтенсифікацією продукції NO порівняно з тваринами, яким вводили тільки гербіцид.

Вперше показано, що наночастинки оксиду цинку поглиблюють дисбаланс між про- і антизапальними цитокінами, викликаний гербіцидом гліфосатом.

Уперше продемонстровано, що наночастинки оксиду цинку посилюють здатність гліфосату підвищувати продукцію внутрішньоклітинних активних форм кисню, кількість клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, а також апоптично та некротично змінених нейтрофілів крові.

Уперше встановлено, що наночастинки оксиду цинку потенціюють негативний вплив хімічного токсиканта гліфосату на ендоплазматичну систему біотрансформації сторонніх речовин – показники активності ферментних систем I та II фази детоксикації ксенобіотиків.

Уперше показано, що введення експериментальним тваринам наночастинок оксиду цинку сумісно з гербіцидом гліфосатом призводить до

більш виражених структурних патологічних змін в тканинах печінки, нирок і селезінки порівняно з такими при дії тільки хімічного токсиканта.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених досліджень дозволяють зрозуміти механізми комбінованого токсичного впливу наночастинок оксидів металів і токсикантів хімічної природи, зокрема фосфорорганічних гербіцидів, на живі організми. Отримані токсикологічні характеристики сумісного застосування наночастинок оксиду цинку і гліфосату дадуть можливість попередити негативні ефекти попадання в організм наноматеріалів і гербіцидів та можуть стати базою для оцінки інтегрального ризику їх виробництва і поширення та для гігієнічного нормування наноформ оксиду цинку і фосфорорганічних гербіцидів в об'єктах навколишнього середовища.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у практику наукових досліджень і навчальний процес на кафедрах медичної біохімії, функціональної і лабораторної діагностики, патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедрах патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету МОЗ України, Івано-Франківського національного медичного університету МОЗ України, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проаналізовано дані наукової літератури, обґрунтовано актуальність дослідження, визначено мету і завдання, сформовано групи тварин для дослідження. Автор опанувала методики досліджень і виконала експерименти, здійснила статистичну обробку отриманих результатів та написала розділи дисертаційної роботи. Разом із науковим керівником здобувач узгодила основні наукові положення, аналіз і узагальнення отриманих результатів та сформулювала висновки. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, автору належать виконання

експериментальних досліджень, статистична обробка, узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку. У всіх наукових працях, що містять результати досліджень, використано фактичний матеріал, отриманий автором у процесі виконання роботи.

Експериментальну частину роботи виконано у Центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, яка акредитована на право проведення вимірювань, що знаходяться в сфері державного метрологічного нагляду (Свідоцтво про атестацію № 001/18 від 26 вересня 2018 р.). Гістологічні дослідження проведено на кафедрі гістології та ембріології, імуноферментні – у Міжкафедральній науково-дослідній лабораторії (Свідоцтво про атестацію № 132/17 від 29 грудня 2017 р.) Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Автор висловлює щире подяку співробітникам вказаних підрозділів за надану організаційну та методичну допомогу.

Апробація результатів дослідження. Матеріали дисертації оприлюднено на XII українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019), підсумковій LXIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2020), підсумковій LXIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2021), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 2021), пленумі Українського наукового товариства патофізіологів «Особливості науково-педагогічного процесу в період пандемії COVID-19» (Тернопіль, 2022), XXVII конгресі студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (Тернопіль, 2023), V науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 2023).

Публікації. Результати дисертаційного дослідження висвітлено у 13 наукових працях, серед яких 6 статей у фахових виданнях України, 7 публікацій у матеріалах наукових форумів.

Структура та об'єм дисертації. Дисертація викладена на 191 сторінках і містить анотацію, вступ, огляд літератури, розділ з описом матеріалів та методів дослідження, два розділи результатів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел із 290 найменуваннями та додатки. Робота ілюстрована 5 таблицями та 19 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 40 сторінках.

РОЗДІЛ 1

НАНОМАТЕРІАЛИ: СФЕРИ ЗАСТОСУВАННЯ, ТОКСИЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Наночастинки оксиду цинку: застосування в медицині і біології

Однією з найбільших тенденцій останніх років у науці і техніці є розвиток нанотехнологій. Наноматеріали, що характеризуються особливими фізико-хімічними властивостями, є потужною базою для розробки нових систем, структур, пристроїв і мають величезний потенціал для досліджень у різних галузях і дисциплінах [36, 37]. З розвитком наноматеріалів, особливого значення набувають наночастинки оксидів металів, які мають далекосяжні перспективи для багатьох галузей господарства, в тому числі для біомедичної галузі [36].

Наночастинки оксиду цинку на сьогодні є одними з найбільш популярних і важливих наночастинок оксидів металів, що використовуються в різних галузях народного господарства і медицині [38–41]. Вперше їх застосували в гумовій промисловості, оскільки вони забезпечують зносостійкість гумового композиту, покращують характеристики полімеру і його міцність, забезпечують антистаріння та інші функції [42, 43]. Завдяки сильній здатності поглинати УФ-промені, наночастинки ZnO все частіше використовуються в засобах особистої гігієни, косметичних та сонцезахисних засобах [44]. Наночастинки ZnO також мають виражену антибактеріальну і протимікробну дію, а тому використовуються в текстильній промисловості – тканини з доданими наночастинами демонструють антибактеріальні і дезодорантні функції, а також стійкість до ультрафіолету [45]. Наночастинки оксиду цинку також використовуються в

інших галузях промисловості, включаючи виробництво бетону, фотокаталіз, електротехнічну галузь тощо [42, 46].

Загальновідомо, що цинк є незамінним мікроелементом, широко присутній у всіх тканинах організму, включаючи мозок, м'язи, кістки, шкіру тощо. Як основний компонент різних ферментних систем, цинк бере участь у забезпеченні роботи метаболізму і відіграє вирішальну роль у синтезі білків і нуклеїнових кислот, гемопоезі і нейрогенезі [40–43].

Наночастинки оксиду цинку малого розміру можуть бути джерелом цинку для організму, який легко абсорбується в шлунково-кишковому тракті, тому вони іноді використовуються як харчова добавка. ZnO класифікується Управлінням з харчових продуктів і медикаментів (FDA) у США як «GRAS» (загалом визнана безпечною) речовина [47]. Завдяки таким властивостям наночастинки ZnO знаходять все більше застосування в біомедицині.

Наночастинки ZnO, як новий тип недорогих та малотоксичних наноматеріалів, враховуючи їх протипухлинний, антибактеріальний, антиоксидантний, протидіабетичний та протизапальний ефекти, а також потенціал щодо доставки ліків та біовізуалізації, викликають надзвичайну зацікавленість в плані їх застосування у різних біомедичних напрямках [48, 49, 50]. Наночастинки ZnO розміром менше 100 нм вважаються відносно біосумісними, що робить можливим їх застосування та стимулює проведення відповідних біомедичних досліджень.

Протипухлинна активність наночастинок ZnO. Рак, як правило, лікується хімотерапією, променевою терапією та хірургічним втручанням. Проте, всі ці методи мають багато серйозних побічних ефектів [51]. Наноматеріали з їх високою біосумісністю, легкою поверхневою функціоналізацією, здатністю доставляти лікарські засоби до тканин-мішеней, в тому числі і до малігнізованих тканин, відкривають перспективи для подолання цих побічних ефектів. Zn^{2+} є необхідним нутрієнтом для людини, а наноматеріали ZnO вважаються відносно безпечними *in vivo*.

Враховуючи ці переваги, наночастинки ZnO можуть розглядатися як біосумісні наноплатформи, які мають потенціал у використанні для лікування раку [52, 53].

Зокрема, доведена протипухлинна активність наночастинок ZnO завдяки їх здатності індукувати апоптоз ракових клітин. Відомо, що мітохондріальний електрон-транспортний ланцюг, який забезпечує внутрішньоклітинну генерацію активних форм кисню (АФО), може руйнуватися протираковими агентами, що потрапляють в клітину, в результаті чого утворюється величезна кількість АФО [54, 55]. Однак, надмірна концентрація АФО призводить до пошкодження мітохондрій і до дисбалансу активності певних білків, що в кінцевому результаті викликає апоптоз клітин [56]. Наночастинки ZnO проявляють певну цитотоксичність у ракових клітинах в основному внаслідок внутрішньоклітинного вивільнення розчинних іонів цинку, що призводить до індукції АФО та індукованої загибелі ракових клітин через сигнальні шляхи апоптозу.

У роботі [57] досліджувалися фармакологічні механізми впливу наночастинок ZnO на клітини HepG2 раку печінки людини. Наночастинки оксиду цинку проявили цитотоксичний та генотоксичний ефекти, які були пов'язані з викликанням АФО апоптозом клітин, опосередкованим мітохондріальним шляхом. Втрата потенціалу мітохондріальної мембран призводить до відкриття зовнішніх пор мембран, що, в свою чергу, може зумовлювати вивільнення деяких апоптотичних білків, включаючи цитохром c, у цитозоль і активацію каспаз. Крім того, наночастинки ZnO можуть активувати p38 та JNK та індукувати фосфорилування p53^{ser15}.

Дослідниками [58] було продемонстровано протипухлинну дію наночастинок ZnO у клітинах MCF-7 раку молочної залози. Цитотоксичність наночастинок, як і в попередньому випадку, була пов'язана з виникненням апоптозу. ZnO-індукований апоптоз реалізовувався як через зовнішні, так і через внутрішні апоптотичні шляхи, при цьому спостерігалось пригнічення

експресії деяких антиапоптотичних генів, зокрема Bcl-2, AKT1, and JERK/2, і гіперекспресія проапоптотичних генів – p21, p53, JNK і Вах. Здатність наночастинок ZnO індукувати селективний цитотоксичний ефект на проліферацію ракових клітин було також показано на культурах клітин раку міобластоми C2C12 адипоцитів [59]. Наночастишки ZnO інгібували проліферацію клітин C2C12 і викликали апоптоз через опосередкований АФО мітохондріальний внутрішній апоптотичний шлях, p53, співвідношення Вах/Bcl-2 та каспазу-3. Отже, результати свідчать про те, що наночастишки ZnO можуть вибірково індукувати апоптоз ракових клітин, що відкриває перспективу їх застосування для лікування злоякісних пухлин.

Іншим механізмом, за допомогою якого наночастишки можуть проявляти протиракові властивості, є стимуляція аутофаготичних процесів у клітинах. Аутофагія – це регульований катаболічний процес, який активується у відповідь на різні стресові фактори, такі як пошкодження органел, АФО, протиракові агенти, посилена агрегація білка тощо. Надмірне пошкодження клітин може призвести до клітинного самопоглинання та загибелі клітин шляхом аутофагії і призводить до апоптозу ракових клітин [60, 61]. Отже, аутофагія не тільки сприяє виживанню клітин, але також активує летальні механізми в ракових клітинах, тому розглядається як важлива подія в індукованій наночастишками цитотоксичності. Показано, що наночастишки ZnO призводять до концентраційно-залежної втрати життєздатності клітин SKOV3 раку яєчників [62].

Автори вивчали чи наночастишки ZnO можуть індукувати аутофагію за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням антитіл LC3 для виявлення експресії LC3-II/I. Візуалізація LC3 імунофлуоресценції показала, що в інкубованих з наночастишками ZnO клітинах SKOV3 спостерігається підвищена експресія LC3-I/II та p53, що призводить до індукування аутофагічної загибелі клітин.

Науковцями [63] оцінено антиракові властивості наночастинок ZnO різних розмірів за їх здатністю пригнічувати проліферацію фібросаркоми клітин HT1080. Результати досліджень показали, що в ракових клітинах під впливом наночастинок виникає аутофагія, яка пов'язана з внутрішньоклітинною генерацією АФО. Відносний рівень LC3 II був вищим у клітинах, експонованих до наночастинок ZnO, ніж у нативних клітинах, що також свідчить про посилені процеси аутофагії. Отже, відомо, що у цитотоксичності наночастинок ZnO відіграють роль АФО та аутофагія, проте механізми регуляції між аутофагією та АФО залишаються нез'ясованими.

У роботі [64] дослідили механізм аутофагії та зв'язок між аутофагією і утворенням АФО у клітинах епітелію легенів, оброблених наночастинок ZnO. Результати досліджень показали, що наночастинок ZnO можуть спричинити накопичення аутофагосом в клітинах A549 і ця індукція аутофагії позитивно корелює з розчиненням наночастинок в лізосомах, що призводить до виділення іонів цинку, які здатні пошкоджувати лізосоми, що, в свою чергу, призводить до порушення аутофагічного процесу. Порушення процесів аутофагії призводить до накопичення пошкоджених мітохондрій, які генерують надмірну кількість АФО, що спричиняє загибель клітин. Таке розкриття механізмів регулювання осі аутофагія-лізосоми-мітохондрії-АФО сприяє кращому розумінню токсичності наноматеріалів.

Доставка протипухлинних препаратів. Використання наночастинок для цілеспрямованої доставки фармакологічних препаратів відкриває цікаві можливості для більшої безпечності та ефективності лікування раку. Використання наночастинок забезпечує доставку ліків до конкретних ракових клітин, що дозволяє зменшити загальну кількість вживаних препаратів і, таким чином, мінімізувати небажані побічні ефекти [49, 65]. Порівняно з іншими наноматеріалами, перевагами наночастинок ZnO є їх відносно низька токсичність та здатність до біодеградації. Особливо великий інтерес наночастинок ZnO викликають в плані можливості доставки

антиракових засобів. Різні типи препаратів, такі як доксорубіцин, паклітаксел, куркумін, байкалін або фрагменти ДНК можуть бути завантажені на наночастинки ZnO, щоб досягти кращої розчинності, вищої ефективності і цілеспрямованої доставки в ракові клітини [66–69].

В роботі [70] методом спільного осадження були отримані наночастинки ZnO, модифіковані PEG 600 (ZnO/PEG NPs), на які в подальшому навантажували доксорубіцин (DOX) з утворенням наноконкомпозитів DOX-ZnO/PEG. DOX-ZnO/PEG наноконкомпозити не тільки посилювали внутрішньоклітинне накопичення DOX, але також викликали дозозалежне гальмування росту клітин HeLa раку шийки матки. Наноконкомплекси Dox-ZnO також вивчалися в роботі [71]. Було показано, що дані наноконкомплекси діють як ефективна система доставки доксорубіцину в клітини гепатокарциноми печінки SMMC-7721. Крім того, в поєднанні з ультрафіолетом наноконкомплекси Dox-ZnO посилюють загибель клітин завдяки фотокаталітичним властивостям та синергетично спровокованому апоптозу, залежному від каспази. Puvvada N. et al. розробили новий порожнистий наноносій на основі ZnO, кон'югований з фолієвою кислотою (ФК) і завантажений паклітакселом [66]. Такий комплекс показав здатність до біоаккумуляції та поглинання клітинами раку молочної залози MDAMB-231, які характеризуються надмірно експресованими фолієвими рецепторами. Завдяки ФК-опосередкованому ендоцитозу та внутрішньо-клітинному звільненню у кислих ендолізосомах, дані наноконкомплекси проявляли не тільки суттєво вищу цитотоксичність щодо клітин MDA-MB-231 *in vitro*, але також пригнічували ксенотрансплантатні пухлини MDA-MB-231 у мишей.

Таргетна функціоналізація наночастинок. Функціоналізація наночастинок забезпечує їх певні переваги, такі як специфічність, високе корисне навантаження, можливість кон'югації з лікарськими препаратами та регуляції кінетики вивільнення, селективна локалізація та обхід механізму стійкості до різних лікарських засобів [72]. З метою підвищення цільових

ефектів та вибіркості проти ракових клітин було розроблено багато методів функціоналізації наночастинок. Поверхнева модифікація наночастинок ZnO сприяє покращанню їх стабільності та селективності щодо конкретних ракових клітин. Центральна увага приділяється функціоналізації поверхні наночастинок ZnO за допомогою різних видів біологічних молекул (білків, пептидів, нуклеїнових кислот, фолієвої кислоти, гіалуронової кислоти тощо [73–76]. Зокрема, було показано, що наночастинки ZnO, модифіковані PEG, проявляють активність проти більшості клітинних ліній раку молочної залози, а основним механізмом, за допомогою якого PEG-ZnO вбиває ракові клітини, є генерування АФО і активація p53-залежного апоптозу [77]. Наноконізити гіалуронової кислоти з ZnO викликали морфологічні зміни та гальмували проліферацію клітин аденокарциноми підшлункової залози (PANC-1), яєчників (CaOV-3), товстої кишки (COLO205) і гострого промієлоцитарного лейкозу (HL-60) [74]. Отже, протипухлинна активність функціоналізованих наночастинок ZnO відкриває перспективи їх використання для лікування раку. Теоретичний аналіз та експериментальні дослідження доводять, що для функціоналізованих наночастинок ZnO характерними є менші побічні ефекти і більша селективність як щодо нормальних, так і ракових клітин.

Антибактеріальна активність ZnO. Наночастинкам ZnO притаманна властивість пригнічувати широкий спектр патогенних мікроорганізмів. Ця властивість, очевидно, в першу чергу зумовлена їх здатністю індукувати утворення АФО, таких як супероксидний аніон, гідроксильні радикали, пероксид водню [78]. Антибактеріальна здатність наночастинок ZnO може також бути зумовлена їх накопиченням у зовнішній мембрані або цитоплазмі бактерій з наступним вивільненням Zn^{2+} , що спричиняє бактеріальний розпад клітинної мембрани, пошкодження мембранних білків, геномну нестабільність, і, як наслідок, загибель бактерій [79–81]. В роботі [80] показано, що наночастинки ZnO при дії на кишкову паличку спричиняють

загибель бактерій внаслідок безпосереднього контакту з фосфоліпідним бішаром мембрани, що призводить до руйнування її цілісності. Додавання антиоксидантів, таких як маніт, вітамін Е чи глутатіон, може блокувати бактерицидну дію наночастинок ZnO, підтверджуючи гіпотезу, що генерація АФО відіграє важливу роль в їх антибактеріальних властивостях. Було продемонстровано, що наночастинок ZnO повністю пригнічують ріст кишкової палички у концентрації близько 3,4 мМ, а ріст *S. aureus* навіть у набагато менших концентраціях (≥ 1 мМ) [82], а також виявлено, що антибактеріальна активність наночастинок збільшується із зменшенням їх розміру [83]. За допомогою методу ICP-AES було показано, що кількість Zn^{2+} , що виділяється з наночастинок малих розмірів є набагато більшою, ніж така, що звільняється з великих наночастинок, що свідчить про те, що елюований з наночастинок Zn^{2+} також відіграє важливу роль у антибактеріальній дії.

Холера – серйозне захворювання, що викликається кишковою інфекцією – грамнегативним мікроорганізмом *V. cholera* [84, 85]. Sarwar S. детально дослідили дію наночастинок ZnO на два біотици холерного вібриону (класичний та El Tor) [86]. Наночастинок ефективніше перешкоджали росту біотипу El Tor (N16961) і механізм такого пригнічення був пов'язаний з посиленою продукцією АФО, які здатні пошкоджувати бактеріальні мембрани, збільшувати їх проникність та суттєво модифікувати їх морфологію. Автори також виявили, що наночастинок здатні знешкоджувати холерний токсин і такий ефект пов'язаний з їх здатністю взаємодіяти з білком токсину, що призводить до руйнування його вторинної структури і блокує його зв'язування з гангліозидним рецептором GM1 [87].

Хоча ZnO у формі наночастинок є перспективним антибактеріальним засобом завдяки своїй високій активності як проти грампозитивних, так і проти грамнегативних бактерій, точний антибактеріальний механізм наночастинок ZnO не до кінця встановлений. Тому його досконале вивчення

має важливе теоретичне і практичне значення. Перспективним вважається застосування наночастинок ZnO для надання антибактеріальних властивостей мазям, лосьйонам та засобам гігієни. Крім того, їх можна наносити на різні вироби, зокрема і медичного призначення, для запобігання прилипанню, поширенню та розмноженню бактерій.

Використання наночастинок ZnO для лікування діабету. Цукровий діабет – захворювання обміну речовин, викликане нездатністю організму виробляти інсулін або неефективним використанням виробленого інсуліну [88, 89]. Добре відомо, що цинк підтримує структурну цілісність інсуліну та відіграє важливу роль у його секреції клітинами підшлункової залози. Він також приймає участь у синтезі та зберіганні інсуліну [90]. Тому було розроблено та оцінено антидіабетичний потенціал наночастинок ZnO, як можливого засобу для доставки цинку до органів.

Було показано антидіабетичну ефективність екстракту червоного сандалового дерева у кон'югації з наночастинками ZnO. Антидіабетичну активність оцінювали за допомогою аналізу інгібування α -амілази та α -глюкозидази екстрактами підшлункової залози мишей [91]. Результати продемонстрували, що кон'югат ZnO-екстракт на 61,93 % інгібував глюкозидазу, в той час як наночастинки чи екстракт показали 21,48 % і 5,90 % ефективності відповідно.

Були також проведені дослідження для порівняння антидіабетичної активності наночастинок ZnO і ZnSO₄ і їх здатності викликати оксидативний стрес у діабетичних щурів. Було виявлено, що наночастинки ZnO у високих дозах (3 і 10 мг/кг) проявляли значно більший протидіабетичний ефект порівняно з ZnSO₄. Про це свідчило суттєве зменшення вмісту глюкози в крові та підвищення рівня інсуліну. Проте, у великих дозах наночастинки викликали серйозний окислювальний стрес, що проявлялося зміною антиоксидантної ферментативної активності еритроцитів, підвищеною

продукцією малонового діальдегіду і суттєвим зниженням загальної антиоксидантної здатності сироватки [88].

Результати проведених досліджень [92] показали, що наночастинки ZnO значно зменшували рівні в крові цукру та асиметричного диметиларгініну в діабетичних щурів. Вміст запальних маркерів інтерлейкіну-1 і CRP також помітно зменшувалися після застосування наночастинок ZnO, що супроводжувалося підвищенням рівня оксиду азоту і антиоксидантного ферменту PON-1 в сироватці крові.

Протизапальна активність наночастинок ZnO. Запалення є частиною складної біологічної реакції тканин організму на шкідливі стимули, такі як патогени, пошкоджені клітини або подразники [93]. В роботі [94] досліджено вплив ZnO-функціоналізованих текстильних волокон на оксидативний стрес при atopічному дерматиті *in vitro* та *in vivo*. Дослідження показало очевидне зменшення свербіжності та суб'єктивного покращання якості сну у пацієнтів з atopічним дерматитом, які носили тканини з ZnO. Це, можливо, було зумовлено антиоксидантною і сильною антибактеріальною здатністю текстилю з ZnO. Було досліджено також здатність різних за розміром наночастинок ZnO проникати через травмовану шкіру у мишей з моделлю atopічного дерматиту [95]. Експерименти чітко показали, що тільки нанорозмірний ZnO був здатний досягти глибоких шарів алергічної шкіри. Наночастинки ZnO проявили високі протизапальні властивості, що характеризувалося зменшенням рівнів прозапальних цитокінів (IL-10, IL-13, IFN- γ і Th2 цитокінів) у мишей з алергічним дерматитом. Ці результати показують, що наночастинки ZnO мають суттєвий вплив на зменшення запалення шкіри при atopічному дерматиті.

Протизапальна активність наночастинок ZnO не обмежується лікуванням тільки atopічного дерматиту, було показано їх високу ефективність при інших запальних захворюваннях. Зокрема, на LPS-стимульованих макрофагах RAW 264.7 було продемонстровано, що

наночастинки ZnO дозозалежно пригнічували продукцію NO і експресію білка iNOS, ЦОГ-2, IL-1 β , IL-6, і TNF- α [96]. Було виявлено, що наночастинки ZnO мають більш високий потенціал протизапальної дії (79%) у порівнянні з наночастинками срібла (69,1 %) [97].

Використання наночастинок ZnO для біовізуалізації. Наночастинки ZnO мають здатність до люмінесценції, що передбачає їх застосування в галузі біозображення [50, 52, 98].

Використовуючи простий золь-гель метод, були приготовані стабільні водні наночастинки ZnO@poly(MAA-co-PEGMEMA). Такі наночастинки показали високий квантовий вихід і стабільну широку фотолюмінесценцію. В клітинах гепатоми людини ZnO із середнім розміром 3 нм показали зелену флуоресценцію, тоді як ZnO з середнім розміром 4 нм – жовту. Варто зазначити, що ці наночастинки не проявляли будь-якої токсичності для клітин гепатоми людини, люмінесценція була стабільною протягом культивування клітин і клітини були живими через 45 хв експозиції. Отже, наночастинки ZnO@poly(MAA-co-PEGMEMA) можуть успішно використовуватися як флуоресцентні зонди для візуалізації клітин *in vitro* [99].

В роботі [100] сконструйовано ZnO-нанопласти для візуалізації культивованих клітин. Автори обробляли чутливу до ліків лінію лейкемії K562 ZnO-нанопластами і спостерігали жовто-помаранчеве випромінювання навколо або всередині клітин при УФ-опроміненні (365 нм). Наноструктури ZnO успішно прикріплялися до клітин або проникали у клітини, що припускає можливість використання ZnO-нанопластів як міток для біозображення.

Tang X. et al. [101] були виготовлені наночастинки ZnO за допомогою хімічного методу осадження, які випромінювали синій, зелений, жовтий і оранжевий кольори. Колір випромінювання змінювався шляхом регулювання рН розчинів для осадження. Для стабілізації наночастинок ZnO у воді автори

інкапсулювали ZnO із кремнеземом для формування наноструктур ZnO@silica. Отримані наночастинки демонстрували відмінну стабільність у воді, були успішно прикріплені до поверхні клітин NIH/3T3 і показали різні флуоресцентні кольори з різними довжинами хвиль випромінювання. Базуючись на специфічній здатності наночастинок ZnO до флуоресценції, їх можна успішно використовувати як перспективні матеріали для візуалізації клітин і дослідження різних патологій.

Таким чином, наночастинки ZnO мають багатообіцяючі перспективи біомедичного застосування в зв'язку з їх протипухлинною, антибактеріальною, протидіабетичною, протизапальною активністю, а також здатністю доставляти ліки до певних мішеней і біовізуалізаційними властивостями. Завдяки притаманній токсичності, наночастинки ZnO здатні пригнічувати ракові клітини і бактерії шляхом індукування внутрішньоклітинної генерації АФО та активації апоптозу, що робить їх потенційними кандидатами на протиракові та антибактеріальні засоби. Також добре відомо, що наночастинки ZnO сприяють біодоступності терапевтичних препаратів або біомолекул, функціонуючи як носії ліків. Більше того, завдяки здатності знижувати глюкозу крові та підвищувати рівень інсуліну, наночастинки ZnO показали багатообіцяючий потенціал у лікуванні діабету та запобіганні його ускладнень.

Наночастинки ZnO належать до відносно безпечних речовин. Однак, все ще потребують подальшого вивчення деякі критичні проблеми наночастинок ZnO, які включають наступне:

(1) відсутність порівняльного аналізу їх біологічних переваг порівняно з іншими наночастинками металів,

(2) недостатня вивченість токсичності наночастинок ZnO в біологічних системах,

(3) відсутність доказових рандомізованих досліджень, які б спеціально вивчали протипухлинну, антибактеріальну, протизапальну і протидіабетичну активності наночастинок ZnO.

Наступні дослідження, зосереджені на вищезазначених проблемах, могли б прояснити та обґрунтувати потенційне використання наночастинок ZnO в біомедичній діагностиці і терапевтичній сфері.

1.2 Токсичність наночастинок ZnO

Вважається, що токсичні властивості наночастинок ZnO викликані вивільненням з них іонів Zn^{+} [102]. В роботі [12] було показано, що наночастинок ZnO викликають гемоліз, зниження кількості тромбоцитів і зменшення концентрації гаптоглобіну в сироватці крові, а також деякі гістопатологічні ураження в печінці. У ягнят при додаванні в корм наночастинок ZnO (20 мг/кг маси тіла) протягом 25 днів достовірно знижувалася активність АлАТ і збільшувався рівень креатиніну в сироватці крові. Крім того, спостерігався набряк клітин, гепатоцитарний некроз та інтерстиціальні нефрити у цих тварин [103].

У мишей наночастинок ZnO (50 і 300 мг/кг маси тіла) проявляли токсичність щодо статевих клітин яєчок. Було показано, що наночастинок ZnO впливають на функції клітин Сертолі, що проявлялося вивільненням незрілих статевих клітин із сім'явиносної системи каналців, зменшенням розміру сім'яних каналців, ростом епітелію, порушенням дозрівання мультинуклеарних гігантських клітин [104].

У той час як додавання наночастинок ZnO у малих кількостях (50 мг/кг маси тіла) викликало мінімальну токсичність у мишей, у високих концентраціях (500 мг/кг маси тіла) наночастинок призводили до достовірного зменшення маси тіла, збільшення відносної ваги підшлункової залози, мозку та легенів, підвищення активності сироваткової АлАТ та

гіперекспресії генів, пов'язаних з метаболізмом Zn, таких як металотіонеїн 1 і 2, ZIP8, ZIP14, ZnT1, ZnT2 і ZnT4. Спостерігалось також суттєве накопичення Zn у підшлунковій залозі, тканинах печінки та кісток мишей, які отримували наночастинки ZnO [13]. Наночастинки ZnO (50 мг/мл) також знижували активність антиоксидантних ферментів та підвищували утворення маркера окисної деградації ДНК 8-OHdG у гомогенаті печінки мишей. Те ж саме дослідження показало, що наночастинки ZnO викликають загибель 50% сполучної клітин L929 мишей [105]. Наночастинки ZnO (100 мкг/мл) пригнічували репарацію ДНК внаслідок пригнічення білків fen-1 і pol B і дозозалежно зменшували життєздатність мишачих макрофагів. Такий ефект наночастинок ZnO на життєздатність макрофагів призводив до зупинки фази G0/G1 клітинного циклу і пригнічення утворення СОД, каталази та активних форм кисню. У мишей, яким вводили наночастинки ZnO (500 мг/кг маси тіла), виявляли серйозні порушення ДНК у клітинах периферійної крові та кісткового мозку. При гістологічному дослідженні виявлено, що наночастинки ZnO призводили до інтенсивного запалення і пошкодження печінки, легенів і нирок дорослих мишей, зменшення маси тіла та підвищення рівня смертності [106]. Крім того, наночастинки ZnO (10, 20 і 30 мкг/мл) проявляли цитотоксичність *in vitro* в статевих клітинах яєчників мишей шляхом посилення генерації АФО, значного підвищення експресії маркерів премейотичних статевих клітин і зниження мейотичних і постмейотичних маркерів [107]. У самців швейцарських мишей-альбіносів наночастинки ZnO (25 мг/кг маси тіла) продемонстрували слабку генотоксичність, яка проявлялася зниженням потенціалу мітохондріальних мембран ($\Delta\Psi_m$) і посиленням генерації АФО, що викликало апоптоз. У клітинах кісткового мозку наночастинки ZnO призводили до зниження $\Delta\Psi_m$, стимуляції оксидативного стресу, зупинка клітинного циклу G0/G1, аберації хромосом і формування мікроядер. У тканинах печінки наночастинки викликали пошкодження ДНК, індукували оксидативний стрес і одночасно

інгібували активність антиоксидантних ферментів [108]. Пероральний прийом наночастинок ZnO (536,8 мг/кг маси тіла) достовірно пригнічував середнє зростання маси тіла щурів-самців Sprague Dawley. Одночасно, як у самців, так і в самок щурів спостерігалися значні зміни в аналізах крові, пов'язані з анемією, і розвиток панкреатиту. Показано, що така токсична дія наночастинок в першу чергу була пов'язана з їх біоперсистенцією в організмі [109].

В роботі [110] продемонстровано, що наночастинки ZnO (3,0 мг/кг або 30 мг/кг маси тіла) швидко не всмоктуються з ШКТ щурів. В той же час при внутрішньовенному введенні (30 мг/кг маси тіла) їх концентрація в крові досягає максимуму протягом 5 хв і повертається до норми через 48 годин після ін'єкції. Введені наночастинки накопичуються переважно в печінці, нирках, легенях, селезінці і не виявляються в тимусі, мозку та яєчках. Внутрішньовенне введення наночастинок призводило до посиленого утворення мітотичних фігур в тканинах печінки, при цьому в легеневиx тканинах були знайдені багатовогнищеві гострі ураження з темною коричневою пігментацією.

У щурів Sprague Dawley пероральне введення наночастинок ZnO (500 мг/кг маси тіла) викликало патологічні зміни в підшлунковій залозі, в т.ч. апоптоз ацинарних клітин, гіперплазію протокових клітин, інфільтрацію перидуктальних лімфоїдних клітин, а також збільшення регенеративних ацинарних клітин, запалення і набряк слизової оболонки шлунка, підвищене слиновиділення і атрофію сітківки. Гематокрит, вміст альбуміну, середній клітинний обсяг, концентрація клітинного гемоглобіну, вміст загального білка були достовірно знижені, а кількість еритроцитів, навпаки, підвищена [111]. Крім того, наночастинки ZnO значно підвищували активність АлАТ і АсАТ у самців щурів Wistar, а у тканинах печінки щурів, яким вводили наночастинки, було виявлено більше клітин Купфера, застійні явища, запалення паренхіми, балонування та конденсацію хроматину, що свідчило

про апоптоз. У нирках наночастинки викликали проліферацію клітин і застій у клубочках та інтерстиціальне запалення тканин. Наночастинки також значно впливали на якість і кількість сперми у щурів [112]. Токсичний вплив наночастинок ZnO на нирки також був продемонстрований в іншому дослідженні, де вони достовірно зменшували масу тіла, нирковий індекс та активність каталази і СОД в корі нирок. Автори пов'язують нефротоксичність наночастинок з активацією окислювальних процесів у тканинах нирок тварин [113].

Показано також токсичний вплив наночастинок ZnO на центральну нервову систему. Інтраперитонеальне введення наночастинок значно підвищувало рівень малонового діальдегіду і знижувало активність каталази та супероксиддисмутази у мозку. Гістологічні дослідження показали, що наночастинки ZnO індукують помітні зміни головного мозку, включаючи набряк і сателітоз, а також спостерігалися зміни поведінки [114]. Це підтвердилося в іншому дослідженні, яке продемонструвало, що при тривалому (8 тижнів) інтраперитонеальному введенні молодим щурам Wistar наночастинок ZnO мало місце послаблення просторового навчання і зниження ємності пам'яті внаслідок змін синаптичної пластичності [115].

У роботі [116]. продемонстровано, що у щурів, які отримували наночастинки ZnO, спостерігалось зниження кількості живонароджених дитинчат і їх маси тіла, а також посилення резорбції плоду. Наночастинки ZnO дозозалежно збільшували запальну клітинну інфільтрацію жовтого тіла та фіброз яєчників. У тканинах матки після введення наночастинок ZnO спостерігалось руйнування епітеліальних тканин і ендометрія і гіперплазія залоз. Крім того, наночастинки зменшували концентрацію в сироватки репродуктивних гормонів – естрогену та прогестерону [117].

За допомогою ядерного магнітного резонансу було виявлено, що вдихання наночастинок ZnO щурами Sprague Dawley призводило до зниження в рідині бронхоальвеолярного лаважу концентрації ацетату,

аскорбату, форміату, гліцерофосфохоліну, гліцину, таурину і до збільшення вмісту ізолейцину та валіну. Зміни метаболічних ферментів також були виявлені в легеневих тканинах, що може бути наслідком порушень антиоксидантної системи, стабільності клітинних мембран і пошкодження ДНК [118].

1.3 Гербіцид гліфосат: загальна характеристика і токсичність

Гліфосат [N-(фосфометил)гліцин] є одним із найбільш широко використовуваних фосфорорганічних гербіцидів широкого спектру дії [119]. Це гербіцид, який екстенсивно використовується в сільському господарстві проти багаторічних і однорічних бур'янів, а також у лісівництві, присадибних ділянках і міських поселеннях [120]. Гліфосат є основним компонентом неселективних і післясходових гербіцидів, що застосовуються для захисту посівів від однорічних широколистих бур'янів, деревних рослин тощо [121]. Основна сполука була вперше продана у 1974 році під торговою назвою «Раундап» компанії Monsanto [122]. Світовий ринок гліфосату досягнув 34,10 мільярдів доларів у 2022 році [123].

Гліфосат – єдиний гербіцид, який діє на 5-енолпірувілшкімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) і пригнічує біосинтез ароматичних амінокислот у шкіматному шляху [124]. Інгібування EPSPS гліфосатом уповільнює синтез незамінних вторинних метаболітів і білків та пригнічує шляхи синтезу енергії в ґрунтових мікробах і рослинах [125]. Гліфосат змінює структуру ґрунту та мікробне різноманіття, зменшуючи кількість мікробів та підвищуючи популяцію фітопатогенних грибів [126]. Цей гербіцид вважається безпечнішим ніж інші, проте його надмірне використання призводить до негативних наслідків для навколишнього середовища та людей [127].

Широкий спектр дії гліфосату і поява трансгенних культур, стійких до його ефекту (бавовник, ріпак, кукурудза та соя) є основними причинами надмірного використання цього гербіциду [128]. Необізнаність щодо показань до застосування гліфосату призвела до його накопичення як у наземних рослинах, так і у водних екосистемах [129]. Оскільки гліфосат може поглинатися частинками ґрунту, він часто відкладається у вадозній зоні. Зазвичай гліфосат виявляють у поверхневих водах, на межі вода-седимент поверхневих стоків і в підземних водах [130].

Дослідження показують, що при пероральному введенні гліфосат швидко, але неповно (приблизно 20-30 % введеної дози) всмоктується [131, 132], причому абсорбція при пероральному прийомі нижча, якщо більша доза гліфосату призначається [133]. Поглинання гліфосату шкірою обмежене, лише приблизно від 1 до 3% цього гербіциду проходить через дермальний бар'єр [132].

Тільки 1% поглиненої дози гліфосату залишається в організмі через 7 днів, що свідчить про те, що він не накопичується в організмі. Найвищі концентрації гліфосату в були виявлені в тонкому кишечнику, печінці, нирках і кістках [133, 134]. Гліфосат погано метаболізується як в рослинах, так і в тваринах [135]. Виводиться назовні переважно незмінним і лише близько 1% піддається метаболізму шляхом гідролізу амінометилфосфонові кислоти, основного метаболіту гліфосату [136].

Близько 60-70% гліфосату з організму виводиться через кишечник [133], решта 20-30% – із сечею [132, 137], виведення через жовч і легені є залишковим. Період напіврозпаду гліфосату становить від 6 до 12 годин. Переважна більшість гліфосату і його метаболітів виводяться через 48 год, а через 7 діб практично весь гліфосат покидає організм [132, 134].

Зростання споживання гліфосату протягом багатьох років призвело до зростання занепокоєння щодо токсичності цього гербіциду та можливих наслідків для здоров'я людини. Тому в останні роки зросла кількість

досліджень щодо впливу гліфосату на здоров'я людини. На даний момент немає консенсусу серед наукової спільноти, існують суперечки щодо безпечності гліфосату та його наслідків для здоров'я. Європейська служба безпеки харчових продуктів провела перевірку ризику, пов'язаного з використанням гліфосату, і наступні токсикологічні кінцеві точки були визначені на основі лабораторних досліджень:

- Рівень без помітних побічних ефектів – 100 мг/кг маси тіла на день.
- Допустима добова доза – 0,5 мг/кг маси тіла на добу.
- Гостра референтна доза – 0,5 мг/кг маси тіла на добу.
- Прийнятний рівень експозиції оператора – 0,1 мг/кг маси тіла на день.

Гостра токсичність гліфосату

Мірою гострої токсичності речовини є показник LD_{50} . На європейському рівні EFSA в 2015 році визначила LD_{50} для гліфосату на рівні 2000 мг/кг маси тіла як для орального, так і для шкірного шляхів потрапляння в організм [134]. Продовольча та сільськогосподарська організація (FAO) і Світова організація охорони здоров'я (WHO) у спільному висновку визначили в 2016 році LD_{50} для гліфосату при орального шляху поступлення 5600 мг/кг маси тіла і при дермальному шляху – більше 2000 мг/кг маси тіла [132].

Оскільки гліфосат розпилюють на сільськогосподарських полях, іншим корисним показником є LC_{50} , що відповідає концентрації певної речовини в повітрі, яка за певний час викликає загибель 50 % досліджуваної популяції. EFSA визначила LC_{50} для гліфосату на рівні більше 5 мг/л повітря на період впливу 4 години [134], в той же час ФАО встановила LC_{50} на рівні більше 5,46 мг/л повітря для такого ж періоду експозиції [132]. Відповідно до класифікації гострої токсичності, яка використовується в США, гліфосат віднесено до IV категорії, тобто до практично нетоксичних речовин [133].

Випадки гострої токсичності у людей були виявлені після випадкового або навмисного проковтування гліфосату, що призводило до втрати ваги, шлунково-кишкових, легеневих, ниркових і печінкових розладів [138].

Хронічна токсичність гліфосату. Нейротоксичність.

Вплив пестицидів пов'язують із розвитком нейродегенеративних захворювань [139]. Фермент ацетилхолінестераза є чутливим біомаркером впливу фосфорорганічних і уретанових пестицидів [140]. Крім того, оцінка активності трансаміназ і лужної фосфатази у певних ділянках мозку також може відображати порушення нервової провідності під впливом токсинів [141].

В дослідженні [141] вагітним самкам щурів лінії Вістар перорально вводили 0,65 або 1,30 г/л гліфосату, починаючи з початку вагітності і до 21-го післяпологового дня. На 90 день після пологів активність лужної фосфатази головного мозку була підвищена, а активності ацетилхолінестерази та трансаміназ у смугастому тілі і гіпокампі знижені. Так само після введення щурам-самкам під час вагітності та лактації 3,6 г/л Раундапу спостерігалися глутаматна ексайтотоксичність та окислювальний стрес в гіпокампі [142]. Коли самцям щурів лінії Wistar вводили 75 мг/кг маси тіла гліфосату протягом 6 днів, вміст дофаміну, 5-гідрокситриптамін у норадреналіну у смугастому тілі, гіпоталамусі, гіпокампі та середньому мозку істотно знижувався. Такий ефект може призводити до нейротоксичності або порушення когнітивної поведінки [143]. Миші CF-1, які піддавалися впливу гліфосату (50 мг/кг маси тіла) протягом 4 тижнів продемонстрували порушення окисно-відновного балансу в мозку [144]. Є також дані, що у людей, які зазнавали впливу гліфосату, змінювалося поглинання глюкози нервовими клітинами, що призводило до пошкодження нерва [145].

Отже, вплив гліфосату призводить до дегенеративних змін головного мозку, що зазвичай пов'язано з оксидативним стресом. Однак, більшість

досліджень проведено на ссавцях і водних організмах. Потрібні майбутні дослідження на людях, щоб оцінити потенційний вплив гліфосату на тканини і клітини нервової системи.

Гепатотоксичність і нефротоксичність гліфосату.

Встановлено, що гліфосат може викликати пошкодження печінки та нирок внаслідок активації оксидативного стресу [146]. В роботі [147] дорослим щурам Wistar вводили 50 мг/кг маси тіла гліфосату через день протягом 15 днів. Спостерігали зростання активностей аланін-, аспаратамінотрансфераз і лужної фосфатази на фоні підвищення рівня малонового діальдегіду і перекису водню і значного зниження супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і вмісту відновленого глутатіону, небілкових тіолів і вітаміну С.

В дослідженні [148] вивчали гібридних поросят, яких годували 0, 20 або 40 мг/кг маси тіла гліфосату протягом 35 днів. У міру збільшення концентрації гліфосату спостерігали поступовий набряк гепатоцитів, застійні явища у печінці та місцевий некроз. Активність лужної фосфатази також лінійно зростала.

Відомим гербіцидом, що містить 360 г/л гліфосату, є Kalach 360 SL (KL). Коли самкам щурів Вістар вводили KL (216 або 315 мг/мл) протягом 60 днів, спостерігалось значне збільшення в плазмі крові рівнів креатиніну, сечовини та сечової кислоти і зниження кліренсу креатиніну. Спостерігався також тубулярний некроз, який викликав пошкодження дистальних каналців [149].

Гліфосат також спричиняє пошкодження печінки та нирок у риб. Зокрема, у золотих рибок, які піддавалися впливу 0,2 мМ гліфосату протягом 90 днів, спостерігався гіаліновий некроз в нирках, а також підвищення рівня креатиніну в сироватці крові та вмісту азоту в сечі. У печінці значно підвищувалися активності аланін- і аспаратамінотрансфераз, лактатдегідрогенази та вміст малонового діальдегіду, в той же час активність

супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази суттєво знижувалися [150]. Подібні результати були отримані при проведенні аналогічних досліджень із сомами та коропами [151,152].

Токсичний вплив гліфосату на репродуктивну систему.

В роботі [153] щурам-самцям лінії Sprague-Dawley вводили 5, 50 або 500 мг/кг гліфосату протягом 5 тижнів. У групі тварин, яким вводили найбільшу дозу гербіциду, спостерігали зниження кількості сперматозоїдів, а також ваги семінальних везикул і залоз. Застосування протягом 8 тижнів 375 мг/кг гліфосату знижувало мобільність сперматозоїдів, інтегральність їх мембран і активність супероксиддисмутази [154].

В той же час було показано, що введення щурам 2,5 або 15 мг/кг гліфосату протягом 2 тижнів не призводило до суттєвих змін в тестикулах щурів [155]. Вплив гліфосату на репродуктивні органи є дозо- і часозалежним. Тривале введення високих доз призводить до пошкодження репродуктивної системи.

В дослідженні [156] автори давали мишам лінії ICR гліфосат перорально з питною водою в концентрації 25 мг/л на початку вагітності. Через 19 днів кількість атрезованих фолікулів збільшувалася, тоді як число дозрілих фолікулів зменшувалося. У вагітних щурів лінії Вістар, експонованих до сублетальних доз раундапу (500 мг/кг) протягом 7 днів, спостерігали зменшення імплантаційного сайту і кількості жовтих тіл та зниження частоти імплантацій [157]. У гранульозних клітинах свиней гліфосат підвищував секрецію прогестерону і оксиду азоту. Отже, гліфосат справляє токсичний ефект на репродуктивну систему, що проявляється зниженням кількості сперматозоїдів, зменшенням ваги яйцеклітин, зниженням рівня тестостерону, пригніченням імплантаційних процесів тощо.

Канцерогенний ефект гліфосату.

Здатність гліфосату викликати онкологічні захворювання залишається суперечливою. Дослідження, проведені на швейцарських мишах-альбіносах,

показали, що добова доза гліфосату 1460 мг/кг маси тіла збільшувала частоту злоякісної лімфоми [158]. Однак, важко зробити висновок, що гліфосат може становити ризик розвитку раку, беручи до уваги надзвичайно складні причини лімфоми та рідкісні випадки перорального прийому гербіциду у дозі 1460 мг/кг маси тіла. У дев'яти дослідженнях на щурах не було виявлено істотного зв'язку між частотою виникнення пухлин і впливом гліфосату в жодній групі тварин. У результаті Європейське агентство з безпеки харчових продуктів припустило, що докази зв'язку впливу гліфосату на розвиток раку дуже обмежені. У ранніх [159] дослідженнях було показано, що ні гліфосат, ні Roundup не становили канцерогенного ризику для людини. Деякі науковці, які узагальнили всі релевантні епідеміологічні рецензовані роботи до 2012 року, дійшли висновку, що немає суттєвої кореляції між появою раку простати, раку молочної залози, колоректального раку, раку підшлункової залози, меланоми шкіри, лейкемії, гліоми та впливом гліфосату [160].

В роботі [161] було показано, що гліфосат може спричинити множинну мієлому. Однак, дослідження 27 суб'єктів, які зазнали впливу гліфосату, не виявили статистичної кореляції між його впливом та ризиком; множинна мієлома часто зустрічається з моноклональною гаммопатією [162]. Так само деякі дослідники нібито встановили зв'язок між впливом гліфосату і неходжкінською лімфомою, але після зміни статистичного методу зв'язок не підтвердився [163].

Підводячи підсумок, на сьогодні можна говорити лише про ризик канцерогенності високих доз або тривалого впливу гліфосату. На даний момент немає доказів того, що гліфосат є канцерогенним для тварин або людей. Вивчення канцерогенності гліфосату все ще знаходиться на початковій стадії, дослідження на тваринах обмежуються мишами та щурами, а дослідження на людях базуються на анкетах. З огляду на те, що рак часто асоціюється з пошкодженням ДНК, можна припустити, що

канцерогенність гліфосату може бути додатково оцінена з точки зору окисного стресу.

Молекулярні механізми токсичності гліфосату. Оксидативний стрес.

Оксидативний стрес викликається надмірним виробництвом внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФО) або недостатнім антиоксидантним захистом. Генерація АФО, індукована гліфосатом, відіграє вирішальну роль у його токсичності. Обробка лінії клітин проксимальних каналців нирок людини (НК-2) 20, 40 або 60 мкМ гліфосату протягом 24 годин збільшувало продукцію АФО і знижувало виживаність клітин залежно від дози [164].

В дослідженні *in vivo* вводили 0,0065, 0,065 або 0,28 г/л Раундапу протягом 7 або 14 днів. У самців відповідні гени були пригнічені на фоні оксидативного стресу та накопичення АФО. У самок, навпаки, ті самі гени були надмірно експресовані у відповідь на оксидативний стрес. Ці дані вказують на те, що гліфосат може впливати на розвиток оксидативного стресу по різному залежно від статі.

Надмірна продукція АФО, опосередкована гліфосатом, викликає пошкодження ліпідів, ДНК і білків і в подальшому може призвести до апоптозу і загибелі клітин. Інтенсивність процесів ліпопероксидації вимірюється шляхом моніторингу змін вмісту ТБК-активних продуктів і малонового діальдегіду. Показано, що щурі-самці лінії Wistar, які отримували гліфосат у дозі 0,1, 0,5, 1,75 або 10 мг/кг маси тіла протягом 28 днів, мали нижчий рівень ТБК-активних продуктів у печінці і в плазмі крові [165]. В той же час у роботі [157] було виявлено, що у вагітних щурів лінії Вістар, яким вводили 500 мг/кг маси тіла гліфосату протягом 7 днів, спостерігалися значно підвищені рівні ТБК-активних продуктів у сироватці крові і печінці. У риб юндіара (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) під впливом 1,357 мг/л гліфосату протягом 6–96 годин спостерігалось значне підвищення рівнів ТБК-активних продуктів у печінці та м'язах [166], тоді як у ембріонів

О. Мукісс під впливом гліфосату у сублетальній концентрації (0,1 або 1 мг/л, 3 тижні) рівні ТБК-активних продуктів значно зменшилися [167]. In vitro вміст малонового діальдегіду суттєво зростає в клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y, яких піддавали впливу 5 мМ гліфосату протягом 48 годин [168]. Так само концентрація ТБК-активних продуктів значно зростала у лімфоцитах людини [169]. Отже, можна зробити висновок, що активація процесів ліпопероксидації є поширеним наслідком опосередкованого гліфосатом оксидативного стресу, інтенсивність якого залежить від дози та/або часу експозиції.

Пошкодження ДНК.

Оксидативний стрес, пов'язаний з токсичністю гліфосату, може викликати пошкодження ДНК [170]. У щурів-самців лінії Wistar, які отримували 0,1, 0,5, 1,75 або 10 мг/кг маси тіла Раундапу протягом 28 днів, було виявлено значне пошкодження ДНК гепатоцитів і лейкоцитів [165]. Використання “alkaline comet test” показало, що після експозиції креветок до 0,35, 0,70, 1,40, 2,80 або 5,60 мг/л гліфосату протягом 96 годин спостерігається пошкодження ДНК, яке залежало від часу та дози [171]. In vitro, в ооцитах мишей, оброблених 500 мкМ гліфосату протягом 14 годин, виявлено аномальну морфологію клітинного веретена та дволанцюгові розриви ДНК [172]. В іншому дослідженні у клітинах A549, які піддавали впливу 50, 75, 100 або 125 мг/мл Раундапу протягом 2 год, спостерігалася міграція ДНК. Крім того, кількість комет-позитивних клітин значно збільшувалася залежно від дози [173]. Отже, пошкодження ДНК залежить від дози гліфосату і може відбуватися при сублетальних концентраціях.

Пошкодження білків.

Біомаркером пошкодження білків може бути протеїнові карбонільні групи [174]. Подібні результати отримано в роботі [175]. – риби, які піддавалися впливу 0, 0,37, 0,75, 2,25, 4,5 або 7,5 мг/л гліфосату протягом 96 год мали підвищений рівень протеїнових карбонільних груп у печінці. На

сьогодні вивчення пошкоджень протеїнів під впливом гліфосату проводилися, в основному, на водних видах організмів, тому необхідні додаткові дослідження неводних видів.

Зміни в антиоксидантному статусі

Мишам вводили 250 або 500 мг/кг маси тіла гліфосату протягом 6 і 12 тижнів. Активність супероксиддисмутази була значно знижена в обох групах [176]. Коли щурам перорально вводили через зонд 0, 5, 50 або 500 мг/кг маси тіла гліфосату протягом 35 днів вміст відновленого глутатіону, активність глутатіонпероксидази і супероксиддисмутази знижувалися, а вміст малонового діальдегіду в тонкій кишці збільшувався [177]. У поросят, яких годували 0, 10, 20 або 40 мг/кг гліфосату протягом 35 днів знижувалася активність каталази і супероксиддисмутази у дванадцятипалій кишці [178]. У печінці загальна антиоксидантна здатність і активність каталази зменшувалася, а активність супероксиддисмутази зростала при всіх концентраціях. Креветки, експоновані до 0,0065, 0,065 або 0,28 мг/л Раундапу протягом 7 або 14 днів, мали зміни експресії антиоксидантних генів, таких як *sod1*, *cat*, *gsh* і *gpx* [179].

У досліджах *in vitro* у клітинах гранульози, оброблених 4,0 мг/мл гліфосату протягом 72 годин, спостерігалось значне зниження активності супероксиддисмутази, каталази і глутатіонтрансферази і посилення процесів ліпопероксидації. Коли людські гепатоцити L-02 обробляли Раундапом у дозах 0, 60, 90, 120, 150 або 180 мг/л протягом 24 годин, рівень відновленого глутатіону і активність супероксиддисмутази знижувалися, а вміст малонового діальдегіду підвищувався [180].

Отже, гліфосат спричиняє порушення функціонування антиоксидантних ферментів у різних біологічних системах.

Аутофагія та апоптоз.

В останні роки з'являється все більше повідомлень про роль опосередкованого гліфосатом оксидативного стресу в індукції апоптозу та

аутофагії. Легкий ланцюг 3 протеїну 1 (LC3), асоційованого з мікротрубочками, p62 і беклін-1 можуть контролювати утворення автолізосом і аутофагосом [181]. Мішень рапаміцину у ссавців (mTOR) є важливим регулятором аутофагії [182]. Раундап (0, 50, 75, 100 або 125 мкг/мл) трансформував LC3-II, знижував регуляція p62 і підвищував регуляцію бекліну-2. Ці зміни призводили до аутофагії через передачу сигналів AMPK/mTOR у клітинах A549 [183]. Інкубація клітин астрогліоми щура з гліфосатом (0–160 мкМ) протягом 24 годин збільшувала продукцію білків, пов'язаних з аутофагією, і індукувала аутофагію [184].

Коли мононуклеарні клітини периферичної крові людини обробляли гліфосатом (0,01–5 мМ) протягом 4 годин, гербіцид індукував зовнішні та внутрішні сигнальні шляхи апоптозу через активацію каспази-8, каспази-9 та каспази-3 [185].

Інгібування мітохондріального транспортного ланцюга передачі електронів.

Електрони, що виробляються мітохондріями, можуть безпосередньо відновлювати кисень, тим самим генеруючи АФО у мітохондріях [186]. Гліфосат інгібував активність комплексу III ланцюга транспортування електронів мітохондрій, що переносить електрони від семіхінону до O_2 [187]. У дослідженні [188] було виявлено, що мітохондріальна активність під впливом гліфосату пригнічувалася, зокрема, знижувалася активність комплексу II дихального ланцюга, а концентрація H_2O_2 збільшувалася. Інгібування ланцюга транспортування електронів знижує рівень АТФ. Загалом гліфосат може викликати нейротоксичність шляхом інгібування комплексу II, зниження рівня АТФ і збільшення продукції H_2O_2 .

Результати розділу опубліковані у науковій праці автора [189].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ТА ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика експериментального дослідження

Експериментальну частину роботи виконано на базі Центральної науководослідної лабораторії Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, яка акредитована на право проведення вимірювань, що знаходяться в сфері державного метрологічного нагляду (Свідоцтво про атестацію № 001/18 від 26 вересня 2018 р.). Гістологічні дослідження проведено на кафедрі гістології та ембріології, імуноферментні – на базі Міжкафедральної науково-клінічної лабораторії (Свідоцтво про атестацію № 132/17 від 29 грудня 2017 р.) Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

Експериментальні дослідження проведені на безпородних щурах–самцях масою тіла 160-180 г. В процесі роботи використано 128 тварин. Усі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили із дотриманням правил, передбачених Європейською комісією по нагляду за проведенням лабораторних та інших дослідів з участю експериментальних тварин різних видів [190], згідно з «Науково-практичними рекомендаціями із утримання лабораторних тварин та роботи з ними» [191]. Комісією з питань біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України (протокол № 73 від 3.04.2023 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Всі піддослідні тварини були поділені на такі групи:

I – інтактні (контрольні) щури, яким щоденно внутрішньошлунково впродовж 14-и діб вводили фізіологічний розчин (0,5 мл/кг);

II – щурі, яким щоденно внутрішньошлунково впродовж 14-и діб вводили 0,5 мл суспензії наночастинок оксиду цинку у фізрозчині в дозі 100 мг/кг маси тіла [192];

III – щурі, яким щоденно внутрішньошлунково впродовж 14-и діб вводили 0,5 мл розчину гербіциду Раундапу з розрахунку дози гліфосату 250 мг/кг маси тіла [193];

IV – щурі, яким щоденно внутрішньошлунково впродовж 14-и діб вводили 0,5 мл суспензії наночастинок оксиду цинку у розчині Раундапу (доза наночастинок і гліфосату були такими ж, як у групах II і III).

Евтаназію щурів здійснювали шляхом кровопускання під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг маси тварини) на 15-у добу від початку експерименту.

Для біохімічних та імуноферментних досліджень використовували сироватку крові і гомогенат печінки, для морфологічних досліджень – тканини печінки, нирок і селезінки.

В експерименті застосовували нанопорошок оксиду цинку (ZnO, 99+%, 20-30 nm) виробництва “US Research Nanomaterials, Inc.” (США) і Раундап (Монсанто) з вмістом гліфосату 450 г/л.

Диспергування наночастинок у фізіологічному розчині чи розчині Раундапу проводили за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-М750Т (20-25 кГц, 750 Вт) протягом 5 хв.

2.2 Дослідження показників функціонального стану печінки

Визначення активності *аланін- і аспаратамінотрансфераз, лужної фосфатази, концентрації сечовини, креатиніну, загального білка та загального білірубіну* сироватки крові проводили на напівавтоматичному аналізаторі «HUMALYZER 2000» з використанням тест-систем «Human», Німеччина.

2.3 Методи дослідження інтенсивності оксидативного стресу

Визначення *вмісту ТБК-активних продуктів*. Принцип методу полягає у здатності вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів, а саме малонового діальдегіду, при взаємодії з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) при високій температурі в кислому середовищі утворювати забарвлений комплекс червоного кольору з максимумом поглинання при 535 нм, інтенсивність якого прямо пропорційна вмісту ТБК-активних продуктів [194].

Дослідження проводили у 10% гомогенаті печінки та сироватці крові. У пробірки вносили гомогенат печінки або сироватку крові, 30 % розчин трихлороцтової кислоти, 5М НСl, 0,8 % водний розчин тіобарбітурової кислоти і кип'ятили на водяній бані. Після охолодження осад відділяли центрифугуванням. Вимірювали оптичну густину супернатанту на спектрофотометрі "Lambda 25" при довжині хвилі 535 нм.

Розрахунок проводили, враховуючи коефіцієнт молярної екстинції для ТБК-активних продуктів, який дорівнює $1,56 \times 10^5$ моль⁻¹см⁻¹. Кількість активних продуктів тіобарбітурової кислоти виражали у мкмоль/л сироватки крові або мкмоль/кг тканини печінки.

Визначення ступеня окисної модифікації білків сироватки крові. Принцип методу полягає у взаємодії альдегідних і кетонних груп, що утворюються у процесі окисної модифікації білків (ОМБ) сироватки крові, з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетонпохідні нейтрального характеру реєструють при 370 нм (ОМБ₃₇₀), а основного – при 430 нм (ОМБ₄₃₀) [195].

У пробірки вносили 0,85 % розчин NaCl, сироватку крові, 0,1 моль/л розчин 2,4-динітрофенілгідразину в 2М НСl і 10 % трихлороцтову кислоту

(ТХО). У контрольні проби замість 2,4-динітрофенілгідразину додавали 2М НСІ. Проби інкубували 1 год і центрифугували, осад промивали тричі 5 % розчином ТХО. До отриманого осаду додавали 8 моль/л розчин сечовини і кип'ятили. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували на спектрофотометрі "Lambda 25" при 370 і 430 нм проти контролю. Паралельно проводили визначення в сироватці крові білка біуретовим методом.

Вміст фенілгідразонів розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Визначення активності супероксиддисмутази. Активність супероксиддисмутази визначали за її здатністю інгібувати відновлення нітротетразолію синього [196].

Дослідження проводили в 10 % гомогенаті тканини печінки, приготовленого на фосфатному буфері, який обробляли хлороформ-спиртовою сумішшю і фосфатом калію з наступним центрифугуванням. Супернатант виділяли і до нього додавали 0,1 моль/л фосфатний буфер (рН=8,3), розчин нітротетразолію синього, розчин феназинметасульфату і 0,2 ммоль/л розчин НАДН₂. Проби витримували в темноті й фотометрували на спектрофотометрі "Lambda 25" проти проб без НАДН₂. Контролем служили проби, в яких замість гомогенату додавали фосфатний буфер. Відсоток інгібування відновлення нітротетразолію синього розраховували за формулою:

$$T = (E_k - E_d) \cdot 100 / E_k, \quad (2.1)$$

де T – відсоток інгібування;

E_k – екстинкція контрольної проби;

E_d – екстинкція дослідної проби.

Активність ферменту розраховували за формулою:

$$A_{\text{сод}} = T / (100 \% - T), \quad (2.2)$$

де $A_{\text{сод}}$ – активність супероксиддисмутази;

T – відсоток інгібування.

Отриманий результат перераховували на 1 г тканини печінки і виражали активність ферменту в ум.од./г тканини.

Визначення активності каталази. Принцип методу базується на здатності перекису водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс, інтенсивність якого обернено пропорційна активності каталази у досліджуваному субстраті [197].

Досліджували сироватку крові і тканину печінки, з якої на холоді готували 10 % гомогенат на 0,05 моль/л тріс-буфері. Реакцію починали додаванням сироватки або гомогенату до 0,03 % розчину перексиду водню. Паралельно готували холосту пробу, в яку замість досліджуваного матеріалу вносили дистильовану воду. Інкубували 10 хв і зупиняли реакцію додаванням 4 % молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі “Lambda 25” при 410 нм проти контрольної проби, в яку замість перексиду водню додавали воду.

Активність каталази виражали в мкат/л і розраховували за формулою:

$$A = (E_x - E_d) \times V \times t \times K, \quad (2.3)$$

де A – активність каталази;

E_x і E_d – екстинкції холостої і дослідної проб;

V – об’єм проби, що вноситься;

t – час інкубації (с);

K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перексиду водню, який дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Визначення вмісту відновленого глутатіону (SH-груп). Принцип методу полягає у взаємодії 5,5’-дитіобіс (2-нітробензойної) кислоти (реактив Елмана) з SH-групами досліджуваного субстрату [198]. При цьому утворюється тіонітрофенильний аніон, кількість якого прямо пропорційна вмісту SH-груп.

До крові (1:10) додавали H_2O_2 і 25 % сульфосаліцилову кислоту. Центрифугували, потім до центрифугату додавали 0,2 М тріс-буфер (рН = 8,4) і 0,04 % розчин реактиву Елмана. В контрольну пробірку замість досліджуваного матеріалу вносили воду. Через 10 хв проби фотометрували на спектрофотометрі “Lambda 25” при 412 нм проти контролю.

Концентрацію відновленого глутатіону розраховували, виходячи з коефіцієнта молярної екстинкції для тіонітрофенильного аніону, який дорівнює $11400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Вміст відновленого глутатіону виражали в мілімолях на літр крові.

Визначення концентрації церулоплазміну в плазмі крові. Визначення церулоплазміну базується його оксидазних властивостях. Церулоплазмін каталізує окиснення п-фенілендіаміндігідрохлориду з утворенням речовини фіолетово-синього кольору, при цьому ступінь окислення прямо пропорційний концентрації ферменту [199].

Для дослідження використовували сироватку крові без слідів гемолізу. В пробірки вносили сироватку (в контрольну пробірку вносили 0,5 % розчин гідроксиламіну солянокислого з метою інактивації ферменту) та додавали 0,4 М розчин ацетатного буферу (рН = 5,5) і по п-фенілендіаміндігідрохлорид. Після інкубації при 37°C 1 год протягом у пробірку (крім контролю) додавали гідроксиламін солянокислий. Проби витримували 30 хв при 4°C і потім визначали їх оптичну щільність проти контролю на спектрофотометрі “Lambda 25” при 530 нм. Розрахунок проводили за формулою:

$$C = E \times 87,5, \quad (2.4)$$

де С – кількість церулоплазміну, мг/%;

Е – екстинкція проби.

Визначення загальної антиоксидантної активності сироватки крові. Принцип методу полягає у здатності сироватки крові гальмувати реакції ліпопероксидації в гомогенаті мозку щурів [200].

Очищену від крові тканину мозку гомогенізували в 40 мМ льодяному фосфатно-соляному буфері, рН=7,4. Гомогенат центрифугували і супернатант розбавляли трьома об'ємами фосфатно-соляного буферу. В пробірки вносили розведений гомогенат, досліджувану сироватку або буферний розчин (контроль). Проби інкубували при 37 °С протягом 1 год. Відбирали по 4 мл зразка, додавали 28 % трихлороцтову кислоту і центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Відбирали супернатант, додавали 1 % ТБК і кип'ятили 15 хв. Проби фотометрували на спектрофотометрі “Lambda 25” при 532 нм. Паралельно визначали вміст продуктів перекисного окислення у пробах без інкубації (0 час). Загальну антиоксидантну активність сироватки виражали в % і визначали за формулою:

$$\text{АОА} = (1 - (E_{\text{досл.}} - E_0) / (E_{\text{контр.}} - E_0 \text{ контр.})) \times 100, \quad (2.5)$$

де $E_{\text{досл.}}$ і $E_{\text{контр.}}$ – екстинкції інкубованих дослідної і контрольної проб;

E_0 і $E_0 \text{ контр.}$ – екстинкції дослідної і контрольної проб, які не інкубувалися.

2.4 Методи дослідження стану системи оксиду азоту

Визначення сумарної активності NO-синтази. Сумарну активність NO-синтази у тканині печінки визначали за кількістю утворених нітратів і нітритів в інкубаційному середовищі, що містило компоненти комплексу синтази оксиду азоту [201].

Інкубаційне середовище містило 40 мМ тріс НСІ буфер, рН 7.9, гомогенат печінки (1 мг білка/мл), 4 мМ ФАД, 4 мМ Н₄біоптерин, 3 мМ дітіотреїтол і 1 мМ L-аргінін. Реакцію ініціювали додаванням 2 мМ НАДФН і середовище інкубували протягом 3 год при 37 °С. Кількість утворених нітратів і нітритів визначали як описано нижче.

Визначення загального вмісту нітратів і нітритів. Визначення проводили за методом Грісса після відновлення нітратів до нітритів за допомогою кадмію [202].

До сироватки або інкубаційної суміші (для визначення сумарної активності NO синтази) додавали 50 мМ карбонатний буфер (рН=9,0) і гранули кадмію. Пробірки інкубували при кімнатній температурі протягом 1 год. Потім додавали 0,35 М NaOH і 120 мМ сульфат цинку, залишали на 10 хв для депротоїнізації і осад відцентрифугували протягом 15 хв при 9000 об/хв. Надосадову рідину змішували з реактивом Гріса (1 % сульфаніламід, приготовлений на 3 М HCl і 0,1 % N-нафтилетилендіаміні) і інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Екстинкцію визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі “Lambda 25” при довжині хвилі 546 нм. Розрахунки проводили за калібрувальним графіком, використовуючи як стандарт нітрит натрію.

2.5 Дослідження гуморальної ланки імунної системи

Визначення вмісту імуноглобулінів класів A, M і G у сироватці крові. Вміст імуноглобулінів сироватки крові вивчали методом імуноферментного аналізу з використанням наборів реагентів «eBioscience, Inc» (США) згідно з інструкціями фірми-виробника на аналізаторі STAT-FAX. Кількість імуноглобулінів виражали у г/л.

Визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові (ЦІК). Кількість циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові визначали преципітацією їх розчином поліетиленгліколю-6000 за методом [167].

До 0,3 мл сироватки додавали 0,6 мл 0,1 М боратного буферу (рН = 8,4). Суміш розливали в 2 пробірки по 0,3 мл і додавали до 1-ї пробірки 2,7 мл боратного буферу, а до 2-ї – 2,7 мл розчину поліетиленгліколю-6000 (10 г

ПЕГ в 240 мл боратного буферу). Пробі інкубували 60 хв за кімнатної температури і фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при 450 нм. Розрахунок кількості ЦІК проводили за формулою: ум.од. = $(E_d - E_k) \times 1000$, де E_d – екстинкція вмісту 2-ої пробірки, E_k – екстинкція вмісту 1-ої пробірки.

2.6 Дослідження цитокінового профілю сироватки крові

Цитокіновий статус оцінювали за вмістом TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4 та IL-10. Концентрацію цитокінів вивчали методом твердофазового імуноферментного аналізу з використанням наборів реагентів «Bioscience» виробництва «Bender MedSystems GmbH», Австрія, згідно з інструкціями фірми-виробника на аналізаторі «StatFax 303 Plus».

Концентрацію TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4 та IL-10 виражали у пг/мл.

2.7 Методи дослідження функціональної та метаболічної активності нейтрофільних лейкоцитів крові

Виділення популяції нейтрофілів з крові. 4-5 мл крові забирали в стерильні пробірки з 3% розчином ЕДТА (співвідношення 1 частина ЕДТА і 20 частин крові). З метою осадження еритроцитів й отримання лейкоцитарної суспензії в пробірку додавали 10 % розчин желатину в співвідношенні 10:1 та відстоювали 30 хв при температурі 37 °С. Виділену лейкоцитарну завись одноразово відмивали 0,85% розчином хлориду натрію, центрифугуючи 10 хв при 1500 об/хв. Популяцію нейтрофілів отримували за допомогою центрифугування лейкоцитарної зависі на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв центрифугування при температурі 4°С і швидкості 1500 об/хв утворювалися дві інтерфази. Відбирали нижню інтерфазу, яка на 98-99 % була популяцією нейтрофілів [203].

Відсоток життєздатних клітин оцінювали у камері Горяєва за реакцією з трипановим синім, при цьому життєздатними вважали абсолютно незабарвлені клітини. Пошкоджені клітини забарвлюються вітальним барвником і мають темно-синій колір і неправильну форму. Працювали з клітинними суспензіями, ступінь забарвленості клітин в яких не перевищував 25 %.

Оцінка продукції активних форм кисню нейтрофільних гранулоцитів.

Рівень активних форм кисню у нейтрофілах крові визначали за допомогою барвника із заблокованою флюоресценцією – дигідродихлорфлюоресцеїну діацетату (ДХФ-ДА) («Sigma Aldrich», USA) методом проточної лазерної цитофлуориметрії [204, 205]. ДХФ-ДА – це неполярна сполука, яка пасивно проникаючи в клітину, гідролізується естеразами (відщеплюються ацетатні групи) і перетворюється в полярну сполуку, нездатну дифундувати назад з клітини, – 2,7-дигідродихлорфлюоресцеїн. В присутності внутрішньоклітинних активних форм кисню, головним чином після реакції з пероксидом водню, який утворюється під час респіраторного «вибуху», 2,7-дигідродихлорфлюоресцеїн окиснюється до 2,7 –дихлорфлюоресцеїну, який є флуоресціюючою сполукою в ділянці зеленого спектру, що дозволяє аналізувати клітини за інтенсивністю свічення барвника за допомогою проточної цитометрії.

До клітинної суспензії (2×10^6 клітин в 1 мл) додавали розчин ДХФ-ДА, інкубували 20 хв при температурі 37°C. В пробу вносили 0,2 % розчин ЕДТА та інкубували 30 хв при температурі 37°C, потім центрифугували 1 хв при 1500 об. і видаляли супернатант. Реакцію зупиняли 200 мкл лізуючого розчину (0,826 г NH_4Cl , 0,1 г NaHCO_3 , 3,7 мг ЕДТА-Na на 100 мл дистильованої води), після чого клітини однократно відмивали і ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері (рН =7,4). Аналіз зразків клітин проводився на проточному цитометрі Epics XL (“Beckman Coulter”, США) з допомогою гістограм та відповідних їм вікон статистики, що містили

показники середньої геометричної інтенсивності світіння мічених клітин. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках.

Оцінка зміни мітохондріального трансмембранного потенціалу нейтрофілів. Рівень мембранного потенціалу мітохондрій визначали методом проточної цитофлуориметрії [206] з допомогою набору реактивів «MitoScreen» («BD Pharmingen», США), ключовим реагентом якого є флюорохром 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3' тетраетилбензимидазоліл карбоціаніну йодид (JC-1). Відомо, що флюорохром JC-1 існує в двох різних станах – агрегатному і мономерному. JC-1 – мономер швидко проникає через мітохондріальну мембрану живої клітини, в результаті чого всередині мітохондрії формуються JC-1-агрегати, що характеризуються червоним спектром світіння ($\lambda=590$ нм), що може бути виміряно на FL-2 каналі проточного цитометра. При деполяризації мітохондріальної мембрани JC-1 не накопичується всередині мітохондрії, і знаходиться в цитоплазмі у вигляді мономерної форми, яка характеризується зеленим спектром світіння ($\lambda=525$ нм), що вимірюється на FL-1 каналі.

В чисту пробірку переносили суспензію нейтрофілів, що містила 1×10^6 клітин, і центрифугували при 400 g 5 хв при кімнатній температурі. До клітинного осаду додавали свіжоприготований (згідно інструкції виробника) розчин JC-1. Клітини ресуспендували та інкубували 10-15 хв при 37°C і двічі відмивали буфером. Отримані зразки аналізували на проточному цитометрі Epics XL («Beckman Coulter», США), визначаючи процентний вміст нейтрофілів з нормальним значенням $\Delta\psi$, що характеризуються як FL-2 так і FL-1-світінням і процент клітин із зниженим значенням $\Delta\psi$, що характеризуються зеленим спектром світіння ($\lambda=525$ нм), що вимірюється на FL-1 каналі.

Результати виражали у відсотках (співвідношення числа нейтрофілів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом і загальної кількості клітин).

Оцінка інтенсивності апоптозу і некрозу нейтрофілів. Оцінку апоптозу нейтрофілів крові проводили за допомогою методу проточної лазерної цитофлуориметрії [207] з використанням FITC-міченого анексину V з набору реагентів «ANNEXIN V FITC» («Beckman Coulter», США).

До суспензії нейтрофілів ($2,0 \times 10^6$ клітин в 1 мл) додавали охолоджений фосфатно-сольовий буфер («Helikon», США), центрифугували протягом 5 хв при 1500 об/хв. Зливали надосад і ресуспензували клітини в Ca^{2+} -зв'язуючому буфері. Після додавання ANNEXIN V FITC і перемішування проби поміщали на лід й інкубували 10 хв в темряві. Потім додавали охолоджений буфер і перемішували.

Аналіз проб проводили на проточному цитометрі Epics XL («Beckman Coulter», США) з аргоновим лазером, визначаючи декілька параметрів: мале кутове світлорозсіювання (FSC), що характеризує розмір клітини, бічне світлорозсіювання (SSC), що характеризує цитоплазматичні, а також мембранні особливості клітини, і показник зеленої флуоресценції (флуоресцеїн ізотіоціанат – FITC – 530 нм). Досліджувану популяцію клітин гейтували в координатах FSC (вісь абсцис) і SSC (вісь ординат), потім аналізували на наявність флуоресценції в координатах на основі Dot Plot (двопараметрична гістограма). Використовували автоматичне програмне забезпечення і методи збору та аналізу даних з високою роздільною здатністю (1024 канали). Отримані результати представляли у відсотках (співвідношення числа аннексин-позитивних клітин до загальної кількості фракції нейтрофілів).

Дискримінаційний аналіз типу клітинної смерті включав: 1-й квадрант – клітини, негативні за анексином V і позитивні за PI – некроз; 2-ий квадрант – нейтрофіли, позитивні за PI і анексином V–FITC – пізня стадія апоптозу або некроз; 3-ій квадрант – нейтрофіли, негативні за PI і анексином V–FITC – життєздатні клітини; 4-ий квадрант – нейтрофіли, позитивні за анексином V–FITC і негативні за PI – рання стадія апоптозу.

2.8 Методи дослідження біотрансформації ксенобіотиків

Активність ферментних систем детоксикації I-ої та II-ої фаз оцінювали за активністю мікросомальної етоксирезорифін O-деетилази (ЕРОД), глутатіонтрансферази (GST) та УДФ-глюкуронілтрансферази.

Мікросоми гепатоцитів отримували шляхом седиментації після їх преципітації з іонами Ca^{2+} (у 80 мМ CaCl_2 в 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4) [208].

ЕРОД активність визначали за утворенням резорурфину при 572 нм у осаді мікросом [209].

Реакційна суміш містила 0,1 М трис-НСІ (рН 8,0), приготовлений на 0,1 М NaCl, 2 мкМ 7-етоксирезорурфин та від 5 до 150 мкг мікросомального білка. Реакцію ініціювали додаванням 0,5 мМ НАДФН. Активність ЕРОД розраховували, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $73,2 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ і перераховували на вміст мікросомального білка.

Активність GST в мікросомах визначали спектрофотометрично за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу з глутатіоном [210].

Реакцію ініціювали додаванням 1 мМ 1-хлоро-2,4-динітробензолу в етанолі. Утворення адукту S-2,4-динітрофеніл глутатіону реєстрували через 2 хв за збільшенням інтенсивності світлопоглинання при 340 нм проти контролю. Активність ферменту розраховували за коефіцієнтом екстинкції комплексу ($9,6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) і виражали в нмоль (комплексу)/(хв·мг білка).

Активність УДФ-глюкуронілтрансферази визначали в мікросомах методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних наборів "Elabscience" виробництва Китай. Абсорбцію проб вимірювали на апараті "StatFax 303 Plus" відповідно до протоколу виробника.

2.9 Морфологічне дослідження тканини печінки, нирки, селезінки

Шматочки фрагментів тканин печінки, нирок, селезінки фіксували в 10 %-му розчині забуференого нейтрального формаліну протягом двох тижнів з триразовою зміною фіксуючого розчину. Після фіксації матеріал відмивали в проточній воді, зневоднювали у розчинах етилового спирту й ущільнювали парафіном. Виготовлення серійних парафінових зрізів товщиною 4-6 мкм проводилося на санному мікротомі. Фарбування препаратів здійснювалося гематоксиліном і еозином [211].

2.10 Методи статистичної обробки результатів

Отриманий цифровий матеріал був оброблений методом варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента та однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Розраховували середні арифметичні величини (M), похибки середніх арифметичних (m), коефіцієнти варіації, а також середні квадратичні відхилення. Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$. У таблицях основної частини дисертації рівень значимості вказували тільки для достовірних результатів.

Для розрахунків використовували комп'ютерну програму Microsoft Excel (USA) та Statistica 10.0 (StatSoft).

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ НА ТОКСИКОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ ГЕРБИЦИДУ ГЛІФОСАТУ

Аналіз літературних даних показав, що за останні десятиліття істотно розширилася сфера практичного застосування наночастинок оксидів металів і, зокрема, наночастинок ZnO. Унікальні фізико-хімічні властивості, хімічна стабільність структури і невисока токсичність даного типу наночастинок зумовлюють їх широке застосування в різних сферах народного господарства, а також в медицині і фармації.

Наявні у літературі повідомлення про токсичний вплив наночастинок ZnO часто є суперечливими. Зокрема, деякі дослідження вказують на відсутність негативних наслідків впливу цих наночастинок на організм, при цьому є також дані, що наночастинок ZnO здатні спричинити ряд негативних ефектів на клітини і тканини організму. Результати окремих робіт часто буває важко порівнювати через наявність ряду несумісних факторів, таких як розміри наночастинок, хімічна природа розчинників, тип застосовуваної експериментальної моделі, шлях та форма введення наночастинок.

Окрім прямого впливу наночастинок на біологічні системи, існує можливість їх взаємодії з різними хімічними сполуками, такими як, наприклад, токсиканти хімічної природи. Тому виникає питання необхідності фундаментального розуміння токсикологічних властивостей наноматеріалів, зокрема, наночастинок ZnO, при їх попаданні в організм разом з класичними хімічними токсикантами, такими як, наприклад, найпоширеніший гербіцид гліфосат.

Даний розділ роботи якраз і присвячений комплексному вивченню біохімічних механізмів впливу наночастинок оксиду цинку на токсичність гліфосату при їх сумісному надходженні в організм.

3.1 Вплив наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату на функціональний стан печінки щурів

Результати впливу наночастинок ZnO і гліфосату на біохімічні показники, що характеризують стан печінки, наведені в таблиці 3.1. Введення тваринам суспензії наночастинок у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом двох тижнів призвело до достовірного зростання активності ферментів-маркерів цитолізу гепатоцитів – аланін- і аспартатамінотрансфераз. Зокрема, активність АлАТ підвищувалася в 1,34 раза, а активність АсАТ – в 1,27 раза порівняно з інтактними тваринами. Таке зростання активності амінотрансфераз свідчить про те, що наночастинок ZnO негативно впливають на мембрани клітин, викликаючи підвищення їх проникності.

На відміну від амінотрансфераз, активність лужної фосфатази, яка зазвичай є чутливим маркером холестазу та обтурації жовчевих шляхів, не зазнавала суттєвих змін під впливом наночастинок. Також після введення тваринам наночастинок ZnO не змінювалася суттєво здатність гепатоцитів до синтезу білка і азотовмісних продуктів, а також не порушувалася екскреторна функція печінки. Зокрема, вміст загального білка, сечовини, креатиніну і загального білірубіну в сироватці крові тварин, яким вводили наночастинок оксиду цинку, не відрізнявся від аналогічних показників у групі інтактних тварин.

На відміну від наночастинок, внутрішньошлункове введення впродовж 14 днів 0,5 мл розчину гербіциду Раундапу з розрахунку дози гліфосату 250 мг/кг маси тіла призвело як до вираженого цитолізу гепатоцитів, так і до порушень білоксинтетичної та екскреторної функцій печінки (табл. 3.1).

Під впливом гліфосату активність АлАТ в сироватці крові зросла в 1,8 раза ($p < 0,05$), а активність АсАТ – в 1,7 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 3.1– Показники функціонального стану печінки щурів при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Групи тварин			
	Інтактні	Нано-ZnO	Гліфосат	Нано-ZnO +гліфосат
Сироватка крові				
АлАТ, Од/л	56,32 ± 2,05	76,03 ± 3,12*	101,37 ± 3,95*	128,40 ± 5,32* ^{&#}
АсАТ, Од/л	145,13 ± 11,85	185,76 ± 12,19*	243,81 ± 15,96*	304,77 ± 20,11* ^{&#}
ЛФ, Од/л	258,54 ± 16,22	291,35 ± 17,34	374,88 ± 20,35*	478,29 ± 23,05* ^{&#}
Загальний білок, г/л	72,08 ± 3,42	63,21 ± 3,09	56,33 ± 3,05*	48,62 ± 2,75* ^{&}
Сечовина, ммоль/л	5,91 ± 0,55	4,83 ± 0,46	4,32 ± 0,40*	3,46 ± 0,35* ^{&}
Креатинін, мкмоль/л	75,14 ± 4,62	69,40 ± 5,50	105,5 ± 6,32*	110,8 ± 5,32* ^{&}
Загальний білірубін, мкмоль/л	5,20 ± 0,24	6,50 ± 0,36	10,25 ± 0,74*	15,80 ± 0,90* ^{&#}
Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем ($p<0,05$); & – зміни достовірні порівняно з показниками тварин, яким вводили наночастинок ZnO ($p<0,05$); # – зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили гліфосат ($p<0,05$).				

Про серйозне ураження печінки гербіцидом також свідчило виражене підвищення активності ЛФ у сироватці крові III групи тварин. Так, на 15-у добу експерименту активність даного ферменту зростала в 1,4 раза ($p<0,05$) порівняно з аналогічним показником у групі інтактних тварин.

Під впливом гербіциду гліфосату також спостерігали незначне пригнічення синтетичної функції печінки (у сироватці крові III групи тварин достовірно (на 13 %, $p<0,05$) знижувався вміст загального білка порівняно з інтактними щурами) і погіршення екскреторної функції печінки (рівень

загального білірубину у щурів III групи підвищувався в 1,9 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем).

Гербіцид гліфосат також справив суттєвий вплив на вміст сечовини і креатиніну в сироватці крові щурів. Рівень сечовини під впливом токсину знижувався в 1,4 раза ($p < 0,05$), а вміст креатиніну, навпаки, підвищувався в 1,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з відповідними показниками у інтактних щурів (табл. 3.1).

У найбільшому ступені показники функціонального стану печінки змінювалися у сироватці крові щурів, яким вводили наночастинки оксиду цинку сумісно з гербіцидом гліфосатом. У цьому випадку активність маркерних ензимів цитолізу і лужної фосфатази була достовірно вищою порівняно як з контрольною групою тварин, так і з щурами, яким вводили тільки наночастинки чи тільки гліфосат.

Так, активність АлАТ при сумісному введенні наночастинок і гліфосату зросла в 2,3 раза порівняно з контролем, а АсАТ – в 2,1 раза ($p < 0,05$ в обох випадках). Порівняно з групою тварин, яким вводили тільки наночастинки, активність АлАТ і АсАТ зросла відповідно в 1,7 і 1,6 раза ($p < 0,05$). Якщо порівняти різницю активностей амінотрансфераз у щурів, які піддавалися комбінованому впливу засобів і тварин, яким вводили тільки хімічну сполуку, то можна побачити, що наночастинки достовірно потенціювали токсичність гербіциду – активність АлАТ зросла на 26 % ($p < 0,05$), а активність АсАТ – на 25 % ($p < 0,05$) (рис.3.1, 3.2).

У щурів з комбінованим ураженням активність лужної фосфатази була вищою порівняно з аналогічним показником у тварин контрольної групи в 1,9 раза ($p < 0,05$), а порівняно з щурами, яким вводили тільки наночастинки – в 1,6 раза ($p < 0,05$). Як і в попередньому випадку, наночастинки ZnO посилювали токсичну дію гліфосату – активність лужної фосфатази у щурів IV групи була на 27 % ($p < 0,05$) вищою порівняно з такою у III групі тварин (див. табл. 3.1).

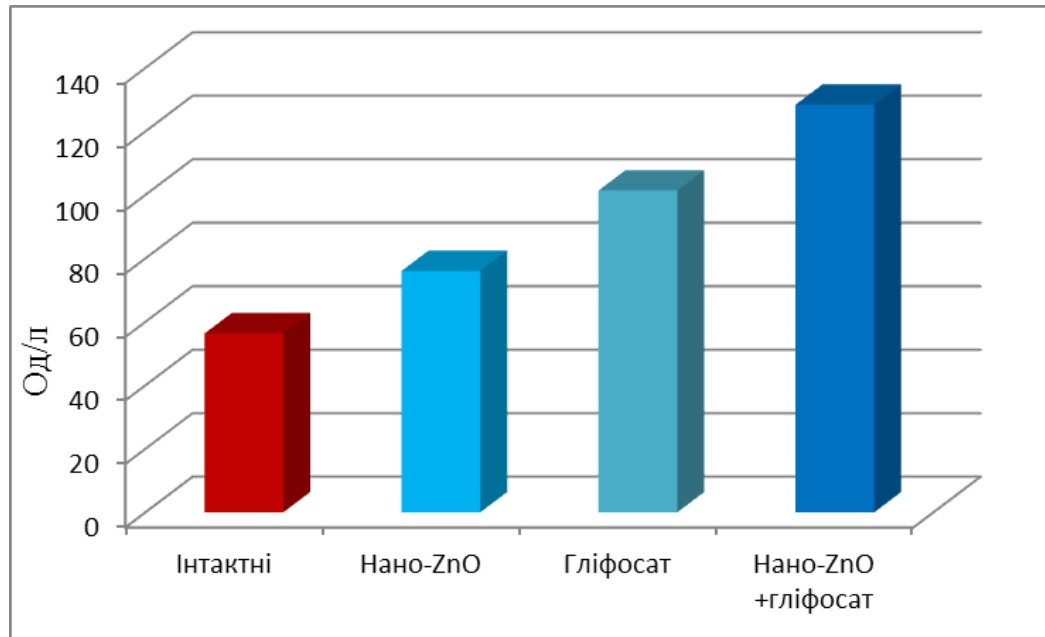


Рисунок 3.1 – Зміни активності АлАТ у сироватці крові щурів при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату

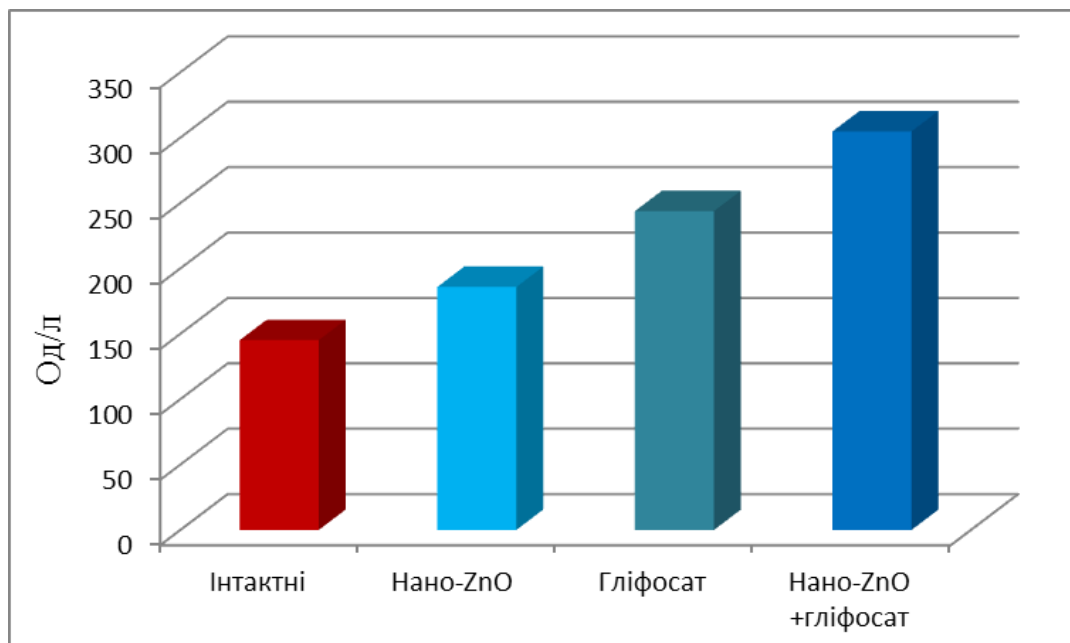


Рисунок 3.2 – Зміни активності АсАТ у сироватці крові щурів при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату

Вміст у сироватці крові щурів IV групи загального білка був в 1,5 раза ($p < 0,05$) меншим порівняно з аналогічним показником у інтактній групі

тварин і в 1,3 раза нижчим порівняно з групою тварин, яким вводили тільки наночастинки. При цьому, при порівнянні показника вмісту загального білка у щурів з комбінованим ураженням і у тварин, яким вводили тільки гербіцид, достовірних відмінностей не виявлено, що свідчить про те, що наночастинки суттєво не посилюють пригнічення білоксинтезуючої функції печінки гліфосатом.

Рівень загального білірубіну у щурів, яким вводили протягом 14 днів комбінацію досліджуваних засобів, підвищувався в 3,0 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем і в 2,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з групою тварин, яким вводили тільки наночастинки. Наночастинки ZnO достовірно посилювали здатність гліфосату пригнічувати екскреторну функцію печінки – вміст загального білірубіну у щурів IV групи був 1,5 раза вищим від аналогічного показника у тварин III групи.

Вміст сечовини у сироватці крові щурів, яким вводили комбінацію досліджуваних засобів, був в 1,7 рази ($p < 0,05$) меншим, ніж такий в контролі, і в 1,4 рази ($p < 0,05$) меншим від відповідного показника в групі тварин, яким вводили самі наночастинки. Рівень креатиніну у сироватці крові тварин, які піддавалися комбінованому впливу наночастинок і хімічного токсину, був в 1,5 раза ($p < 0,05$) і 1,6 раза ($p < 0,05$) вищим від відповідних показників у інтактних тварин і тварин, яким вводили тільки наночастинки. Необхідно відмітити, що наночастинки оксиду цинку не потенціювали негативний вплив гліфосату на концентрацію сечовини і креатиніну в сироватці крові тварин – відповідні показники у тварин IV групи не відрізнялися достовірно від таких у тварин III групи (див. табл. 3.1).

Отже, з результатів досліджень, описаних в цьому розділі, можна прийти до висновку, що наночастинки оксиду цинку посилюють гепатотоксичні ефекти фосфорорганічного гербіциду гліфосату.

3.2 Вплив наночастинок оксиду цинку та гліфосату на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в сироватці крові й печінці щурів

З літературних даних відомо, що вирішальну роль у токсичності гліфосату відіграє оксидативний стрес, який зумовлений надмірним виробництвом внутрішньоклітинних активних форм кисню або недостатнім антиоксидантним захистом. Є також дані, що при дії на організм наночастинок ZnO в різних органах активуються окислювальні процеси. Питанням синергізму впливу наночастинок ZnO і гліфосату на інтенсивність оксидативного стресу у експериментальних тварин присвячений цей підрозділ дисертаційної роботи.

Надмірна продукція АФО викликає пошкодження ліпідів, ДНК і білків і в подальшому може призвести до апоптозу і загибелі клітин. Інтенсивність процесів ліпопероксидації вимірюється шляхом моніторингу змін вмісту ТБК-активних продуктів, а інтенсивність окислювальної модифікації білків – шляхом вимірювання вмісту карбонільних груп.

Як показали результати наших досліджень (табл. 3.2), введення щурам суспензії наночастинок ZnO у дозі 100 мг/кг маси тіла викликало достовірні зміни як з боку показників інтенсивності процесів ліпопероксидації, так і з боку показників інтенсивності окислювальної модифікації білків. Під впливом наночастинок вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові тварин збільшувався на 23 % ($p < 0,05$), а вміст альдегідо- і кетонітрих нейтрального характеру, що утворюються при дії активних радикалів на амінокислотні залишки в молекулах білків – на 45 %, і альдегідо- і кетонітрих основного характеру – на 66 % ($p < 0,05$).

Таблиця 3.2 – Показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в сироватці крові й печінці щурів при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату (M ± m, n=10)

Показник	Групи тварин			
	Інтактні	Нано-ZnO	Гліфосат	Нано-ZnO +гліфосат
Сироватка крові				
ТБК-АП, мкмоль/л	7,53 ± 0,45	9,26 ± 0,53*	10,69 ± 0,65*	16,56 ± 0,80* ^{&#}
ОМБ ₃₇₀ , мкмоль/мг білка	0,8 ± 0,03	1,16 ± 0,05*	1,36 ± 0,07*	1,52 ± 0,08* ^{&}
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	0,53 ± 0,02	0,88 ± 0,04*	1,06 ± 0,05*	1,24 ± 0,05* ^{&#}
ЦП, мг/л	227,3 ± 7,12	197,16 ± 6,80*	170,67 ± 6,23*	141,87 ± 6,05* ^{&#}
КТ, мкат/л	0,61 ± 0,03	0,48 ± 0,04*	0,40 ± 0,05*	0,34 ± 0,04*
ГSH, ммоль/л	2,84 ± 0,19	2,40 ± 0,17	2,02 ± 0,18*	1,57 ± 0,15* ^{&}
ЗАА, %	59,68 ± 3,15	51,89 ± 2,75	44,20 ± 2,60*	33,15 ± 2,65* ^{&#}
Гомогенат печінки				
ТБК-АП, мкмоль/кг	28,36 ± 2,04	42,54 ± 2,85*	53,88 ± 3,02*	59,55 ± 2,92* ^{&}
СОД, ум.од/г	32,05 ± 1,72	24,6 ± 1,58*	20,03 ± 1,28*	15,26 ± 1,12* ^{&#}
КТ, мкат/мг	35,15 ± 2,01	25,10 ± 1,86*	20,67 ± 1,72*	18,02 ± 1,61* ^{&}
Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем (p<0,05); & – зміни достовірні порівняно з показниками тварин, яким вводили наночастинок ZnO (p<0,05); # – зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили гліфосат (p<0,05).				

До більш вираженої активації процесів ліпопероксидації призвело введення експериментальним тваринам впродовж 14 днів гліфосату у дозі 250 мг/кг маси тіла. У цьому випадку вміст ТБК-активних продуктів у

сироватці крові зростав на 42 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин (див. табл. 3.2).

Введення гербіциду також викликало виражену окисну модифікацію як нейтральних, так і лужних амінокислот сироватки крові. На 15-у добу експерименту вміст 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 370 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетоніохідних нейтрального характеру), збільшився на 70 % ($p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами, а тих, що визначалися при 430 нм (альдегідо- і кетоніохідні основного характеру), – у 2,0 раза ($p < 0,05$) (див. табл. 3.2).

Найсуттєвіше досліджувані показники окисативного стресу проявилися у тварин, яким вводили наночастинки ZnO сумісно з гліфосатом. У цьому випадку досліджувані показники були достовірно вищими порівняно як з групою тварин, яким вводили самі наночастинки, так і з групою, якій вводили гербіцид. Вміст ТБК-активних продуктів зростав у сироватці крові щурів IV групи в 2,2 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$), в 1,7 раза порівняно з тваринами, яким вводили наночастинки ($p < 0,05$) і в 1,5 раза порівняно з щурами, яким вводили гліфосат ($p < 0,05$).

Також у сироватці крові щурів, які зазнавали впливу комбінації «наночастинки ZnO + гліфосат», спостерігалось достовірно зростання концентрації модифікованих вільними радикалами білків. Вміст ОМБ₃₇₀ підвищувався в 1,9 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$) і в 1,3 раза порівняно з групою тварин, яким вводили наночастинки ($p < 0,05$). Варто зазначити, що при порівнянні з групою щурів, яким вводили гліфосат, зміни вмісту ОМБ₃₇₀ під впливом комбінації засобів виявилися недостовірними.

Рівень окиснено модифікованих білків, що визначалися при довжині хвилі 430 нм, зростав у IV групи тварин порівняно з контролем в 2,3 раза ($p < 0,05$), порівняно з II групою тварин – в 1,4 раза ($p < 0,05$) і порівняно з III групою тварин – на 16,0 % ($p < 0,05$) (див. табл. 3.2).

Отже, на основі вищеописаних результатів досліджень можна прийти до висновку, що наночастинки ZnO при їх сумісному попаданні в організм з гербіцидом гліфосатом стимулюють вільнорадикальні процеси в органах піддослідних тварин.

Фактором, який визначає вираженість оксидативного стресу, крім інтенсивності утворення активних форм кисню, є також функціональний стан системи антиоксидантного захисту, яка знешкоджує вільні радикали чи гідроперекиси ще до моменту реалізації їх руйнівної дії. Ми вивчали вплив досліджуваних сполук на ферментативну ланку антиоксидантної системи – активність супероксиддисмутази, каталази, вміст церулоплазмину. Також досліджували рівень одного з основних неферментативних компонентів системи антиоксидантного захисту – відновленого глутатіону і вимірювали загальну антиоксидантну активність сироватки крові.

Як видно з результатів наших досліджень, представлених в таблиці 3.2, введення тваринам наночастинок оксиду цинку призводило до достовірного (на 22 %) зниження активності каталази і достовірного (на 14 %) зменшення вмісту церулоплазмину в сироватці крові експериментальних тварин. При цьому загальна антиоксидантна здатність сироватки і вміст в сироватці відновленого глутатіону, хоча і знижувалися, але зміни були недостовірними.

Застосування гербіциду гліфосату супроводжувалося значно глибшими порушеннями антиоксидантної системи. Активність одного з найбільш важливих антиоксидантних ферментів – каталази, яка знешкоджує перекис водню, під впливом токсиканта знижувалася в сироватці крові більше, ніж в 1,5 рази ($p < 0,05$).

Вміст глікопротеїну сироватки крові церулоплазмину, який є одним з найпотужніших інактиваторів активних форм кисню в організмі, під впливом гліфосату зменшувався на 26 % ($p < 0,05$).

Величина інтегрального показника – загальної антиоксидантної активності сироватки крові у щурів, яким вводили гербіцид, також знижувалася на 26 % ($p < 0,05$) (див. табл. 3.2).

Ще у більшому ступені (на 29 %, $p < 0,05$) зменшувався вміст в сироватці крові тварин, які піддавалися дії гліфосату, відновленого глутатіону – антиоксиданту, який забезпечує в організмі функціонування ферменту глутатіонпероксидази, яка, в свою чергу, відповідає за знешкодження токсичних пероксидів.

Введення наночастинок ZnO разом з гліфосатом призводило до достовірно сильнішого пригнічення функціонального стану системи антиоксидантного захисту в крові порівняно із застосуванням кожного з чинників окремо. Зокрема, концентрація церулоплазміну в сироватці крові щурів IV групи була в 1,7 раза меншою ($p < 0,05$), ніж в контролі. Комбінація «наночастинки+гліфосат» також викликала зниження вмісту церулоплазміну в сироватці в 1,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з самими наночастинами і в 1,2 раза ($p < 0,05$) порівняно з самим гліфосатом.

Активність каталази у сироватці крові щурів IV групи була в 1,8 раза ($p < 0,05$) нижчою від такої в сироватці крові інтактних тварин. При порівнянні активності каталази у тварин IV і II груп і IV і III груп виявилось, що застосування комбінації засобів не призводило до достовірно більшого пригнічення ферменту, ніж застосування тільки наночастинок чи тільки гліфосату.

У щурів IV групи концентрація відновленого глутатіону була достовірно нижчою порівняно з контролем (в 1,8 раза, $p < 0,05$) і порівняно з групою тварин, яким вводили тільки наночастинок (в 1,5 раза, $p < 0,05$). В той же час наночастинок не потенціювали негативного ефекту гліфосату на вміст відновленого глутатіону (різниця показників вмісту GSH у тварин IV і III груп була недостовірною).

На відміну від показника вмісту відновленого глутатіону, величина показника загальної антиоксидантної активності сироватки крові тварин, які зазнавали комбінованого впливу наночастинок і хімічного токсиканта, була достовірно нижчою порівняно з усіма іншими групами щурів. Зокрема, порівняно з інтактними тваринами даний показник у щурів IV групи знижувався в 1,8 раза ($p < 0,05$), порівняно з тваринами, яким вводили тільки наночастинок – в 1,6 раза ($p < 0,05$) і порівняно з щурами, яким вводили тільки гліфосат, – в 1,3 раза ($p < 0,05$) (табл. 3.2).

Дослідження інтенсивності оксидативного стресу в тканині печінки показало, що введення тваринам протягом двох тижнів наночастинок оксиду цинку призводило до достовірного посилення процесів ліпопероксидації в печінці (вміст ТБК-активних продуктів підвищився в 1,5 раза, $p < 0,05$ порівняно з контролем). У більшому ступені (в 1,9 раза, $p < 0,05$) викликало підвищення рівня ТБК-активних продуктів в гомогенаті печінки застосування гербіциду гліфосату.

Введення тваринам наночастинок сумісно з гліфосатом викликало ще більшу активацію ліпопероксидних процесів у печінці – вміст продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою, підвищувався в 2,1 раза ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами і в 1,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з групою тварин, яким вводили тільки наночастинок. Необхідно відмітити, що достовірної різниці між досліджуваними показниками у тварин III і IV груп не спостерігалось, що, очевидно, свідчить про те, що наночастинок не посилювали здатність гліфосату активізувати ліпопероксидні процеси в печінці.

Суттєвих змін під впливом досліджуваних агентів зазнавала антиоксидантна система печінки. Один з найважливіших ферментів антиоксидантної системи супероксиддисмутаза знешкоджує супероксиданіон-радикали, які утворюються в результаті надходження до організму токсичних чинників, тобто перериває ланцюг вільнорадикального

окислення ще на стадії ініціації. Наночастинки оксиду достовірно (в 1,3 раза, $p < 0,05$) пригнічували активність даного ферменту. Після введення хімічного токсиканта гліфосату активність супероксиддисмутази знижувалася у печінці ще в більшому ступені (в 1,6 раза, $p < 0,05$) (див. табл. 3.2). При сумісному застосуванні наночастинок і гліфосату активність ферменту знижувалася порівняно з контролем в 2,1 раза ($p < 0,05$) і порівняно з тваринами, яким вводили тільки наночастинки, – в 1,6 раза ($p < 0,05$). На відміну від ТБК-активних продуктів, наночастинки потенціювали токсичний вплив гліфосату на функціонування супероксиддисмутази – активність ферменту у щурів IV групи була достовірно (в 1,3 раза, $p < 0,05$) нижчою від аналогічного показника у тварин, яким вводили тільки гербіцид.

При знешкодженні супероксиданіону супероксиддисмутазою утворюється перекис водню, який також є токсичним для клітини і, в свою чергу, знешкоджується ферментом каталазою. Активність каталази в гепатоцитах під впливом наночастинок оксиду оксиду цинку знижувалася в 1,4 раза ($p < 0,05$). Інтоксикація щурів гербіцидом гліфосатом призводила до різкішого зменшення активності каталази – в 1,7 раза ($p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами. Як і у випадку з супероксиддисмутазою, у найбільшому ступені даний показник зменшувався під впливом комбінованого застосування наночастинок і гліфосату. У тварин IV групи активність ферменту була в 1,9 раза меншою ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин, в 1,4 раза меншою ($p < 0,05$) порівняно з щурами, що зазнавали впливу лише наночастинок. При порівнянні досліджуваного показника у щурів, яким вводилася комбінація засобів, і тварин, яким вводився тільки гліфосат, достовірних змін не виявлено.

Отже, як під впливом наночастинок оксиду цинку, так і, особливо, під впливом гербіциду гліфосату в плазмі крові і тканині печінки щурів активуються процеси вільнорадикального окислення. Оксидативний стрес тісно пов'язаний з порушеннями функціонування системи оксиду азоту. Крім

того, вільнорадикальне ураження клітин призводить до вивільнення прозапальних медіаторів, які, в свою чергу, також викликають зміни процесів синтезу оксиду азоту. Ми дослідили вплив окремого та сумісного застосування наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату на загальну активність NO-синтази у печінці і вміст метаболітів оксиду азоту в крові.

Двотижневе введення щурам суспензії наночастинок ZnO у дозі 100 мг/кг маси тіла викликало достовірне (в 1,3 раза, $p < 0,05$) підвищення загальної активності NO-синтази у печінці (рис. 3.3). Очевидно, що така активація ферменту призвела до зафіксованого нами збільшення вмісту метаболітів оксиду азоту в крові порівняно з контролем (рис. 3.4).

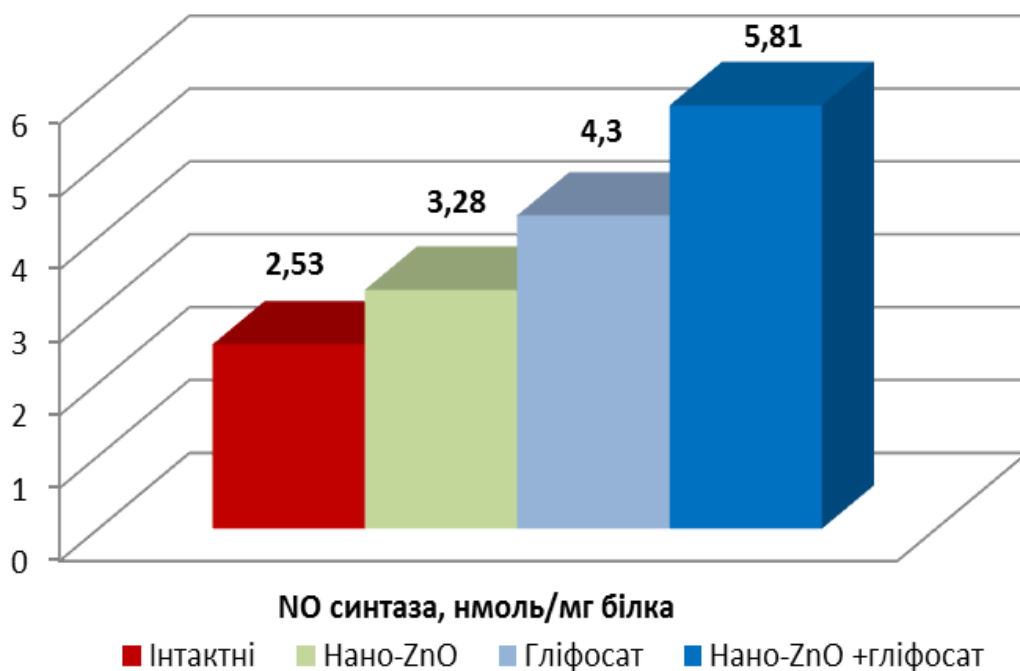


Рисунок 3.3 – Зміни активності NO-синтази в печінці щурів при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату

При введенні тваринам гліфосату загальна активність NO-синтази в печінці підвищувалася в 1,7 раза ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин. Закономірно, що при цьому вміст нітратів і нітритів в плазмі

крові також достовірно (в 1,8 раза, $p < 0,05$) збільшувався порівняно з контролем.

Ще більшою мірою система оксиду азоту активувалася у тварин, яким гліфосат вводили разом з наночастинками ZnO. У цьому випадку загальна активність NO синтази була в 2,3 раза ($p < 0,05$) вищою порівняно з інтактною групою тварин. Достовірним виявився вплив комбінації досліджуваних чинників і в порівнянні з їх окремим введенням. Так, порівняно з II групою щурів активність NO синтази зростала у IV групі в 1,8 рази ($p < 0,05$), а порівняно з III групою – в 1,3 раза ($p < 0,05$) (див. рис. 3.3).

Введення наночастинок оксиду цинку призводило до достовірного збільшення в 1,4 раза ($p < 0,05$) вмісту NO_x у плазмі крові тварин порівняно з показниками контролю. Під впливом гербіциду спостерігали значне зростання вмісту NO_x у плазмі крові тварин. Даний показник достовірно перевищував показник норми в 1,8 раза ($p < 0,05$) (рис. 3.4).

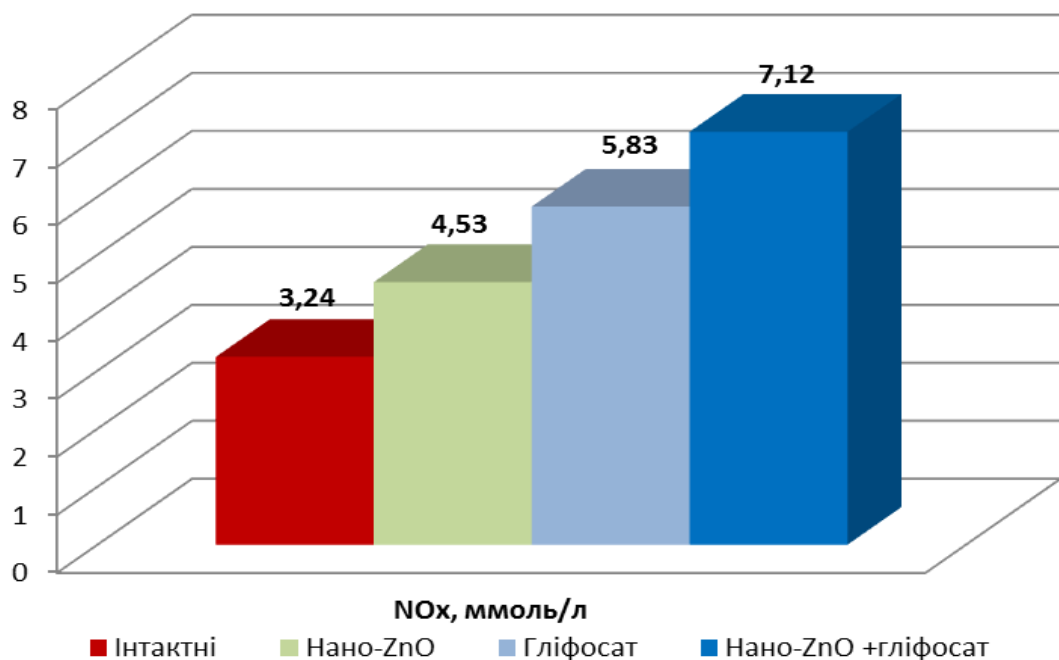


Рисунок. 3.4 – Зміни вмісту NO_x у сироватці крові щурів при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату

До максимально виражених змін досліджуваного показника призвело введення наночастинок оксиду цинку сумісно з гліфосатом. В цьому випадку вміст NO_x у плазмі крові тварин був вищим порівняно з таким в контролі в 2,2 раза ($p < 0,05$), а порівняно з аналогічним показником у тварин, що зазнавали впливу лише наночастинок – в 1,6 раза ($p < 0,05$). Наночастинки посилювали здатність гліфосату викликати нітрооксидативний стрес. Так, як і у випадку з загальною активністю NO синтази, рівень нітратів і нітритів у щурів, яким вводили комбінацію досліджуваних засобів, був достовірно (в 1,2 раза, $p < 0,05$) вищим, ніж аналогічний показник у тварин, яким вводили лише гербіцид гліфосат (див. рис. 3.4).

Отримані нами дані свідчать про те, що наночастинок оксиду цинку посилюють здатність хімічного токсиканта гліфосату викликати оксидативний та нітрооксидативний стрес у плазмі крові і печінці експериментальних щурів.

3.3 Гуморальний імунітет у експериментальних тварин при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату

Незаперечним є той факт, що імунна система є важливим регулятором антигенної резистентності в організмі внаслідок здатності до зв'язування та нейтралізації чужорідних агентів – антигенів. Це забезпечується як через задіяння її гуморальної, так і клітинної ланок. Головними ефektорами гуморальної ланки імунітету є імуноглобуліни – специфічні протеїни γ -глобулінової фракції плазми крові, які складають до 20 % її маси. У плазмі крові присутні п'ять класів імуноглобулінів: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, що забезпечують реалізацію імунного захисту. Кожен із вказаних класів імуноглобулінів виконує певні специфічні функції. Ми вивчали вплив наночастинок оксиду цинку та гліфосату на вміст у сироватці крові імуноглобулінів класів A, M і G, які забезпечують безпосередню імунну

відповідь організму за умов вторгнення антигенів, або ж запобігають проникненню їх до організму.

Як свідчать результати наших досліджень, гуморальна ланка імунної системи не зазнала вірогідних змін у групі тварин, яким вводили наночастинки оксиду цинку. Зокрема ми бачимо, що показники вмісту Ig A, Ig M та Ig G достовірно не відрізнялися від аналогічних показників інтактних тварин. Зміни з боку вмісту ЦІК були аналогічними (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Вплив наночастинок оксиду цинку та гліфосату на показники гуморальної ланки імунітету щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Групи тварин			
	Інтактні	Нано-ZnO	Гліфосат	Нано-ZnO ± гліфосат
Ig A, г/л	0,64 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,68 ± 0,04	0,95 ± 0,06*#
Ig M, г/л	0,95 ± 0,08	0,90 ± 0,07	0,98 ± 0,06	1,46 ± 0,09*#
Ig G, г/л	9,52 ± 0,85	11,02 ± 0,91	16,72 ± 1,18*	21,54 ± 1,35*#
ЦІК, ум. од.	45,61 ± 3,45	52,45 ± 3,58*	89,67 ± 4,23*	128,54 ± 5,24*#

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем ($p < 0,05$); # – зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили гліфосат ($p < 0,05$).

Як видно з результатів наших досліджень, наведених у таблиці 3,3, достовірних змін зазнавала гуморальна ланка імунної системи після введення тваринам гербіциду гліфосату. У цьому випадку збільшувалася концентрація Ig G, даний показник підвищився в 1,7 раза ($p < 0,05$) порівняно з показником контрольної групи тварин. Також було зафіксовано різке збільшення (у 2 раза ($p < 0,05$)) концентрації ЦІК відносно показників контрольної групи тварин.

Що стосується інших показників (IgA і Ig M), то вони при введенні тваринам гліфосату достовірно не відрізнялися від аналогічних показників контрольної групи тварин.

Підвищення вмісту IgG при хімічній інтоксикації, ймовірно, є наслідком активації ефекторної ланки імунної системи у відповідь на запальні або деструктивні зміни тканин організму. Відомо, що токсичне ураження гербіцидом гліфосатом спричиняє перекисну деградацію макромолекул протеїнової природи і підсилює протеолітичні процеси в клітинах. Дані процеси створюють умови для виникнення автоімунних реакцій і появи протиорганних антитіл.

Активації автоімунних реакцій сприятимуть і порушення зі сторони функціонального стану мікросомальної монооксигеназної системи, спричиненні впливом токсиканта на організм. За нормальних умов дана система здатна трансформувати ендогенні продукти з антигенними властивостями. Пригнічення монооксигеназної системи призводить до тривалої персистенції сенсibiliзувальних агентів в організмі. Очевидно, саме вищеназвані причини і зумовили зареєстроване нами достовірне підвищення вмісту імуноглобулінів класу G в сироватці крові тварин, яким вводили гербіцид гліфосат.

На користь цього припущення свідчить і зафіксоване нами значне збільшення концентрації циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові тварин, уражених гліфосатом.

Як видно з даних, наведених у таблиці 3.3 максимальне підвищення концентрації імуноглобулінів та ЦК спостерігалися у групи тварин, яким сумісно вводили наночастинки оксиду цинку та гліфосат. Варто зазначити, що у тварин, які піддавалися комбінованій дії наночастинок разом з хімічним токсикантом також зростала концентрація Ig A (на 39 % ($p < 0,05$)), а вміст Ig M та Ig G підвищився відповідно на 48 % та 28% ($p < 0,05$) порівняно з групою тварин, яким вводили сам гліфосат. Вміст ЦК у сироватці щурів зазнав достовірного (на 43 %) зростання порівняно з групою тварин, яким вводили тільки хімічний токсикант. Збільшення рівня ЦК у сироватці крові

щурів вказує на посилення гуморальної імунної відповіді на надходження в організм наночастинок оксиду цинку та гліфосату як чужорідного агенту.

Певну роль в підвищенні рівня імуноглобулінів та імунних комплексів при інтоксикації може грати також зміна їх катаболізму. Порушення виведення ЦК з організму сприяє тривалій їх циркуляції в кров'яному руслі, що створює умови для їх шкідливої дії на тканини.

З огляду на такі результати можна зробити висновок, що наночастинок оксиду цинку, за умов сумісної дії, посилюють здатність токсиканта гліфосату викликати зміни гуморальної ланки імунітету дослідних тварин.

Такий синергізм токсичних ефектів досліджуваних чинників, найімовірніше, зумовлений здатністю наночастинок оксиду цинку абсорбувати на своїй поверхні велику кількість токсичних сполук та сприяти їх транспорту до тканин і клітин.

3.4 Цитокиновий профіль експериментальних тварин при дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату

Інтоксикація організму зазвичай призводить до ураження тканин і клітин і, як наслідок, до синтезу і вивільнення біологічно активних речовин, що регулюють міжклітинні та міжсистемні взаємодії в організмі і можуть виступати медіаторами запалення – цитокинів.

Двотижневе введення щурам суспензії наночастинок оксиду цинку у дозі 100 мг/кг маси тіла не викликало достовірних змін цитокинового профілю сироватки крові (табл. 3.4).

В той же час внутрішньошлункове введення гліфосату в дозі 250 мг/кг маси тіла протягом 14 днів призводило до достовірних змін концентрацій TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 у сироватці крові щурів. Зокрема, вміст фактору некрозу пухлин- α у крові тварин, яким вводили гербіцид, зростав у 3,5 рази ($P < 0,05$) порівняно з інтактними щурами. Таке підвищення даного

цитокіну може бути наслідком прозапального ефекту токсиканта та активації моноцит/макрофагальної системи.

Таблиця 3.4 – Показники вмісту цитокінів в сироватці крові щурів, які піддавалися впливу наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату (M ± m, n=10)

Показник	Групи тварин			
	Інтактні	Нано-ZnO	Гліфосат	Нано-ZnO +гліфосат
TNF- α , пг/мл	10,18 ± 2,56	14,80 ± 2,75	35,60 ± 3,84*	59,05 ± 5,60* ^{&#}
IL-1 β , пг/мл	14,20 ± 2,85	20,15 ± 3,70	68,20 ± 7,40*	116,10 ± 12,90* ^{&#}
IL-4, пг/мл	25,50 ± 3,60	20,12 ± 3,60	17,15 ± 2,58	9,20 ± 1,01* ^{&#}
IL-6, пг/мл	9,80 ± 1,90	15,70 ± 2,30	32,30 ± 3,70*	57,80 ± 6,70* ^{&#}
IL-10, пг/мл	28,16 ± 3,50	25,15 ± 3,25	20,10 ± 2,80	10,60 ± 1,90* ^{&#}
Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем (p<0,05); & – зміни достовірні порівняно з показниками тварин, яким вводили наночастинок ZnO (p<0,05); # – зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили гліфосат (p<0,05).				

Рівень ще одного важливого прозапального цитокіну IL-1 β у крові тварин, яким вводили гліфосат, також достовірно підвищувався – у 4,8 раза порівняно з контрольною групою тварин, а концентрація IL-6, який є одним із найважливіших медіаторів гострої фази запалення і секретується макрофагами, фібробластами, клітинами судинного ендотелію, Т-клітинами у відповідь на їх активацію фактором некрозу пухлин, патоген-зв'язаними молекулами чи токсинами, підвищувалася в 3,3 раза.

Вивчення концентрації протизапальних цитокінів сироватки крові при внутрішньошлунковому введенні гліфосату показало тенденцію до зниження

їх продукції, проте при статистичному аналізі зміни виявилися недостовірними.

Беручи до уваги отримані нами дані, що гліфосат викликає оксидативний стрес, що призводить до окислювального пошкодження мембран клітин і макромолекул, активації специфічних шляхів внутрішньоклітинної передачі сигналу з подальшим вивільненням біологічно активних речовин і розвитком запалення, можна припустити, що саме це і стало причиною підвищення концентрації прозапальних цитокінів у щурів, яким вводили гліфосат.

Найбільш суттєво цитокіновий профіль змінювався у сироватці крові тварин, яким вводили наночастинки оксиду цинку сумісно з гербіцидом. У цьому випадку концентрація фактору некрозу пухлин- α зросла у 5,8 рази ($p < 0,05$), IL-1 β – у 8,2 рази ($p < 0,05$), IL-6 – у 5,9 рази ($p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами.

Варто зазначити, що при поєднаному застосуванні наночастинок і гербіциду рівні всіх прозапальних цитокінів були достовірно вищими порівняно з такими як у тварин, яким вводили тільки наночастинки, так і у тварин, яким вводили сам гліфосат.

Зокрема, рівень TNF- α у тварин IV групи був в 4,2 рази вищим, ніж такий у щурів, які піддавалися дії тільки наночастинок, вміст IL-1 β – в 5,8 рази вищим, вміст IL-6 – в 3,8 рази вищим ($p < 0,05$ в усіх випадках).

Про припущення, що наночастинки посилюють токсичний ефект гліфосату свідчить той факт, що рівень прозапальних цитокінів у тварин, яким сумісно вводилися досліджувані чинники був достовірно вищим від такого у тварин, яким вводили тільки гербіцид. Вміст TNF- α у тварин IV групи був 1,7 рази вищим, у III групи щурів, вміст IL-1 β – в 1,7 рази вищим, вміст IL-6 – в 1,8 рази вищим ($p < 0,05$ в усіх випадках).

При сумісному введенні щурам наночастинок і гліфосату, на відміну від їх окремого застосування, спостерігалось достовірне зниження

концентрації IL-4 та IL-10 порівняно з усіма досліджуваними групами тварин (див. табл. 3.4).

Відомо, що IL-4 відіграє важливу роль у хронічному запаленні. Його вміст у сироватці крові тварин IV групи був у 2,7 раза меншим, ніж в контролі ($p < 0,05$), в 2,2 раза меншим, ніж у тварин, яким вводили наночастинки, і в 1,9 раза меншим, ніж у тварин, яким вводили гліфосат ($p < 0,05$).

Присутність IL-4 у тканинах сприяє альтернативній активації макрофагів у клітині M2, що супроводжується секрецією IL-10. В свою чергу IL-10 інгібує індукцію секреції запальних цитокінів – TNF- α , IL-1 β , інтерлейкіну 12 та інтерферону-гамма, опосередковану ліпополісахаридом чи хімічними токсинами. Рівень IL-10 у щурів IV групи був в 2,6 раза меншим порівняно з інтактними тваринами, в 2,4 раза меншим порівняно з тваринами, яким вводили наночастинки, і в 1,9 раза меншим порівняно з тваринами, яким вводили гербіцид ($p < 0,05$ в усіх випадках).

Таким чином, наночастинки оксиду цинку посилюють здатність хімічного токсиканта гліфосату підвищувати продукцію прозапальних цитокінів.

3.5 Вплив наночастинок оксиду цинку на прооксидний та проапоптичний ефекти гербіциду гліфосату

Відомо, що, порівняно з іншими клітинами організму, продукція активних форм кисню є найбільш значущою в нейтрофільних лейкоцитах. Індукція окисного стресу ініціює розвиток програмованої загибелі нейтрофілів, які швидко вступають на шлях спонтанного апоптозу, що не потребує будь-якого зовнішнього сигналу для їх відмирання.

Встановлено, що введення дослідним тваринам наночастинок ZnO в дозі 100 мг/кг маси тіла тварин супроводжувалося зростанням генерації

активних форм кисню нейтрофілами крові та кількості клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, проте такі зміни виявилися статистично недостовірними (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Показники вмісту в нейтрофілах активних форм кисню, кількості клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, інтенсивності апоптозу/некрозу нейтрофілів щурів при дії наночастинок оксиду цинку і гліфосату ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Групи тварин			
	Інтактні	НЧ ZnO	Гліфосат	НЧ ZnO +гліфосат
АФО+ – клітини, %	18,90 ± 1,22	19,11 ± 1,26	41,56 ± 2,52*	71,89 ± 4,15* ^{&#}
ANV+ -клітини, %	3,56 ± 0,18	4,02 ± 0,16	7,23 ± 0,51*	12,17 ± 1,05* ^{&#}
PI+ -клітини, %	1,64 ± 0,10	2,05 ± 0,12	2,74 ± 0,17*	4,18 ± 0,28* ^{&#}
Кількість клітин зі зниженим мітохондріальним транс-мембранним потенціалом, %	1,65 ± 0,15	1,84 ± 0,18	2,8 ± 0,2*	4,62 ± 0,36* ^{&#}
Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контролем ($p<0,05$); & – зміни достовірні порівняно з показниками тварин, яким вводили наночастинок ZnO ($p<0,05$); # – зміни достовірні порівняно з групою тварин, яким вводили гліфосат ($p<0,05$).				

На відміну від групи тварин, які отримували наночастинок, введення щурам гліфосату у формі гербіциду раундапу в дозі 250 мг/кг маси тіла зумовило виражені зміни досліджуваних показників. Так, генерація активних форм кисню нейтрофілами крові достовірно (в 1,9 рази, $p<0,05$) зростала порівняно з показниками контрольної групи тварин. Під впливом гербіцидугліфосату в 1,7 рази ($p<0,05$) також зростала кількість нейтрофілів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом порівняно із показниками інтактних тварин.

Найбільш суттєві зміни показників зареєстровано у групі тварин, яким сумісно вводили наночастинки ZnO та гліфосат. У цьому випадку генерація активних форм кисню нейтрофілами крові була максимальною і в 3,1 раза ($p < 0,05$) перевищувала показники контролю. Також у 2,8 раза ($p < 0,05$) зростала кількість клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом порівняно з показниками контрольної групи тварин, що може якраз бути наслідком посиленого утворення АФО в клітинах (табл. 3.5). Важливо зазначити, що у групі тварин, яким вводили комбінацію наночастинок і гліфосату, досліджувані показники були достовірно вищими як порівняно з тваринами, які отримували тільки наночастинки, так і з щурами, яким вводили тільки гліфосат. Зокрема, у IV групі тварин нейтрофіли крові генерували активні форми кисню в 3,8 раза ($p < 0,05$) інтенсивніше, ніж нейтрофіли щурів, яким вводили протягом двох тижнів наночастинки. На той факт, що наночастинки посилюють токсичний ефект гліфосату вказує підвищення в 1,7 раза ($p < 0,05$) інтенсивності продукції активних форм кисню нейтрофілами крові тварин IV групи порівняно з групою тварин, яким вводили тільки хімічний токсикант.

Кількість клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом у щурів IV групи була в 2,5 раза більшою ($p < 0,05$), ніж у щурів, яким вводили тільки наночастинки. Даний показник у тварин, що зазнавали впливу комбінації засобів, був в 1,7 раза більшим ($p < 0,05$), ніж такий у щурів після двохтижневої інтоксикації гліфосатом, що ще раз підтверджує потенціуючий вплив наночастинок на токсичний ефект гербіциду.

Після введення дослідним тваринам наночастинок ZnO досліджувана клітинна популяція нейтрофілів характеризувалася переважно живими і невеликою кількістю апоптичних і некротичних клітин – підвищення вмісту PI+ і ANV+ нейтрофілів периферійної було незначним і дані показники статистично не відрізнялися від таких у контрольних тварин (див. табл. 3.5).

На відміну від групи щурів, які отримували наночастинки, введення гербіциду гліфосату в дозі 250 мг/кг маси тіла тварин викликало достовірні зміни показників вираженості апоптозу і некрозу гепатоцитів. Так, рівень PI⁺-клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, перевищував показник норми в 1,6 раза ($p < 0,05$). Відсоток ANV⁺ нейтрофілів, який відповідає за ранній апоптоз, перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин у 1,9 раза ($p < 0,05$).

Найбільшою мірою інтенсивність процесів апоптозу і некрозу нейтрофілів крові підвищувалася у щурів, яким вводили наночастинки оксиду цинку разом з гліфосатом. У тварин цієї групи відсоток PI⁺ клітин перевищував норму в 2,5 раза ($p < 0,05$), а відсоток ANV⁺ нейтрофілів – у 3,4 раза ($p < 0,05$).

Як і у випадку з показниками, що характеризують інтенсивність утворення АФО і кількість клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, відсотки PI⁺ і ANV⁺ нейтрофільних лейкоцитів у групі тварин, які піддавалися комбінованому впливу наночастинок і хімічного токсину, були достовірно вищими порівняно з такими у щурів, яким вводили тільки гліфосат. Інтенсивність раннього апоптозу (ANV⁺-нейтрофіли) у щурів IV групи перевищувала аналогічні значення у щурів, яким вводили самі наночастинки, у 3,0 раза ($p < 0,05$). Порівняно з III групою тварин даний показник при комбінованому впливі досліджуваних засобів підвищувався в 1,7 раза ($p < 0,05$).

При вивченні рівня PI⁺ клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, у тварин IV групи спостерігалось його підвищення у 2,0 раза ($p < 0,05$) порівняно зі щурами, яким вводили тільки наночастинки. Даний показник у тварин IV групи перевищував аналогічний у щурів, що зазнавали впливу тільки гліфосату, в 1,5 раза ($p < 0,05$).

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що наночастинки оксиду цинку посилюють здатність хімічного токсиканта гліфосату стимулювати

утворення активних форм кисню в нейтрофілах крові, підвищувати кількість клітин зі знизеним мітохондріальним трансмембранним потенціалом, а також стимулювати апоптичні і некротичні процеси в нейтрофілах.

3.6 Функціональний стан ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків у тварин при дії наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату

Існують роботи, які показують, що наночастинок різної природи здатні проникати через клітинні мембрани і взаємодіяти з мембранами ендоплазматичного ретикулуму, призводячи до порушення функціонування асоційованих з ними ферментних систем. За умов введення щурам суспензії наночастинок оксиду цинку у дозі 100 мг/кг спостерігалось достовірно (в 1,9 раза, $p < 0,05$) підвищення в мікросомальній фракції печінки активності етоксирезоруфін О-деетилази – неспецифічної монооксигенази фази I біотрансформації ксенобіотиків. Активність ще одного мікросомального ферменту УДФ-глюкуронілтрансферази, який каталізує процес глюкуронування сторонніх речовин у II фазі детоксикації, під впливом наночастинок також достовірно (в 1,4 раза, $p < 0,05$) підвищувалася порівняно з контролем (рис. 3.5, 3.6).

В той же час наночастинок ZnO не справили достовірного впливу на активність глутатіонтрансферази, яка належить до ензимів II фази детоксикації ксенобіотиків та бере участь в знешкодженні токсичних речовин різних хімічних класів, зокрема поліароматичних вуглеводнів, а також включається у захист тканин від наслідків «кисневого вибуху», інактивуєчи вторинні метаболіти оксидативного стресу.

Внутрішньошлункове введення тваринам гліфосату у дозі 250 мг/кг призвело до виражених змін в активностях ферментів метаболізму ксенобіотиків. Так, в даній групі спостерігалось різке підвищення в

мікросомальній фракції печінки активності етоксирезорурфін О-деетилази (у 2,6 раза, $p < 0,05$) та УДФ-глюкуронілтрансферази (в 1,8 раза, $p < 0,05$) через 2 тижні після застосування токсиканта. Активність глутатіонтрансферази, навпаки, достовірно зменшувалася порівняно з контролем (в 1,8 раза, $p < 0,05$) (рис. 3.5, 3.6, 3.7).

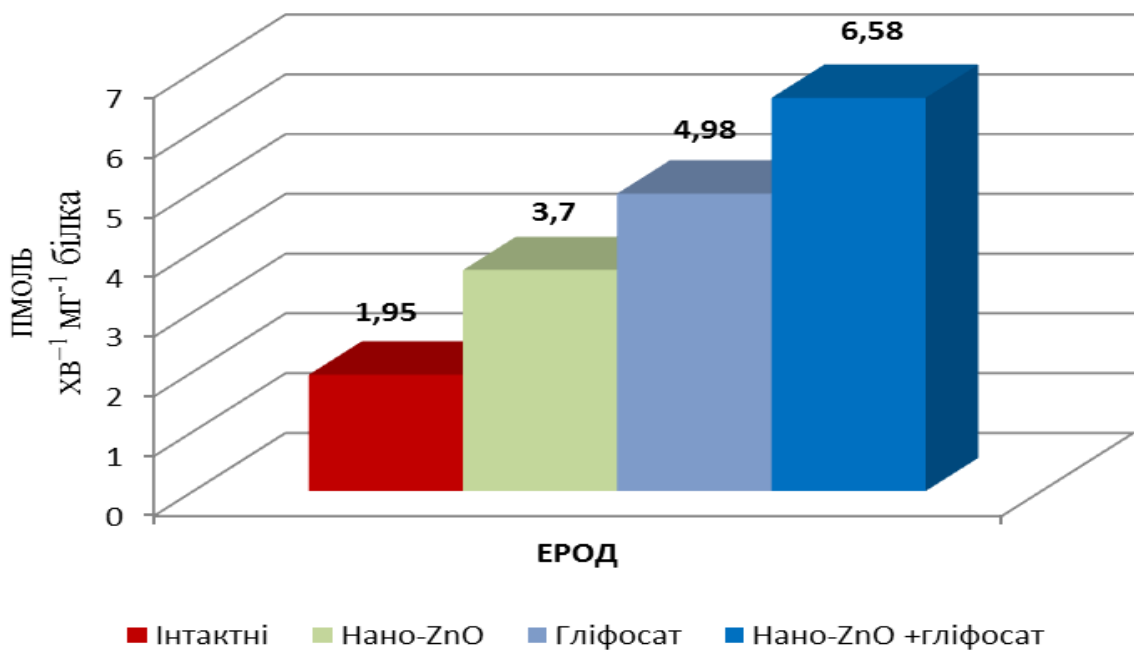


Рисунок. 3.5 – Зміна активності етоксирезорурфін О-деетилази при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату

Максимальні зміни показників функціонування активності ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків зафіксовано у тварин, яким вводили гліфосат разом з наночастинками оксиду цинку.

Як видно з результатів досліджень (див. рис. 3.5, 3.6, 3.7.), в тварин ІV групи через 14 днів після початку експерименту активність ЕРОД та УДФ-глюкуронілтрансферази підвищувалася в 3,4 та 2,5 раза ($p < 0,05$) порівняно з інтактними щурами.

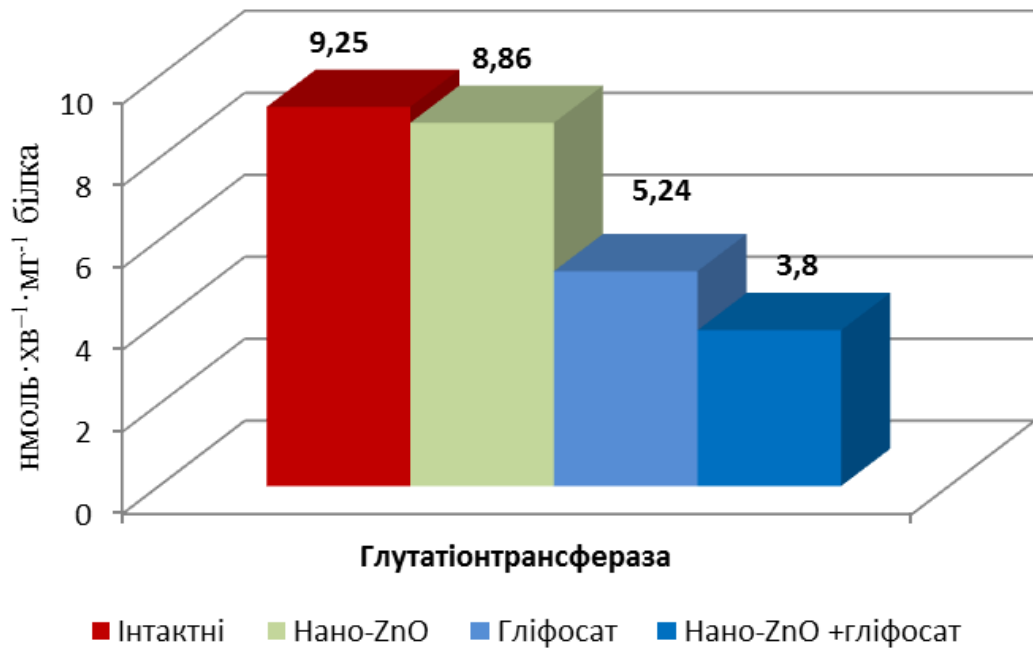


Рисунок. 3.6 – Зміна активності глутатіонтрансферази при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату

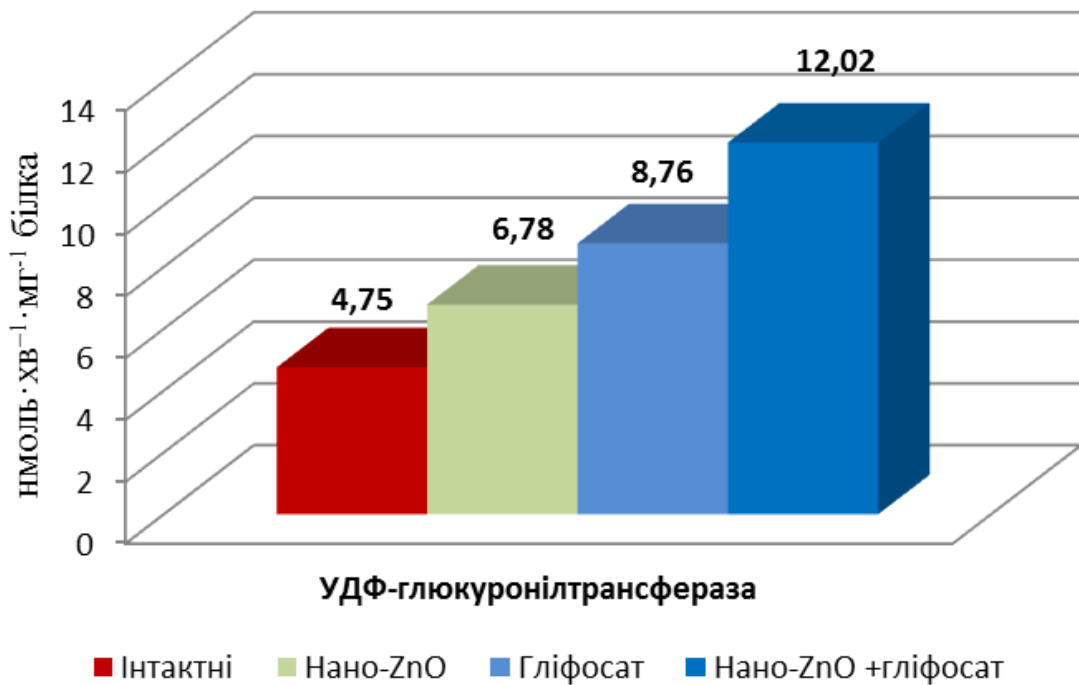


Рисунок. 3.7 – Зміна активності УДФ-глюкоронілтрансферази при дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату.

При цьому необхідно відмітити, що комбінація досліджуваних засобів стимулювала активність даних ферментів у достовірно більшому ступені, ніж самі наночастинки чи сам гліфосат. Зокрема, у тварин IV групи активність ЕРОД була в 1,8 і 1,3 раза вищою порівняно з такими показниками відповідно у II і III групах тварин ($p < 0,05$ в обох випадках). Активність УДФ-глюкуронілтрансферази у щурів, яким сумісно вводили наночастинки і гербіцид, була вищою порівняно з тваринами, яким вводили тільки наночастинки або тільки гліфосат, відповідно в 1,8 і 1,4 раза ($p < 0,05$ в обох випадках).

Активність ферменту глутатіонтрансферази в печінці щурів IV групи суттєво пригнічувалася на 15-у добу експерименту. Як і у випадку з ЕРОД та УДФ-глюкуронілтрансферазою, активність глутатіонтрансферази під впливом комбінації досліджуваних засобів була достовірно зміненою порівняно з такою у щурів, яким вводили тільки наночастинки чи тільки гліфосат. Відомо, що глутатіонтрансфераза є також компонентом антиоксидантного захисту. Тому зафіксоване нами зменшення активності даного ферменту в значно більшому ступені в щурів, яким вводили гліфосат разом з наночастинками оксиду цинку, у порівнянні з тваринами, які піддавалися впливу тільки гліфосату, підтверджують наведені вище дослідження щодо глибокого порушення функціонування антиоксидантної системи при поєднаній дії на організм наночастинок і ксенобіотика.

Аналіз одержаних результатів свідчить про виражені функціональні зміни ферментних систем I та II фази детоксикації ксенобіотиків при попаданні в організм хімічного токсиканта гліфосату разом з наночастинками оксиду цинку. Такий синергізм токсичних ефектів досліджуваних чинників може бути зумовлений, крім полегшення транспорту токсину до тканин і в клітини, тим, що наночастинки можуть змінювати метаболічні шляхи в ендоплазматичному ретикулумі, призводячи до токсифікації ксенобіотиків хімічної природи.

Отже, наночастинки оксиду цинку потенціюють токсичний вплив хімічного токсиканта гліфосату на систему біотрансформації ксенобіотиків.

Узагальнюючи результати наведених у цьому розділі власних досліджень, можна зробити такі висновки:

1. Інтрагастральне введення щурам наночастинок оксиду цинку у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом двох тижнів призводить до достовірного зростання в сироватці крові активності ферментів-маркерів цитолізу гепатоцитів – аланін- і аспаратамінотрансфераз і не викликає змін синтетичної і екскреторної функцій печінки. Введення тваринам гербіциду гліфосату призводить як до вираженого цитолітичного синдрому, так і до погіршення синтетичної і екскреторної функцій печінки та нирок (достовірно змінюються показники лужної фосфатази, вмісту загального білка, білірубину, сечовини і креатиніну в крові). Наночастинки оксиду цинку посилюють показники токсичної дії гліфосату на печінку (достовірно зростає активність АлАТ, АсАТ, ЛФ і вміст білірубину порівняно з аналогічними показниками у тварин, яким вводили тільки гербіцид).

2. Наночастинки оксиду цинку викликають прискорення окислювальних процесів в сироватці крові і печінці тварин (спостерігаються достовірні зміни показників інтенсивності процесів ліпопероксидації та показників інтенсивності окислювальної модифікації білків) і пригнічення більшості компонентів системи антиоксидантного захисту. Оксидативний стрес є важливим патогенетичним механізмом негативного впливу гербіциду гліфосату на тканини організму. Найбільш суттєво досліджувані показники оксидативного стресу проявляються у тварин, яким вводили наночастинки ZnO сумісно з гліфосатом (у цьому випадку досліджувані показники були достовірно вищими порівняно як з групою тварин, яким вводили самі наночастинки, так і з групою, якій вводили тільки гербіцид).

3. Як введення тваринам наночастинок оксиду цинку, так і застосування гербіциду гліфосату призводить до розвитку

нітрооксидативного стресу – в крові і тканині печінки достовірно збільшується загальна активність NO-синтази і вміст кінцевих продуктів обміну оксиду азоту – нітратів і нітритів. Сумісне введення щурам наночастинок оксиду цинку і гліфосату достовірно посилює інтенсивність продукції NO (зростає активність NO-синтази і вміст NO_x порівняно з аналогічним показником у тварин, яким вводили тільки наночастинок чи тільки хімічний токсикант).

4. Застосування наночастинок оксиду цинку не впливає достовірно на цитокиновий профіль експериментальних тварин. При введенні гербіциду гліфосату виникає цитокиновий дисбаланс – рівень прозапальних цитокинів в сироватці крові суттєво підвищується. Наночастинок оксиду цинку потенціюють негативний вплив гліфосату на цитокиновий профіль тварин – концентрація ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 достовірно підвищується, а ІЛ-4 та ІЛ-10 знижується порівняно з відповідними показниками у тварин, яким вводили тільки гліфосат.

5. Введення щурам наночастинок оксиду цинку протягом двох тижнів не впливає на генерацію активних форм кисню нейтрофілами крові, мітохондріальний трансмембранний потенціал та інтенсивність апоптичних і некротичних процесів в нейтрофілах крові. Введення щурам гербіциду гліфосату достовірно посилює генерацію активних форм кисню нейтрофілами, збільшує кількість нейтрофілів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, підвищує кількість клітин, що загинули за рахунок апоптозу та некрозу. Наночастинок оксиду цинку посилюють здатність гліфосату підвищувати продукцію внутрішньоклітинних активних форм кисню, кількість клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, а також апоптично та некротично змінених нейтрофілів крові.

6. Внутрішньошлункове введення тваринам наночастинок оксиду цинку призводить до достовірних змін активності ферментів метаболізму

ксенобіотиків I і II фази – етоксирезорурфін-О-деетилази і УДФ-глюкуронілтрансферази. У мікросомній фракції гепатоцитів тварин, яким вводили хімічний токсикант толуол, активність даних ферментів підвищується у ще більшому ступені, а також достовірно знижується активність глутатіонтрансферази. У найбільшому ступені зміни показників функціонування ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків спостерігаються у тварин, яким вводили наночастинки сумісно з гліфосатом.

Результати розділу опубліковані у наукових працях автора [212-220]

РОЗДІЛ 4

ГІСТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ, НИРОК ТА СЕЛЕЗІНКИ ТВАРИН ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ ТА ГЕРБІЦИДУ ГЛІФОСАТУ

4.1 Мікроскопічні зміни печінки щурів за умов введення наночастинок оксиду цинку і гліфосату

Печінка лабораторних тварин контрольної групи утворена часточками, які мають правильну гексагональну форму, утворені із радіально розміщених печінкових балок, що формують анастомозуючі між собою тяжі гепатоцитів, які радіально збираються в центрі часточки в напрямку до центральної вени (рис. 4.1).

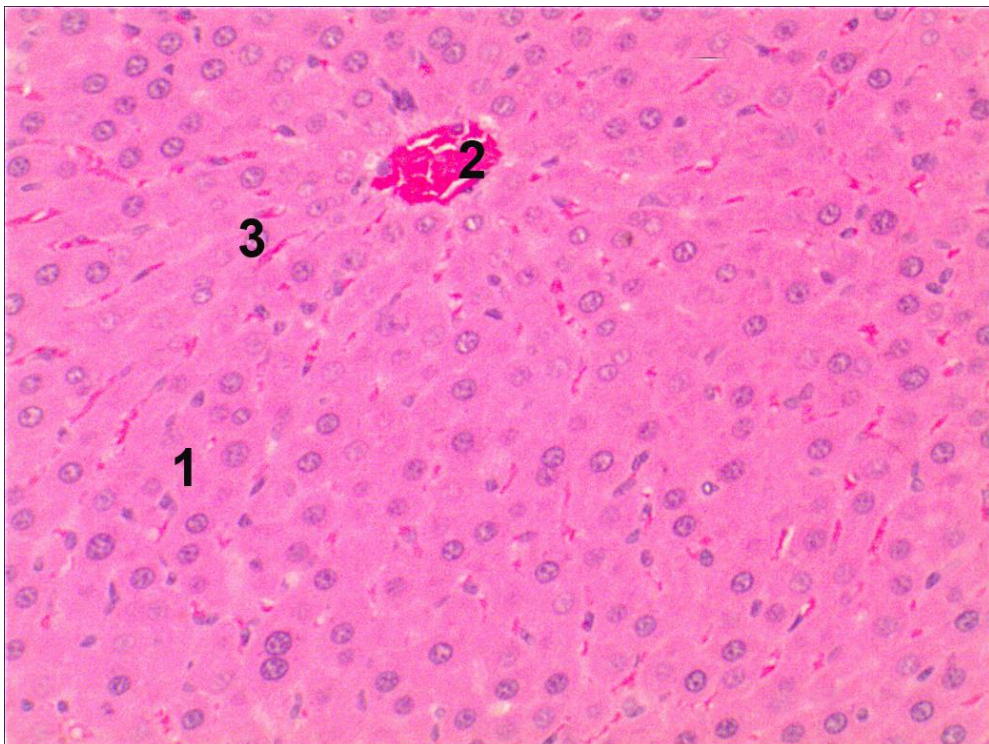


Рисунок 4.1 – Мікроскопічна організація печінки контрольної групи тварин.

Часточково-балкове розміщення гепатоцитів (1), центральна вена (2),
синусоїди (3). Зabarвлення гематоксиліном еозином. x 200

Між балками наявні синусоїдні гемокапіляри, стінка яких вистелена плоскими ендотеліальними клітинами, між якими, як і в в проторі Діссе, наявні макрофаги – клітини Купфера.

В центрі часточок спостерігаються центральні вени, частина яких заповнена форменими елементами крові. Оскільки в печінці лабораторних щурів сполучна тканина розвинена погано, то контури між часточками нечітко виражені.

Виявлено, що більшість гепатоцитів одноядерні, містять рівномірно забарвлене ядро і гомогенну оксифільну цитоплазму. В невеликій кількості також виявляються двоядерні гепатоцити. Між часточками виявляються типові тріади, що утворені міжчасточковою артерією, веною та жовчною протокою (див. рис. 4.1).

Проведене мікроскопічне вивчення препаратів печінки тварин, яким вводили наночастинки оксиду цинку, показало, що в органі наявні незначні пристосувальні зміни судинного та паренхіматозного компонентів (рис. 4.2).

Гепатоцити містили округлі ядра з чіткими каріолемами та грудками гетерохроматину, ядерця визначалися рідко. Дискомплектація гепатоцитів в часточці виявлялася на невеликих ділянках, переважно в перипортальних зонах. Візуалізувались поодинокі двоядерні гепатоцити, а також клітини із фігурами мітозу.

Синусоїди мали переважно вузький просвіт, з нечисленими форменими елементами крові в просвітах. Зростання макрофагальної реакції не виявлялося. В периваскулярному просторі ділянки портальних трактів визначався незначний набряк пухкої волокнистої сполучної тканини. Лейкоцитарна інфільтрація також не визначалася (рис. 4.2).

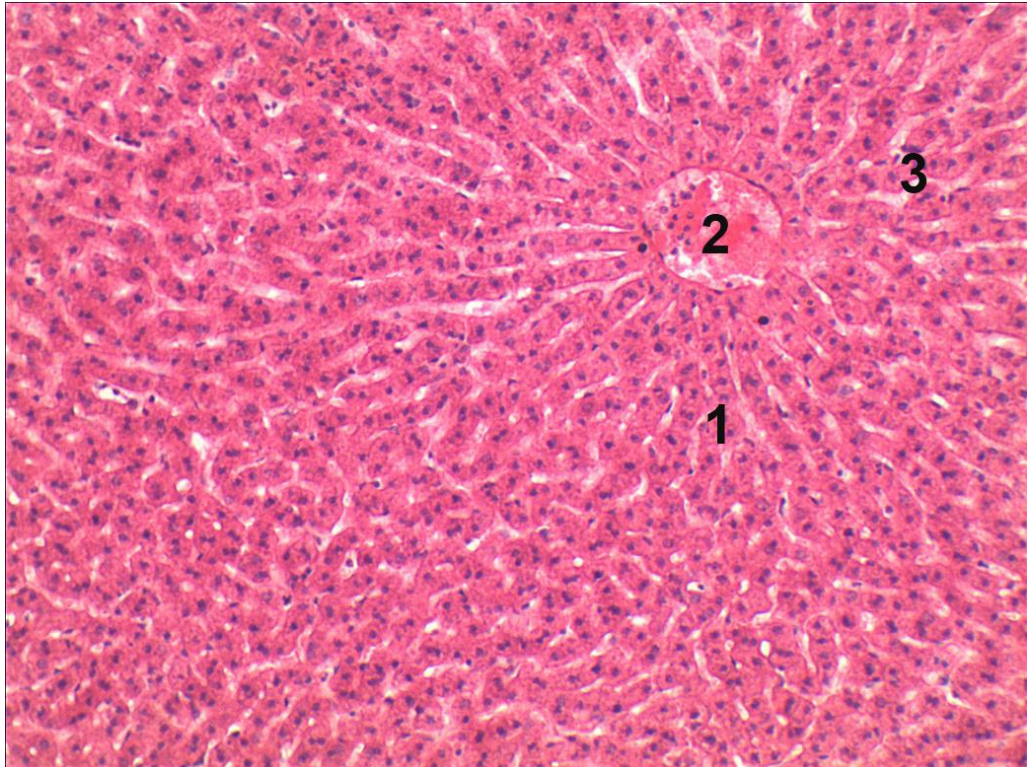


Рисунок 4.2 – Мікроскопічні зміни печінки тварини в умовах застосування наночастинок оксиду цинку. Балки гепатоцитів (1), центральна вена (2), синусоїдні капіляри (3). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 200

Мікроскопічне вивчення гістологічних препаратів печінки тварин третьої групи, яким вводили токсикант гліфосат, показало судинні розлади та порушення гістоархітектоніки органу (рис. 4.3).

Вени органу мали розширені, повнокровні просвіти, нечітко контуровану або фрагментовану стінку. Міжчасточкові артерії в складі триад, навпаки, мали вузький, спазмований просвіт, потовщену медію із набряклими гладкими м'яцями. В набряклій периваскулярній та перидуктальній сполучній тканині ділянки триад визначалися невеликі гістолейкоцитарні інфільтрати. Впорядковане, балкове розміщення гепатоцитів органу було порушене по всій площі часточок.

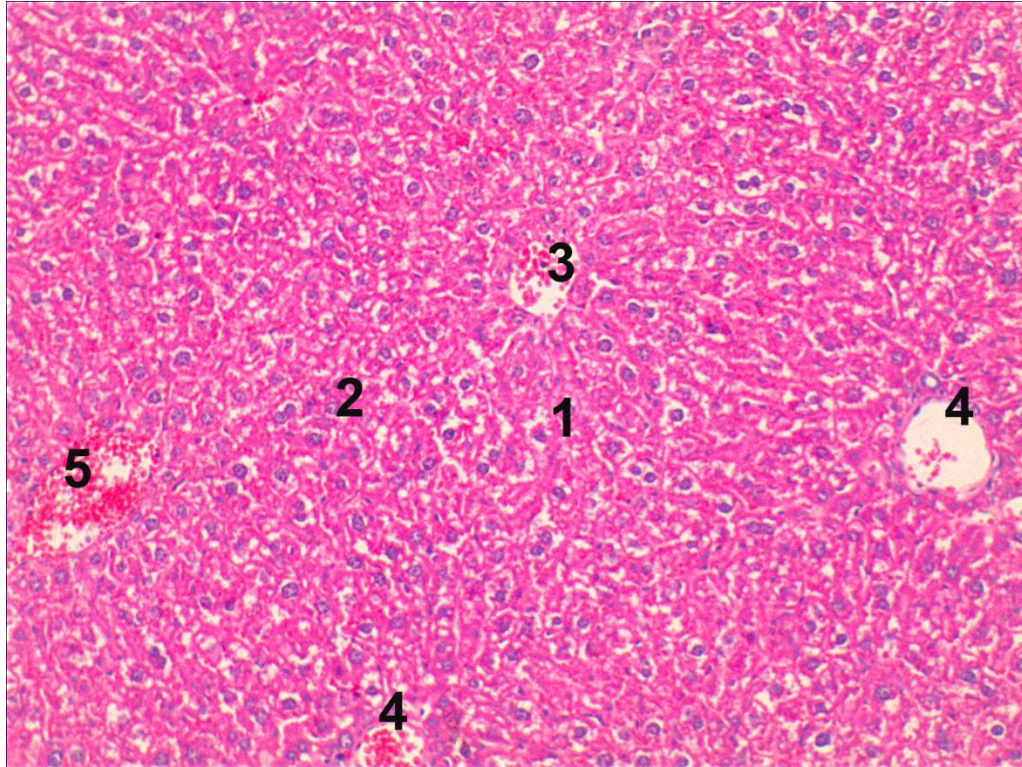


Рисунок 4.3 – Мікроскопічні зміни печінки тварини за умов експериментального введення гліфосату. Дискомплексація балок гепатоцитів часточок печінки (1), деструкція і дистрофія гепатоцитів (2), центральна вена (3), триади (4), підчасточкова вена (5). Забарвлення гематоксиліном і еозином. x 200

Ядра гепатоцитів були переважно гіперхромні, ядерця не визначалися, каріолеми були нечітко контуровані. Рідко визначалися двоядерні гепатоцити.

Цитоплазма клітин просвітлена або слабо оксифільна, в ній наявні ознаки вакуольної дистрофії. Спостерігається зростання числа активованих клітин Купфера в стінці синусоїдних капілярів та перисинусоїдному просторі Діссе. Синусоїди були розширені, переважно повнокровні із явищами тромбозу та сладж феномену еритроцитів. Ендотеліоцити мали плоску форму із інтенсивно базифільними ядрами, інколи випинались в просвіт гемокапіляра (див. рис. 4.3).

Мікроскопічне вивчення гістологічних препаратів печінки тварин 4 групи, яким одночасно вводили токсикант гліфосат та наночастинки оксиду цинку, показало, що в органі наявні найбільш виражені запальні та деструктивно-дегенеративні зміни усіх структурних компонентів, що відбувались на тлі судинних розладів (рис. 4.4).

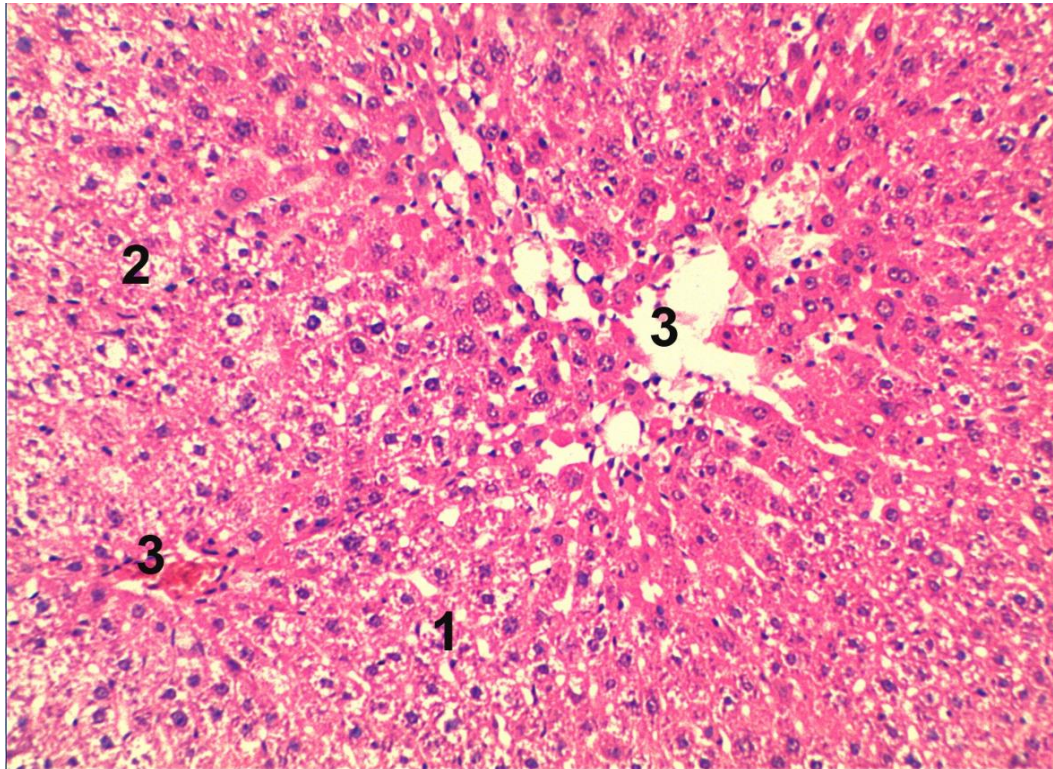


Рисунок 4.4 – Гістологічні зміни печінки тварини при введенні гліфосату та наночастинок оксиду цинку. Дисконтактація печінкових балок (1), дистрофічно-некротичні зміни гепатоцитів (2), ділянка лізису гепатоцитів (3), центральна вена з пошкодженою стінкою (4). Збарвлення гематоксиліном і еозином. x 200

Дисконтактація гепатоцитів в складі часточки значна, їх плазмолеми були нечіткими, міжклітинні контакти були порушені. Цитоплазма клітин була просвітленою, зернистою, що вказує на наявність білкової дистрофії. Також в цитоплазмі частини клітин виявлялися жирові включення.

Для ядер характерні некробіотичні зміни, більшість із них були пікнотичні, гіперхромні, інтенсивно базофільні. Мітози практично не виявлялися. Переважно централобулярно виявлялося зростання числа клітин Купфера в ділянках лізису некротизованих гепатоцитів. Центральні та підчасточкові вени були повнокровними, виявлялося пошкодження стінки. Синусоїди переважно мали вузькі просвіти, позбавлені формених елементів крові, пошкодженій ендотелій.

В перипортальних ділянках виявлялися діapedезні крововиливи. В ділянках портальних трактів виявлялись об'ємні гістолейкоцитарні інфільтрати. Міжчасточкові вени також були повнокровними, артерії були спазмованими, з потовщеною, деструктуризованою стінкою (див. рис. 4.4).

4.2 Мікроскопічні зміни нирки щурів за умов введення наночастинок оксиду цинку та гліфосату

При мікроскопічному вивченні нирок лабораторних щурів інтактної групи встановлено, що орган має типову будову паренхіматозного органу. Паренхіма складається із ниркових тілець, звивистих та прямих канальців, тонких канальців та збірних проток або трубочок. Канальці вистелені одношаровим кубічним або призматичним епітелієм, що лежить на базальній мембрані. Строма представлена слабо розвиненою інтерстиційною, сполучною тканиною. Кіркова речовина утворена нирковими (Мальпігієвими) тільцями, що складаються із судинного клубочка та двостінної капсули Шумлянського-Боумена, звивистими і прямими проксимальними та дистальними канальцями (рис. 4.5).

Мікроскопічне вивчення препаратів нирки лабораторних тварин, яким вводили наночастинок оксиду цинку, показало реактивні зміни судинного русла органу, що характеризувались незначним повнокров'ям судинних

клубочків та перитубулярної капілярної сітки (рис. 4.6). Вени кіркової та мозкової речовини також були повнокровними.

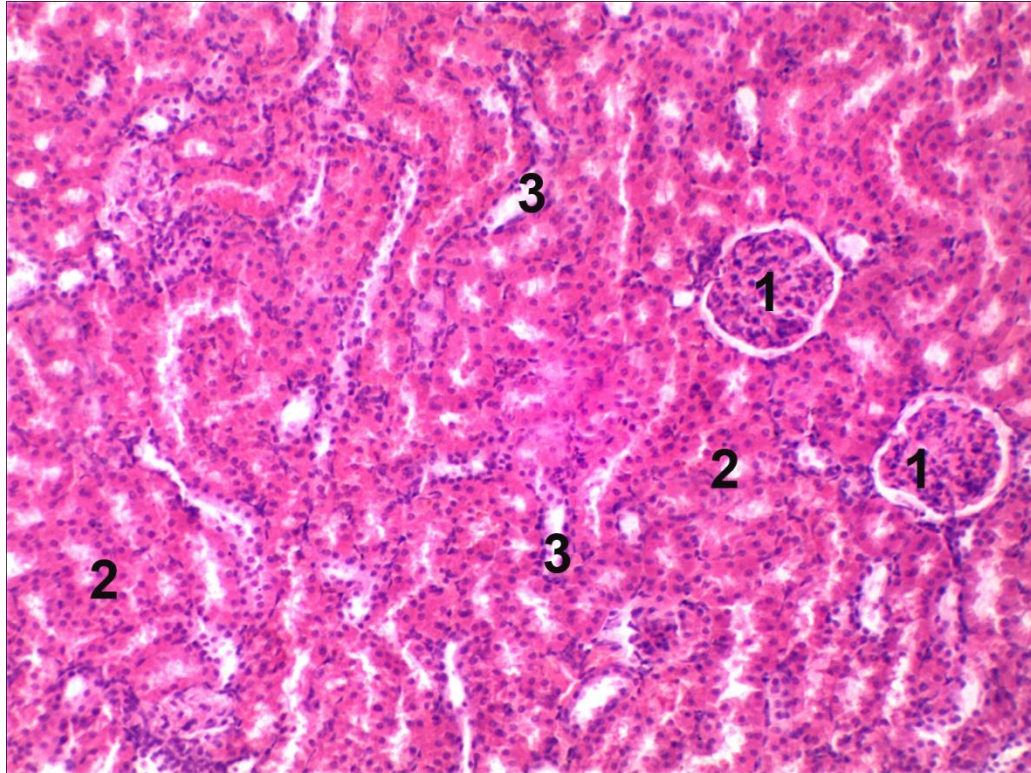


Рисунок 4.5 – Структурна організація кіркової речовини нирки інтактної групи тварин. Ниркові тільця (1), проксимальні (2) і дистальні ниркові канальці (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. x 200

В більшості полів зору ниркові тільця мали незмінену гістоструктуру, проте деякі з них були гіпертрофованими, переважно за рахунок повнокров'я, рідше у зв'язку з розширенням просвіту капсули. Нефроцити канальців мали помірно набряклу цитоплазму, однак плазмолемі мали чіткі контури мембран. Оксифілія проксимальних канальців дещо знижувалася, ядра епітеліоцитів були помірно базофільними. Спостерігалось розширення просвітів дистальних канальців.

Гістологічне вивчення препаратів нирок 3 експериментальної групи тварин, яким моделювали ураження введенням гліфосату, показало наявність альтеративних та дистрофічних змін паренхіматозних компонентів органу на

тлі значних судинних розладів кіркової і мозкової речовини (рис. 4.7). Для вен, особливо міжчасткових та дугових, характерні застійні процеси, гемостази. Дрібні артерії та артеріоли спазмовані, їх стінка потовщена. Наявний набряк периваскулярної сполучної тканини внаслідок плазматичного просякання стінки судин. Гемокапіляри судинних клубочків були переважно повнокровними. В перитубулярних капілярах визначалися стази, сладжі. Ендотелій був локально деструктуризований, виявлялися десквамовані ендотеліоцити.

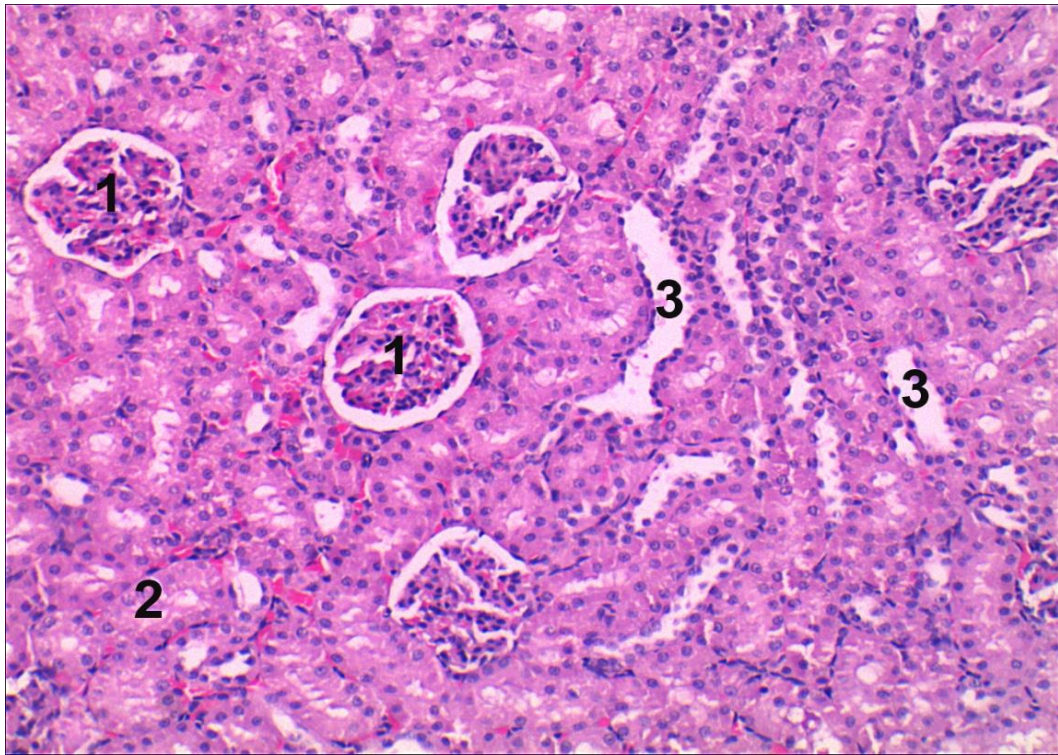


Рисунок 4.6 – Мікроскопічні зміни нирки тварини за умов введення наночастинок оксиду цинку. Ниркові тільця (1), проксимальні канальці (2), розширені дистальні канальці (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. x 200

Ниркові тільця кіркової речовини були переважно гіпертрофовані за рахунок повнокров'я капілярів судинних клубочків, набряку та проліферації мезангію. В таких ниркових тільцях значно звужувався або не візуалізувався

просвіт капсули Шумлянського-Боумена. Виявляються також деформовані ниркові тільця внаслідок їх гіпо- або атрофії.

Для епітеліоцитів проксимальних канальців нефрона характерний набряк та просвітлення цитоплазми, її вакуоляризація, що свідчить про наявність гідропічної дистрофії. Плазмолемні клітин були нечіткими, погано контурувалися. Втрачалася полярна диференціація епітеліоцитів, гіперхромні та пікнотичні ядра зміщувались до апікального полюсу. Щіточкова облямівка епіліоцитів в більшості полів зору була десквамована або фрагментована. Для дистальних канальців характерне розширення просвітів, набряк та дистрофія нефроцитів (рис. 4.7).

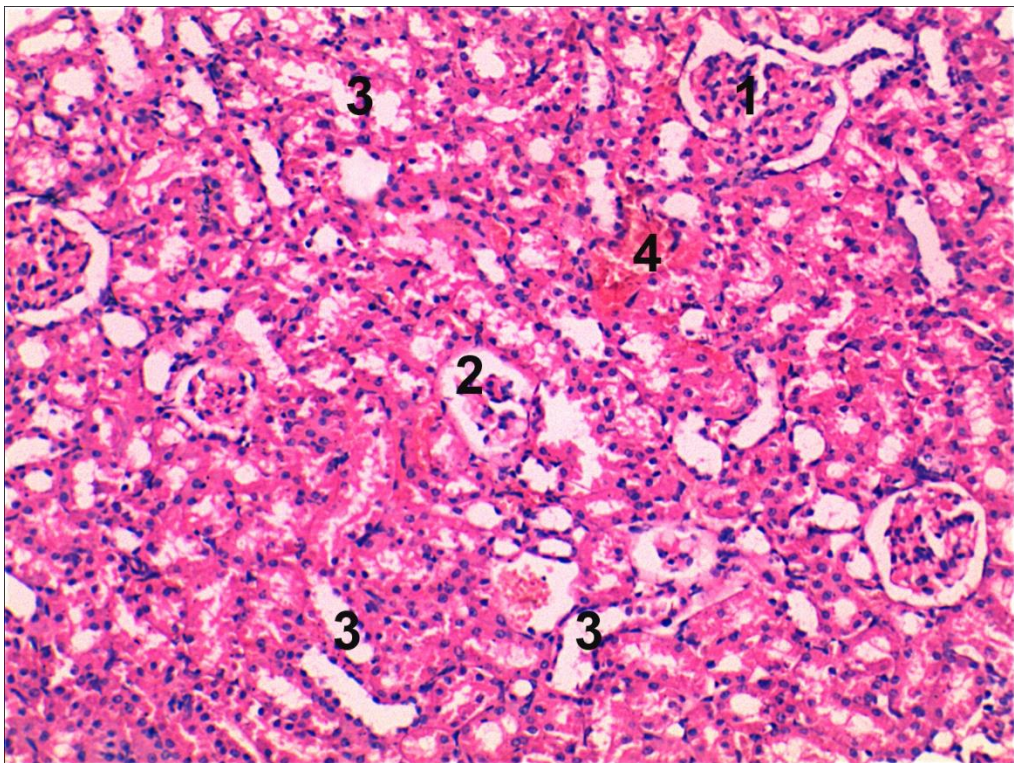


Рисунок 4.7– Мікроскопічні зміни нирки тварини за умов введення гліфосату. Деформовані ниркові тільця (1), дистрофічно змінені епітеліоцити канальців нефрона (2), розширені дистальні канальці (3), повнокровна венула (4). Забарвлення гематоксиліном і еозином. x 200

За умов поєднаного застосування гліфосату та наночастинок оксиду цинку мікроскопічно в нирках дослідних тварин встановлені найбільшого ступеня дегенеративні та запальні зміни, що відбувались на тлі гострого порушення кровообігу (рис. 4.8). Вени були переважно повнокровними із локально пошкодженою стінкою. Артерії органу мали паретично спазмовану стінку, на деяких ділянках значно витончену.

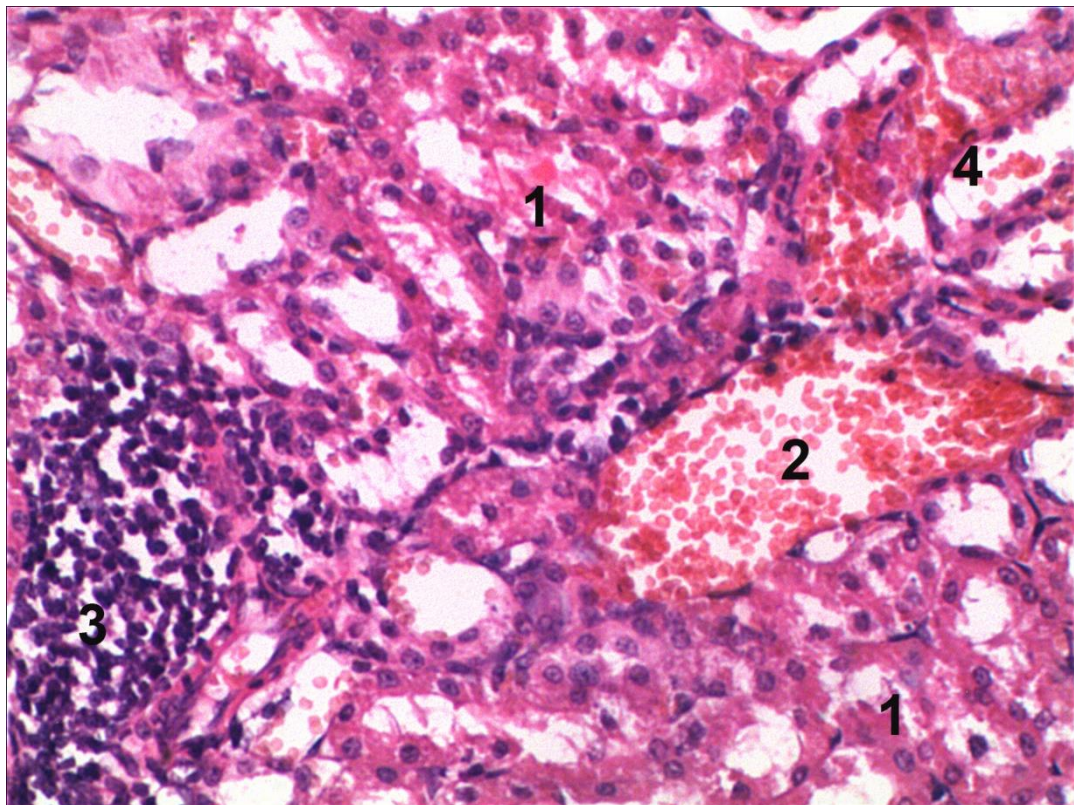


Рисунок 4.8 – Мікроскопічні зміни кіркової речовини нирки тварини за умов поєднаного застосування гліфосату та наночастинок оксиду цинку. Дистрофічно змінені нефроцити каналців нефронів (1), повнокровна вена (2), лейкоцитарний інфільтрат (3), геморагії (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 400

Ниркові тільця значно змінені, деформовані, окремі з них великі, гіпертрофовані, як за рахунок повнокров'я так і за рахунок набряку мезангію і проліферації мезангіальних клітин. В таких тільцях просвіт капсули був

тонкий, щілиноподібний або взагалі не візуалізувався. Також в частини ниркових тілець в просвітах капсули визначалися еритроцити.

В нефроцитах канальців нефрона наявний набряк цитоплазми із проявами гідропічної, білкової та інколи жирової дистрофії. Мембрани плазмолем були нечіткими, визначалася десквамація мікрворсинок щітчастої облямівки та значних частин апікального полюсу епітеліальних клітин, визначалася також десквамація окремих епітеліоцитів в просвіт канальців. Часто спостерігався клітинний детрит в просвіті канальців, що утворився переважно із десквамованих епітеліоцитів. Дистальні канальці були розширеними, а цілісність мембран плазмолем епітеліоцитів була порушеною.

Переважно периваскулярно та рідше осередково в кірковій речовині органу виявлялися досить великі запальні скупчення лейкоцитів та макрофагів. В кірковій речовині органу виявлялися дрібні та об'ємні геморагії (див. рис. 4.8).

4.3 Мікроскопічні зміни селезінки щурів за умов введення наночастинок оксиду цинку і гліфосату

Дослідження гістологічної організації селезінки щурів інтактної групи показали, що орган ззовні вкритий сполучнотканинною капсулою, від неї вглиб органу розгалужуються сполучнотканинні перегородки, що містять гладкі міоцити (рис. 4.9).

Ніжна строма утворена ретикулярною сіткою, а паренхіма – білою і червоною пульпою. Червона пульпа містить формені елементи крові, макрофаги, синусоїдними капілярами. Поміж венозними синусоїдами містяться пульпарні або селезінкові тяжі. Біла пульпа представлена скупченням лімфоїдної тканини, переважно це лімфатичними фолікулами селезінки, а також периартеріальними лімфоїдними піхвами. Лімфатичні

фолікули (вузлики) диференціюються на 4 зони: зона розмноження, периартеріальна, мантійна та крайова.

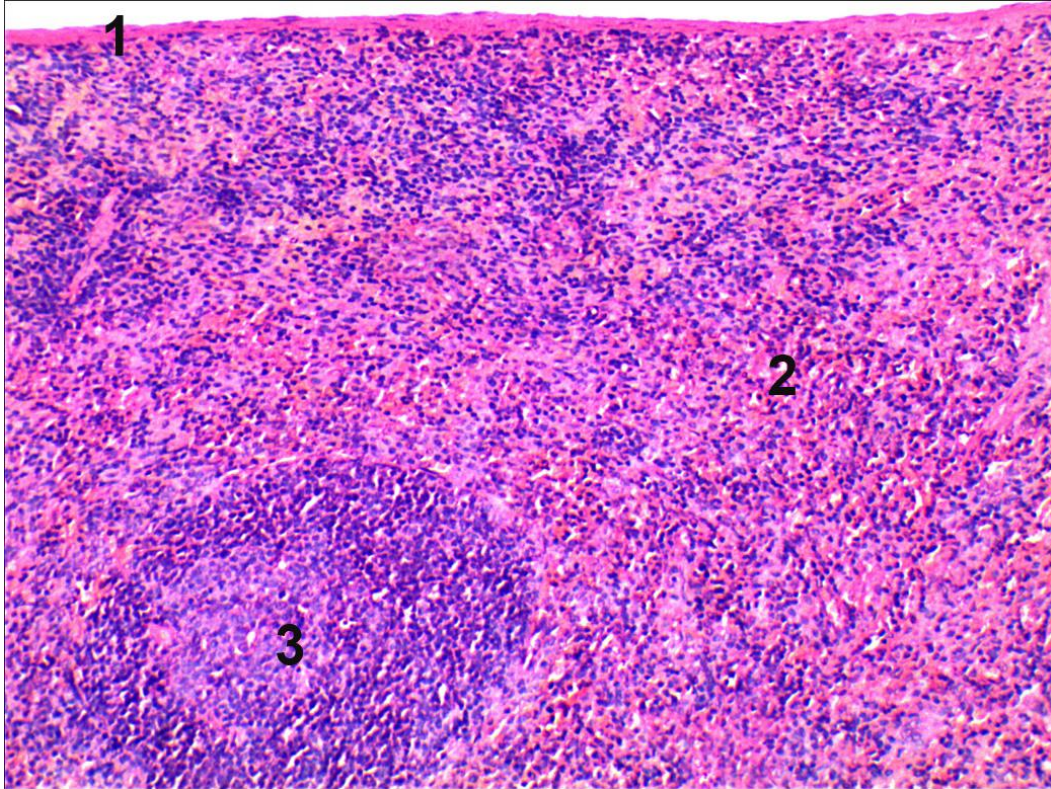


Рисунок 4.9 – Мікроскопічний стан селезінки щурів інтактної групи. Капсула (1), червона пульпа (2), лімфатичний фолікул білої пульпи (3). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100

Гістологічне вивчення препаратів селезінки лабораторних щурів, яким вводили наночастинки оксиду цинку, показало дисциркуляторні зміни органу, що проявлялося розширенням просвітів та повнокров'ям вен і венул червоної пульпи, трабекулярних вен, синусоїдів (рис. 4.10). Трабекулярні артерії, навпаки, були паретично спазмованими із набряклою стінкою.

Лімфатичні фолікули білої пульпи були гіперплазованими, зокрема збільшувався в об'ємі гермінативний центр, зональне розміщення лімфоцитів у складі фолікулів добре візуалізується.

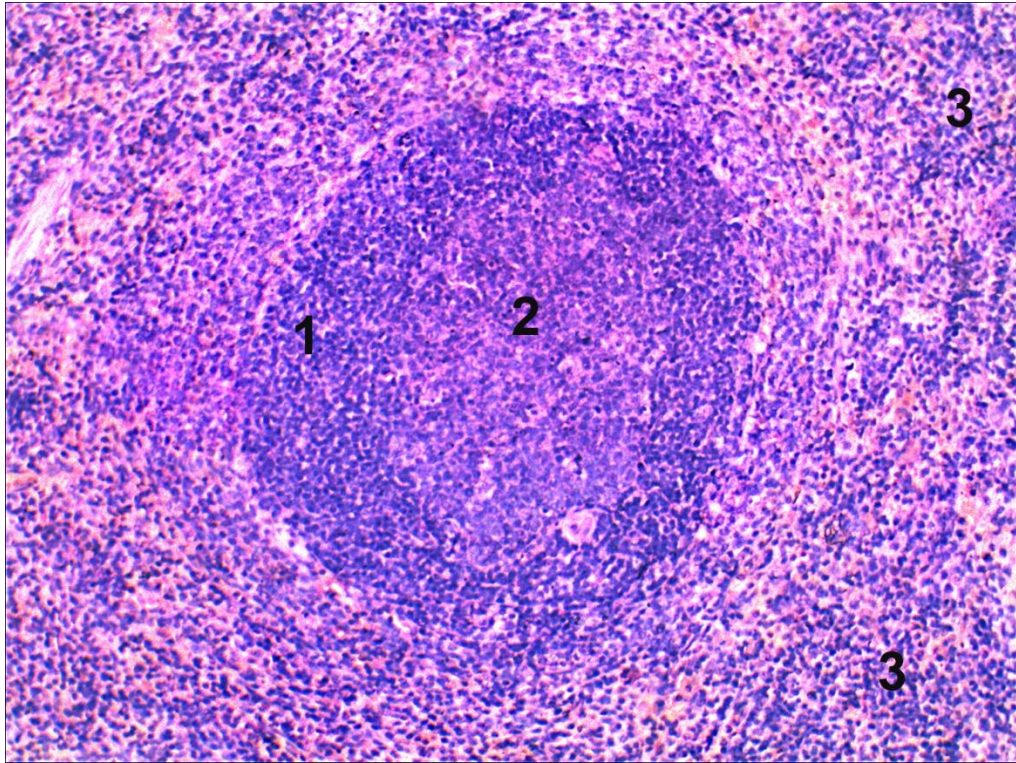


Рисунок 4.10 – Гістологічні зміни селезінки білих щурів за умов введення наночастинок оксиду цинку. Лімфатичний фолікул (1) із об’ємним гермінативним центром (2), висока щільність лімфоцитів в червоній пульпі органу (3). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 200

При мікроскопічному вивченні препаратів селезінки лабораторних щурів за умов введення гліфосату встановлено, що гермінативні центри фолікулів були досить об’ємними (рис. 4.11). Виявлено зміни структурної перебудови стромального компоненту органу із підвищеною гідратацією основної речовини сполучної тканини, ретикулярних та колагенових волокон переважно капсули та трабекул, в меншій мірі ретикулярної сітки білої та червоної пульпи за рахунок підвищеної проникності судинних стінок органу. Більшість судин органу були повнокровними із формуванням у їх просвітах сладжів та тромбів.

Деструктуризація білої пульпи проявлялася гіперплазією її компонентів, збільшенням площі, гермінативні центри фолікулів погано візуалізувалися, крайові зони мали великі площі, що імовірно пов’язано із

захисними, запальними реакціями, які спровоковані введенням тваринам цієї групи токсиканту гліфосату.

Активна проліферація лімфоцитів супроводжується їх щільним, пошаровим розміщенням в білій пульпі та міграцією в червону, зростає число дендритних клітин та типових макрофагів із включеннями грудок гемосидерину (рис. 4.11).

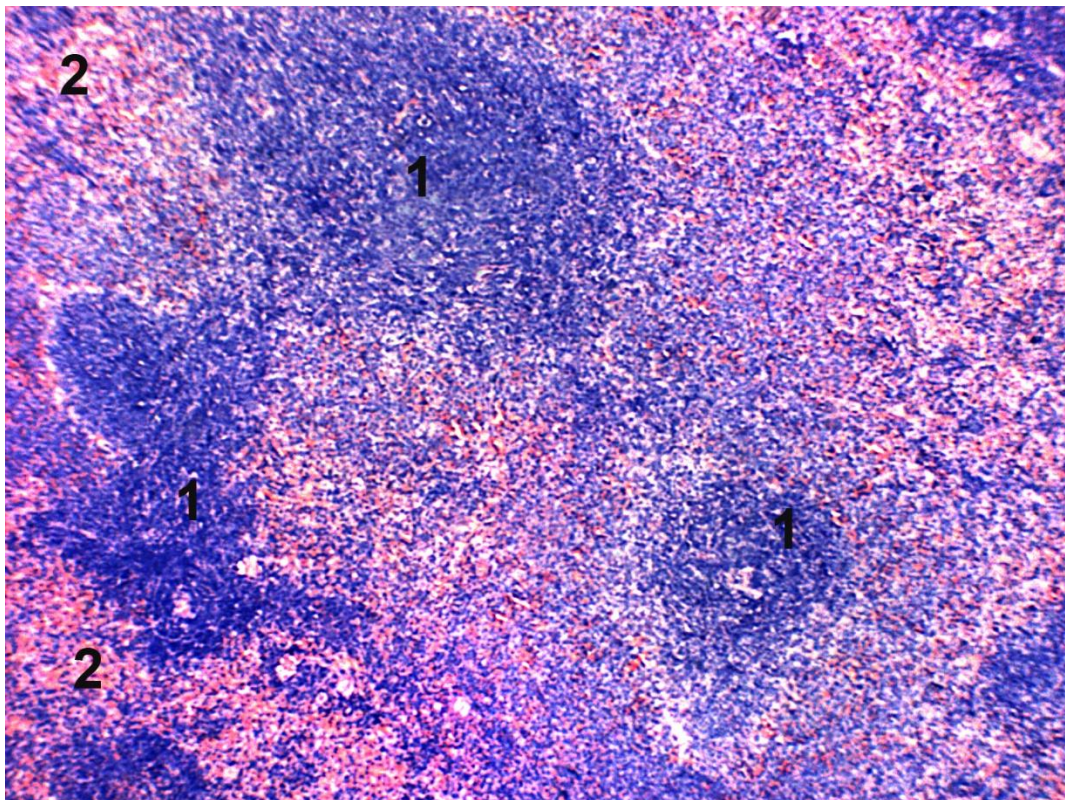


Рисунок 4.11 – Мікроскопічні зміни селезінки щурів за умов впливу гліфосату. Гіперплазія білої пульпи (1), кровонаповнення червоної пульпи (2). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 200

Гістологічне дослідження препаратів селезінки щурів за умов поєднаного застосування гліфосату та наночастинок оксиду цинку показало значні деструктивно-дегенеративні зміни структурних компонентів органу відносно усіх експериментальних груп (рис. 4.12).

Глибокі розлади кровообігу органу проявлялися набряком та потовщенням стінок артерій, зокрема центральних та пульпарних,

альтерацією гладких міоцитів медії, десквамацією ендотелію в просвіт судини. Вени були повнокровними, із вираженими складжами та тромбами у їх просвітах. Виявлялося патологічне депонування крові у синусах червоної пульпи органу та дрібні геморагії.

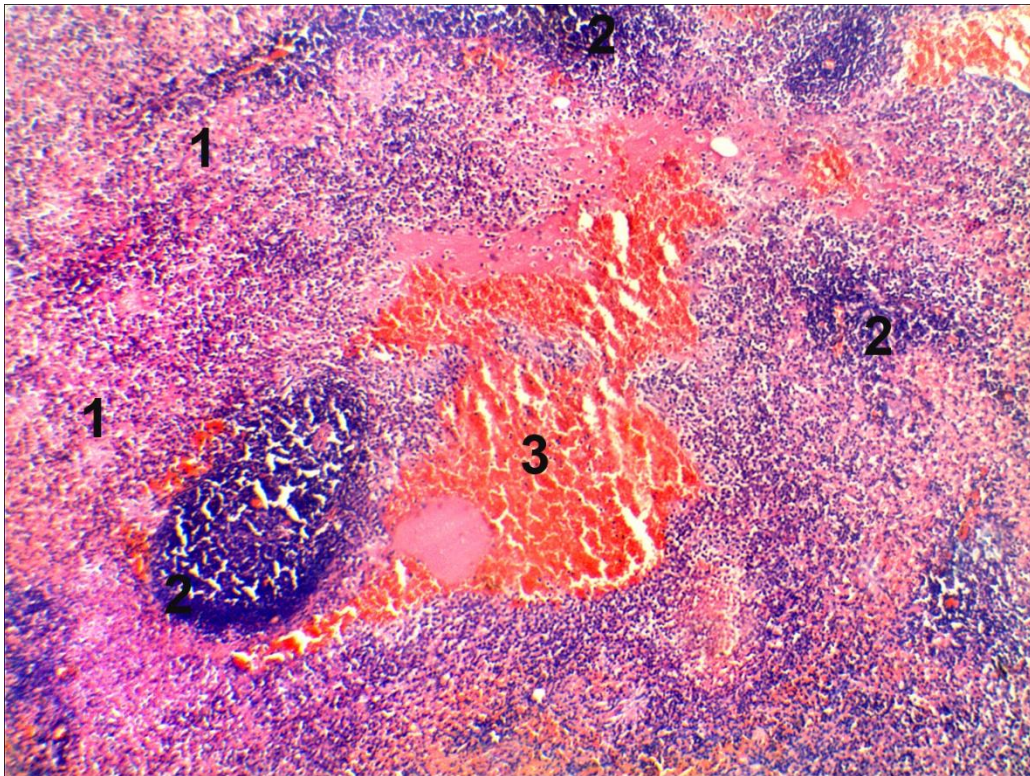


Рисунок 4.12 – Мікроскопічні зміни селезінки щурів за умов поєданого застосування гліфосату та наночастинок оксиду цинку.

Деструктуризована червона пульпа (1), гіперплазована біла пульпа (2), об'ємні геморагії червоної пульпи (3). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 200

Каркас органу представлений фрагментованими волокнами. Площа білої пульпи збільшується, проте вже не за рахунок збільшення гермінативних зон, а за рахунок збільшення мантийних та крайових, що свідчить про міграцію зрілих В-лімфоцитів в червону пульпу та в подальшому у периферійне кровоносне русло для забезпечення захисних імунних процесів в організмі тварин цієї дослідної групи (рис. 4.12).

Висновки.

1. Введення експериментальним тваринам наночастинок оксиду цинку призводить до незначних пристосувальних змін судинного та паренхіматозного компонентів печінки. Застосування гербіциду гліфосату викликає суттєві судинні розлади (розширення і повнокрів'я вен, спазмування просвітів міжчасточкових артерій, розширення синусоїдів із явищами тромбозу та сладж феномену еритроцитів, потовщення медії, набряк міоцитів) та порушення гістоархітекtonіки (порушення балкового розміщення гепатоцитів, гіперхромність ядер, втрата контурів каріолеми, ознаки вакуольної дистрофії цитоплазми) печінки. У тварин, яким одночасно вводили токсикант гліфосат та наночастинок оксиду цинку, спостерігаються найбільш виражені запальні та деструктивно-дегенеративні зміни усіх структурних компонентів печінки, що відбуваються на тлі судинних розладів.

2. Введення щурам наночастинок оксиду цинку призводить до реактивних змін судинного русла нирок, що характеризується незначним повнокров'ям судинних клубочків, перитубулярної капілярної сітки та вен кіркової і мозкової речовини. Гербіцид гліфосат викликає виражені альтеративні (гіпертрофія ниркових тілець, набряк та проліферація мезангію, звуження просвіту капсули, деформація ниркових тілець) та дистрофічні (гідропічна дистрофія епітеліоцитів проксимальних каналців, набряк та дистрофія нефроцитів) зміни паренхіматозних компонентів нирок на тлі значних судинних розладів (застійні процеси, гемостази у венах, спазми артеріол, набряк периваскулярної сполучної тканини, повнокров'я гемокапілярів клубочків, стази і сладжі в перитубулярних капілярах) кіркової і мозкової речовини. У ще більшому ступені порушення кровообігу, дегенеративні та запальні зміни розвиваються в нирках піддослідних тварин при поєднаному застосуванні гліфосату та наночастинок оксиду цинку.

3. Наночастинки оксиду цинку викликають незначні дисциркуляторні зміни і гіперплазію лімфатичних фолікулів білої пульпи в селезінці експериментальних тварин. За умов введення тваринам гліфосату на фоні підвищеної проникності судинних стінок органу (судини повнокровні із формуванням у їх просвітах складів та тромбів) відбувається структурна перебудова стромального компоненту селезінки (підвищена гідратація основної речовини сполучної тканини, ретикулярних та колагенових волокон, ретикулярної сітки), деструктуризація білої пульпи, активна проліферація лімфоцитів. За умов поєданого застосування гліфосату та наночастинок оксиду цинку спостерігається їх синергічний ефект – деструктивно-дегенеративні зміни структурних компонентів селезінки є найбільш значними порівняно з іншими експериментальними групами.

Результати розділу опубліковані у наукових працях автора [221, 222].

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Останні десятиліття характеризуються бурхливим розвитком нанотехнологій. Нанотехнологія-це наука про виробництво та застосування матеріалів та пристроїв розміром від одного до кількох сотень нанометрів. Сьогодні наноматеріали використовуються в багатьох галузях, таких як електроніка, медицина, енергетика, транспорт, аерокосмічна промисловість, сільське господарство та багато інших. Проте, таке бурхливе використання нанотехнологій також має свої ризики, зокрема можливість виникнення токсичних властивостей та ризик забруднення довкілля наночастинками, тому необхідно дотримуватись відповідних стандартів безпеки та етики [223-224].

Одними з найбільш вивчених та застосовуваних наночастинок у наукових дослідженнях та промисловості є наночастинок оксидів металів, наприклад, діоксиду титану, оксиду алюмінію, оксиду цинку тощо. Наночастинок оксидів металів мають дуже високу активність та високу поверхневу енергію, що робить їх корисними в багатьох аспектах. Наприклад, наночастинок діоксиду титану використовуються як каталізатори для покращення ефективності сонячних батарей, фотоелектрокаталізу води та повітря, а також виробництва самоочищуючих поверхонь. Наночастинок оксиду алюмінію використовуються в керамічних матеріалах, каталізаторах, композитах та захисних покриттях [225-228]. Особливої уваги заслуговують наночастинок оксиду цинку, які завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям знаходять широке застосування в різних галузях промисловості та науки. Ось деякі з них: сонячні батареї (наночастинок ZnO використовуються для створення тонких плівок в сонячних батареях, що дозволяє підвищити ефективність їх роботи), електроніка (наночастинок ZnO використовуються в електронних пристроях, таких як транзистори та

світлодіоди, завдяки їхнім властивостям провідності), захисні покриття (наночастинки ZnO використовуються для створення захисних покриттів на поверхнях металів та інших матеріалів, що дозволяє зберегти їх від корозії та інших видів пошкоджень), антибактеріальні матеріали (наночастинки ZnO мають властивості, які дозволяють їм вбивати бактерії та інші мікроорганізми, тому вони використовуються для створення антибактеріальних матеріалів, таких як поверхні для операційних столів, одягу та інших виробів), косметика (наночастинки ZnO використовуються у косметичних засобах, таких як креми та сонцезахисні засоби, для захисту шкіри від шкідливих ультрафіолетових променів), медицина (наночастинки ZnO використовуються у медицині для створення препаратів та матеріалів, що забезпечують антимікробну дію, багатообіцяючими є протипухлинний, антиоксидантний, протидіабетичний та протизапальний ефекти наночастинок ZnO, а також їх здатність таргентно доставляти ліки до клітин і тканин і потенціал щодо можливості використання в процесах біовізуалізації) [6, 7, 39-46].

Таке широке використання наночастинок ZnO передбачає важливість і необхідність всебічного вивчення їх можливого негативного впливу на здоров'я людей та довкілля. Необхідно відмітити, що результати досліджень токсичності наночастинок ZnO є дещо суперечливими. З одного боку, Управлінням з харчових продуктів і медикаментів (FDA) у США ZnO віднесений до класу загалом безпечних речовин [8], з іншого – є ряд повідомлень про токсичність і побічні дії наночастинок ZnO. Деякі роботи показали, що високі концентрації наночастинок ZnO можуть викликати певні види клітинного пошкодження та запальну реакцію. Зокрема, дослідження на тваринах показали, що великі дози наночастинок ZnO можуть призводити до печінкової токсичності, погіршення функції нирок та інших органів. Крім того, існують деякі докази того, що наночастинки ZnO можуть впливати на розвиток та репродуктивну функцію тварин [12-16]. Дослідження на людях

поки не є настільки вичерпними, щоб дозволити зробити однозначні висновки щодо токсичності наночастинок ZnO для людей.

Проблема полягає ще й в тому, що наночастинок ZnO та інших оксидів металів можуть впливати на організм людини не ізольовано, а в поєднанні з великим числом різних речовин хімічної природи, які є типовими забруднювачами навколишнього середовища. Це становить особливу небезпеку, оскільки існує вірогідність посилення токсичних ефектів хімічних речовин під дією наночастинок, що пов'язано з можливістю адсорбції традиційних токсикантів на наночастинках і, як результат, полегшення їх транспорту в клітини організму.

Існує багато різних сполук, які можуть стати забруднювачами навколишнього середовища. До найпоширеніших забруднювачів довкілля належать гербіциди. Гліфосат – це фосфорорганічний гербіцид, що широко використовується для боротьби з бур'янами у сільському і лісовому господарствах та інших галузях. Цей хімічний засіб вперше був введений на ринок у 1970-х роках і став одним з найпопулярніших гербіцидів у світі. Гліфосат діє на рослини, знищуючи бур'яни шляхом блокування продукції амінокислот, які необхідні для їхнього росту та розвитку. Цей механізм дії дозволяє гліфосату бути ефективним для боротьби з різними видами бур'янів [20, 21].

На сьогодні існує дискусія щодо токсичності гліфосату для людей та тварин. Ряд досліджень показують, що гліфосат має негативний вплив на здоров'я, включаючи можливість погіршення функцій нирок, печінки, розвитку ожиріння, діабету, хвороб серця, депресії, хвороби Альцгеймера, аутизму. Всесвітня організація охорони здоров'я та Міжнародне агентство з дослідження раку вважають, що гліфосат може бути потенційно канцерогенним для людей [23- 28]. У ряді країн використання гліфосату регулюється законодавством, а в деяких країнах його використання заборонене. Однак, в багатьох інших країнах, включаючи Україну, гліфосат

продовжує застосовуватися для боротьби з бур'янами, зокрема, у світі щороку виробляються і використовуються сотні тисяч тон гліфосату [22].

Метою нашої роботи було дослідити біохімічні механізми, що визначають синергічний ефект токсичності наночастинок оксиду цинку і фосфороганічного токсиканта гербіциду гліфосату.

В роботі використовували біохімічні (оцінка активності вільнорадикального окислення ліпідів, білків та стану системи антиоксидантного захисту і системи синтезу оксиду азоту, стану печінки за активністю маркерних ензимів, активності ферментів першої та другої фази метаболізму ксенобіотиків), імуноферментні (дослідження вмісту інтерлейкінів), біофізичні (цитофлюориметричне дослідження активності вільнорадикальних процесів в лейкоцитах, процесів апоптозу і некрозу), морфологічні (гістологічне дослідження печінки, нирок та селезінки), статистичні методи дослідження.

Інтоксикацію гліфосатом моделювали шляхом введення експериментальним тваринам щоденно внутрішньошлунково гербіциду Раундапу у дозі 250 мг/кг маси тіла (у перерахунку на гліфосат) протягом двох тижнів. Суспензію нанопорошку оксиду цинку (ZnO , 99+%, 20-30 nm) вводили внутрішньошлунково в дозі 100 мг/кг маси тіла тварин протягом двох тижнів. Для визначення синергічного ефекту токсичності наночастинок ZnO і гліфосату тваринам щоденно вводили розчин наночастинок з Раундапом протягом двох тижнів у вищезазначених дозах.

Як показали результати досліджень функціонального стану печінки, введення щурам суспензії наночастинок оксиду цинку викликало достовірні зміни активності в сироватці крові ензимів маркерів цитолізу – аланін- і аспаратамінотрансфераз. Таке зростання активності амінотрансфераз свідчить про те, що наночастинки ZnO негативно впливають на мембрани клітин, викликаючи підвищення їх проникності. Подібні результати отримані в роботі [13], в якій автори показали, що у той час як додавання

наночастинок ZnO у малих кількостях (50 мг/кг маси тіла) викликає мінімальну токсичність у мишей, у високих концентраціях (500 мг/кг маси тіла) наночастинок призводять до достовірного зменшення маси тіла, збільшення відносної ваги підшлункової залози, мозку та легенів, підвищення активності сироваткової АлАТ. Ураження печінки під впливом наночастинок оксиду цинку також продемонстровано у роботі [112]. Наночастинок ZnO значно підвищували активність АлАТ і АсАТ у самців щурів Wistar, а у тканинах печінки щурів, яким вводили наночастинок, було виявлено більше клітин Купфера, застійні явища, запалення паренхіми, балонування та конденсацію хроматину. Автори пов'язують гепатотоксичність наночастинок з активацією окислювальних процесів у тканинах печінки тварин.

Під впливом наночастинок оксиду цинку спостерігалася також тенденція до підвищення активності лужної фосфатази, яка, як відомо, є чутливим маркером холестазу та обтурації жовчевих шляхів, проте такі зміни виявилися статистично недостовірними. Слід зазначити, що під впливом наночастинок здатність гепатоцитів до синтезу протеїну і азотовмісних продуктів суттєво не змінювалася, також не порушувалася екскреторна функція печінки (вміст загального білка, сечовини, креатиніну і загального білірубіну в сироватці крові тварин, яким вводили наночастинок оксиду цинку, не відрізнявся від аналогічних показників у групі інтактних тварин).

На відміну від групи тварин, які отримували наночастинок, внутрішньошлункове введення гліфосату протягом 14 днів призводило до достовірних змін усіх досліджуваних показників функціонального стану печінки. Про виражений цитоліз гепатоцитів свідчило підвищення активності аланін- і аспаратамінотрансфераз майже вдвічі, що, очевидно, стало наслідком дезінтеграції мембран клітин печінки, зумовленої активацією оксидативного стресу [130]. Зростання активностей аланін- і аспаратамінотрансфераз у щурів Wistar, яким вводили 50 мг/кг маси тіла

гліфосату через день протягом 15 днів спостерігали і в роботі [147]. Автори відмічають, що цитоліз гепатоцитів у даному випадку також зумовлений активацією оксидативного стресу – підвищувався рівень малонового діальдегіду і перекису водню, значного знижувалася активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, вмісту відновленого глутатіону, небілкових тіолів і вітаміну С.

Про застійні явища у жовчевивідних шляхах тварин, яким вводили гербіцид, свідчило достовірне зростання активності лужної фосфатази в сироватці крові. Такі дані узгоджуються з результатами експериментів, наведеними в роботі [148], в якій автори описують поступовий набряк гепатоцитів, застійні явища у печінці та лінійне підвищення активності лужної фосфатази по мірі збільшення концентрації гліфосату, який пероорально вводили тваринам.

Під впливом хімічного токсиканта ми також спостерігали достовірне пригнічення синтетичної функції печінки (у сироватці крові знижувався вміст загального білка) і погіршення екскреторної функції печінки (рівень загального білірубіну достовірно підвищувався). Наслідком пригнічення синтетичних процесів у печінці під впливом гербіциду, очевидно, також стало зменшення вмісту сечовини в сироватці крові уражених щурів. Безумовно, що, крім гепатотоксичної дії, гліфосату притаманний також нефротоксичний ефект, про що може свідчити отриманий нами факт майже півторазового підвищення в сироватці крові уражених тварин вмісту креатиніну. Подібні результати отримали L. Hamdaoui et al. [149], які спостерігали пошкодження дистальних каналців, значне збільшення в плазмі крові рівнів креатиніну та сечової кислоти і зниження кліренсу креатиніну у щурів Вістар, яким вводили гліфосат протягом 60 днів. Є дані, що гліфосат викликає гіаліновий некроз в нирках, що супроводжується підвищенням рівня креатиніну в сироватці крові та вмісту азоту в сечі, і такий ефект гербіциду є наслідком активації окислювальних процесів (вміст

малонового діальдегіду підвищувався, в той же час активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази суттєво знижувалися) [150].

Найбільш суттєво досліджувані показники функціонального стану печінки змінювалися у сироватці крові тварин, яким вводили наночастинки оксиду цинку сумісно з гербіцидом гліфосатом. У цьому випадку активність амінотрансфераз, лужної фосфатази і вміст загального білірубіну були достовірно вищими порівняно з групою тварин, яким вводили тільки хімічний токсикант. Отже, наночастинки ZnO і гліфосат взаємодіють синергічно в плані індукції пошкодження печінки. Механізм такого синергізму негативного впливу досліджуваних чинників на печінку потребує подальшого вивчення.

Зважаючи на універсальну роль оксидативного стресу як фактора токсичного пошкодження клітин, наступним етапом нашої роботи було дослідження ролі активації окислювальних процесів при дії наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату. Оксидативний стрес – це дисбаланс в системі прооксиданти/антиоксиданти, що супроводжується нагромадженням у клітинах та тканинах недоокислених продуктів окисної деградації на тлі зниженої активності антиоксидантної системи. Вплив оксидативного стресу на клітини перш за все залежить від концентрації утворюваних активних форм кисню (АФО). За фізіологічних концентрацій АФО беруть участь у процесах сигнальної трансдукції та регуляції окисно-відновного гомеостазу, у запуску як рецепторного, так і нерцепторного механізмів апоптозу, аутофагії, перекисного окислення ліпідів і опосередковано впливають на різноманітні сигнальні шляхи молекулярно-біологічних реакцій [229- 231]. Крім того, активні метаболіти кисню виконують роль «очищувачів», які позбавляють від зруйнованих клітин органи і регулюють пасивну проникність мембран для іонів, а також в'язкість ліпідного бішару [232, 233]. У великих концентраціях активні форми кисню, такі як пероксид водню

(H₂O₂), супероксид аніон (O²⁻) і гідроксильний радикал (OH[•]), здатні взаємодіяти з біологічними макромолекулами, призводячи до надмірного перекисного окислення жирів, окислювальної модифікації білків, інактивації різних ферментів, пошкодження ДНК і клітинної загибелі [234, 235]. Іншим фактором, який визначає інтенсивність оксидативного стресу є функціонування системи антиоксидантного захисту. До основних ферментів антиоксидантного захисту традиційно зараховують каталазу, супероксиддисмутазу, глутатіонпероксидазу, глутатіон-S-трансферазу, глутатіонредуктазу. Неферментативна ланка антиоксидантної системи представлена низкою низькомолекулярних сполук, серед яких найважливішими є відновлений глутатіон, вітаміни E, C, A, низькомолекулярні протеїни — церулоплазмін, трансферин, металотіонеїни тощо [236-238].

Інтенсивність ліпопероксидних реакцій ми вимірювали за вмістом в тканинах речовин радикальної деградації ліпідів – ТБК-активних продуктів. Результати наших досліджень показали, що введення щурам суспензії наночастинок оксиду цинку у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом двох тижнів викликало достовірні зміни з боку показників інтенсивності процесів ліпопероксидації в сироватці крові і в печінці.

Про інтенсивність окисної модифікації білків судили за вмістом в плазмі крові альдегідо- і кетонпохідних, що утворюються при дії активних кисневих радикалів на амінокислотні залишки в молекулах білків. Окисна модифікація білків розглядається як один із ранніх і надійних маркерів оксидативного стресу. В результаті окисної модифікації білків відбувається їх фрагментація, денатурація і утворення амінокислотних радикалів. Це призводить до втрати білками їхньої біологічної активності й порушення обмінних, зокрема регенеративних процесів [239, 240]. Двотижневе введення щурам колоїдного розчину наночастинок ZnO викликало достовірне підвищення вмісту в сироватці крові 2,4-динітрофенілгідразонів, що

визначалися при 370 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетоніохідних амінокислот нейтрального характеру) і при 430 нм (альдегідо- та кетоніохідні амінокислот основного характеру), тобто, можемо прийти до висновку, що наночастинки стимулювали окисну модифікацію білків у сироватці крові піддослідних тварин. R. Roy et al. [241] показали, що наночастинки оксиду цинку викликали загибель макрофагів, і важливу роль у цьому якраз відіграла окисна модифікація протеїнів у клітинах (підвищувався вміст карбонільних груп), а також посилення перекисного окислення ліпідів на фоні виснаження антиоксидантних ферментів. Оксидативний стрес був зумовлений інгібуванням вивільнення фактора транскрипції Nrf2. Наночастинки ZnO також активували розщеплення маркерів апоптозу і збільшували кількість аутофагосом і білків-маркерів аутофагії. При цьому апоптична та аутофагічна загибель клітин інгібувалася блокуванням генерації АФО N-ацетилцистеїном, що продемонструвало критичну роль оксидативного стресу в обох типах загибелі клітин при дії наночастинок ZnO. Активацію окисної модифікації білків поряд зі змінами інших маркерів оксидативного стресу (активність супероксиддисмутази, каталази, вміст відновленого глутатіону, малонового діальдегіду) при гострій інтоксикації наночастинками оксиду цинку було також показано в роботі [242].

Факторами, які визначають активність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків, є, з одного боку, інтенсивність утворення АФО в тканинах, а з іншого – функціональний стан системи антиоксидантного захисту. З метою дослідження впливу наночастинок ZnO на стан антиоксидантної системи ми визначали активність каталази і супероксиддисмутази, вміст церулоплазміну, відновленого глутатіону та загальну антиоксидантну активність плазми крові. В сироватці крові під впливом наночастинок достовірно знижувалися активність каталази і рівень церулоплазміну, а в тканині печінки – активність каталази і

супероксиддисмутази. Пригнічення антиоксидантної системи при дії наночастинок оксиду цинку було продемонстровано в роботах [106, 108, 113, 118].

Отже, інтрагастральне введення щурам протягом двох тижнів наночастинок оксиду цинку призводить до оксидативного стресу в тканинах тварин – активізуються процеси пероксидації і порушується функціонування системи антиоксидантного захисту.

Ще більшою мірою роль оксидативного стресу проявилася в реалізації токсичності гербіциду гліфосату. Введення тваринам цієї сполуки протягом 14 днів у дозі 250 мг/кг призводило до суттєвого підвищення показників активності пероксидації ліпідів і білків і зниження всіх досліджуваних показників функціонального стану системи антиоксидантного захисту. На вирішальну роль генерація АФО у механізмах токсичності гліфосату вказують і інші автори. Так, інкубація *in vitro* клітин каналців нирок людини з різними концентраціями гліфосату призводила до надмірної продукції АФО, що зумовлювало значне зменшення кількості клітин, що виживали [164]. Так само у досліджах *in vitro* показано, що у клітинах нейробластоми, гепатоцитах та лімфоцитах людини гліфосат стимулював процеси ліпопероксидації, що проявлялося накопиченням ТБК-активних продуктів в інкубаційному середовищі [169, 180, 243].

Щодо механізму стимуляції генерації АФО гліфосатом, то на сьогодні це питання залишається не до кінця зрозумілим. Є дані, що гліфосат може впливати на експресію відповідних генів, від яких залежить синтез білків, що визначають інтенсивність окислювальних процесів в організмі [179]. E. Zhiqiang et al. [244] продемонстрували, що суттєве підвищення рівня АФО в ооцитах під впливом гліфосату відбувалося на фоні значного зниження рівнів мРНК антиоксидантних генів (SOD1, SOD2, SIRT2, SIRT3), а також пригнічення експресії відновленого глутатіону. Крім того, автори показали що під впливом гліфосату знижується потенціал мітохондріальної мембрани

і активується апоптоз клітин, що також узгоджується з отриманими нами результатами. Активація апоптозу викликається гіперекспресією апоптичних генів каспази-3 і каспази-4 і гіпоекспресією антиапоптичних генів Survivin і BCL-XL.

Отже, гліфосат спричиняє активацію оксидативних процесів у клітинах, негативно впливаючи на експресію генів, що відповідають за функціонування антиоксидантних ферментів. Факти пригнічення системи антиоксидантного захисту при дії гліфосату продемонстровано у ряді робіт. У дослідженні [176] активність супероксиддисмутази була достовірно знижена в групах мишей, яким вводили 250 або 500 мг/кг маси тіла гліфосату протягом 6 і 12 тижнів. У роботі [245] показано, що гліфосат у дозі 50 або 500 мг/кг маси тіла достовірно знижує вміст відновленого глутатіону, активність глутатіонпероксидази і супероксиддисмутази. У поросят, яких годували 10, 20 або 40 мг/кг гліфосату протягом 35 днів у дванадцятипалій кишці знижувалася активність каталази і супероксиддисмутази, а у печінці – загальна антиоксидантна здатність і активність каталази [177].

Пригнічення антиоксидантної системи під впливом гліфосату продемонстровано також в дослідях *in vitro*. Зокрема, інкубація клітин гранульози або гепатоцитів людини з різними дозами гербіциду супроводжувалася зниженням активності супероксиддисмутази, каталази і глутатіонтрансферази і рівня відновленого глутатіону на фоні посилення процесів ліпопероксидації [180, 246].

Пригнічення експресії відповідних генів під впливом гліфосату, тобто зниження синтезу білків, очевидно, є одним з найбільш важливих механізмів пригнічення активності антиоксидантних ферментів, яке ми спостерігали в наших експериментах. Проте, також можливо, що таке пригнічення є результатом підвищення деградації молекул ферментів. Зокрема, в інактивації та деградації супероксиддисмутази можуть брати участь активні форми кисню – гідроксильні радикали та гідроген пероксид, збільшення

вмісту яких, у свою чергу, може бути наслідком інактивзації ензимів, які їх розщеплюють, наприклад, каталази, що відповідальна за знешкодження перекису водню [247-249]. Оскільки ми отримали результати, які свідчать про зниження активності каталази у сироватці крові і печінці щурів після введення гліфосату, то такий механізм може бути причиною пригнічення активності супероксиддисмутази в наших експериментах. Крім того, можливо, пригнічення активності супероксиддисмутази розвивається за механізмом зворотнього зв'язку, тобто в результаті інгібування надлишком субстрату – супероксидного аніон-радикала. Ми спостерігали зниження під впливом гліфосату мітохондріального трансмембранного потенціалу, що, очевидно є наслідком дезінтеграції мембран мітохондрій. Відомо, що порушення цілісності мітохондріальних мембран призводить до роз'єднання тканинного дихання і окисного фосфорилування і, як наслідок, до надмірної продукції супероксидного аніон-радикала, який є потенційним інгібітором супероксиддисмутази [250, 251].

Іншим важливим ензимом антиоксидантної ланки є каталаза, яка захищає клітини від накопичення перексиду водню, що в присутності іонів заліза може бути джерелом найбільш небезпечної і агресивної АФО-гідроксильного радикалу. Найбільша активність каталази виявляється в печінці, еритроцитах, нирках [252, 253]. Отримане нами пригнічення активності даного ферменту під впливом досліджуваних чинників може бути наслідком, крім пригнічення експресії відповідних генів і посиленої деградації ферменту активними кисневими радикалами, зниження пулу НАДФН в печінці, основним місцем утворення якого є пентозофосфатний шлях окислення глюкози (НАДФН входить в активний центр ферменту), в результаті чого зменшується утворення ферменту у гепатоцитах. Враховуючи виявлений нами цитолітичний синдром у щурів під впливом гліфосату, зниження активності каталази в печінці може також бути результатом посиленого виходу ферменту в кров.

Механізм отриманого нами факту зниження під впливом гліфосату концентрації важливого антиоксиданта плазми крові церулоплазміну залишається незрозумілим. Відомо, що антиоксидантна здатність церулоплазміну обумовлена його електрон-акцепторними властивостями, церулоплазміну також притаманна супероксиддисмутазна активність, хоча вона нижча, ніж у внутрішньоклітинної супероксиддисмутази. Завдяки високій феррооксидазній активності цей білок запобігає неферментативним реакціям, що дають початок вільним радикалам і подальшому розвитку ліпідної пероксидації [254, 255]. Можливо, що як і у випадку з супероксиддисмутазою, гліфосат може пригнічувати експресію генів, відповідальних за синтез церулоплазміну в гепатоцитах, ймовірно також, що тривале введення ксенобіотика у нашому експерименті призвело до надмірної витрати фермента на знешкодження вільних радикалів. Також враховуючи отримані нами результати, що свідчать про пригнічення синтетичної функції печінки під впливом гліфосату, і той факт, що церулоплазмін утворюється в печінці, можна припустити, що зниження його вмісту у сироватці крові тварин, яким вводили гербіцид, якраз і є наслідком пригнічення процесів синтезу церулоплазміну в гепатоцитах.

Хоча в літературі є ряд повідомлень, що підтверджують отримані нами результати щодо зниження концентрації відновленого глутатіону при дії гліфосату, механізм такого зниження також залишається незрозумілим [256, 257]. Відновлений глутатіон відіграє чи не головну роль у неферментативній ланці антиоксидантної системи. Він здійснює детоксикацію H_2O_2 і гідропероксидів, що утворюються при реакції активних радикалів кисню з ненасиченими жирними кислотами [258, 259]. Можливо, що фосфорганічна сполука гліфосат здатна безпосередньо блокувати SH-групи відновленого глутатіону, що і зумовлює недостатність антиоксидантного захисту при інтоксикації даним токсином. Глутатіон – це трипептид, який синтезується у двох стадіях під впливом ферментів γ -

глутамілцистеїнсинтетази і глутатіонсинтетази [260]. Крім того, у відновленому стані дана сполука підтримується за допомогою ферменту глутатіонредуктази. Можна припустити, що гліфосат здатний впливати на процеси синтезу даних ферментів або безпосередньо на рівні рибосом, або на генетичному рівні, тобто пригнічуючи експресію відповідних генів. Також, цілком ймовірно, що отримане нами зменшення концентрації відновленого глутатіону при двохтижневому введенні гліфосату зумовлено тривалим використанням даного антиоксиданта для знешкодження гідропероксидів і перекису водню, що генеруються під впливом токсичної сполуки.

Як і у випадку з дослідженням функціонального стану печінки, найсуттєвіше показники інтенсивності оксидативного стресу змінювалися у тварин, яким вводили наночастинки ZnO разом з гліфосатом. У цьому випадку більшість досліджуваних показників були достовірно вищими порівняно з групою тварин, яким вводили тільки хімічний токсикант, що свідчить про те, що здатність гліфосату викликати оксидативний стрес значно зростає при його поєднаному введенні з наночастинками.

Ще однією високореакційною молекулою, посилена генерація якої тісно пов'язана з оксидативним стресом і має важливе значення у фізіологічних і патологічних процесах, в тому числі і при дії ряду токсинів, є молекула оксиду азоту. NO – це радикал, що має неспарений електрон, який надає йому високої реакційної здатності. Оксид азоту утворюється в результаті окислення киснем гуанідинової групи L-аргініну, цю реакцію каталізує фермент NO-синтаза. Розрізняють 3 ізоформи даного ферменту: ендотеліальна (eNOS), нейрональна (nNOS) та індукцйбельна (iNOS) або макрофагальна. Саме з гіперекспресією iNOS під впливом ряду факторів, в тому числі і токсинів, пов'язують цитотоксичні властивості NO, які в більшості випадків реалізуються через утворення пероксинітриду (ONOO^-) внаслідок взаємодії NO з активним радикалом кисню супероксид-аніоном (O_2^-). У разі високої концентрації ONOO^- відбувається генерація каскаду

високотоксичних прооксидантів, які можуть окислювати ліпіди, тіолові групи та пошкоджувати клітинні мембрани [261, 262].

Після інтрагастрального введення наночастинок ZnO протягом двох тижнів мало місце достовірне підвищення показників загальної активності NO-синтази у печінці і вмісту метаболітів оксиду азоту в крові. Подібні результати отримано також в роботі [263]. Автори показали, що інтратрахеальні інстиляції трьох різних доз наночастинок ZnO мишам призводили до підвищеної смертності, втрати маси тіла, підвищення вмісту загального білка та гідроксипроліну, змін ряду біохімічних та гематологічних параметрів. Рівні оксиду азоту та малонового діальдегіду в гомогенатах легень також були підвищені. К. J. Chuang et al. [264] продемонстрували, що інкубація ендотеліальних клітин коронарних артерій людини з наночастинками ZnO призводила до зниження життєздатності клітин і підвищення рівня 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину і оксиду азоту. Обидві роботи підтверджують результати наших досліджень, які свідчать про важливість гіперпродукції оксиду азоту, що відбувається на фоні оксидативного стресу, у механізмах токсичної дії наночастинок ZnO. У роботі [264] автори також наводять факт підвищення рівня IL-6 при дії на клітини наночастинок ZnO, що, можливо, є важливим фактором посиленої продукції NO. Відомо, що прозапальні цитокіни викликають гіперекспресію iNOS і, як результат, активується утворення NO. Очевидно, що отримані нами результати щодо підвищення загальної активності NO-синтази під впливом наночастинок якраз і зумовлені активацією саме індукцибельної форми ферменту.

До ще більшого підвищення активності NO-синтази призводило введення тваринам гліфосату. Закономірно, що у сироватці крові даної групи щурів також виражено зростав вміст нітратів і нітритів. В науковій літературі є повідомлення, що вказують на участь системи синтезу оксиду азоту в патогенезі токсичності гліфосату. М. А. Martínez et al. [265] на клітинній лінії

нейробластоми людини SH-SY5Y показали, що важливу роль у механізмах загибелі клітин у відповідь на вплив гліфосату відіграє активація оксидативного стресу (підвищувалися рівні МДА і АФО), посилена генерація оксиду азоту і активація каспаз-Glo 3/7. Отже, гліфосат-індукований цитотоксичний ефект реалізується через оксидативний і нітрооксидативний стрес і загибель клітин через апоптоз, аутофагію та некротичні шляхи. Отримані нами результати також свідчать про активацію апоптичних і некротичних процесів в клітинах на фоні посиленої продукції оксиду азоту і активації окислювальних реакцій.

Щодо механізму стимуляції нітрооксидативного стресу під впливом гліфосату, то, очевидно, що головну роль тут відіграють прооксидні властивості гербіциду. Здатність останнього пригнічувати систему антиоксидантного захисту і стимулювати утворення АФО в клітині призводить до деградації біомембран і макромолекул, розвитку запальних реакцій і утворення прозапальних цитокінів, які викликають гіперекспресію iNOS і, в результаті, посилену продукцію оксиду азоту, який швидко реагує з супероксидом з утворенням цитотоксичного пероксинітриду. Пероксинітрид незворотно інгібує ферменти в клітині, в тому числі і ферменти дихального ланцюга, нітрозилуючи їх і забираючи залізо. В свою чергу пригнічення мітохондріального дихання може ініціювати апоптоз. Всі ці процеси (активацію під впливом гліфосату окислювальних реакцій, пригнічення антиоксидантної системи, посилену продукцію NO і прозапальних цитокінів, активацію апоптозу) ми якраз і спостерігали у нашій роботі. Вищеописана схема токсичної дії гліфосату підтверджується також результатами досліджень, описаними N. S. El-Shenawy [266]. Було виявлено, що введення тваринам Раундапу індукувало оксидативний стрес у печінковій тканині (знижувався рівень відновленого глутатіону і активізувалися процеси ліпопероксидації), що призводило до пошкодження мембран гепатоцитів (відбувався витік печінкових внутрішньоклітинних ферментів –

амінотрансфераз і лужної фосфатази). В сироватці крові підвищувався рівень TNF- α і посилювалася продукція оксиду азоту.

Слід також зазначити, що у щурів, яким вводили наночастинки ZnO разом з гліфосатом, загальна активність NO-синтази і вміст метаболітів оксиду азоту у сироватці крові були достовірно вищими, ніж у тварин, яким вводили тільки гербіцид, що ще раз підтверджує факт потенціювання наночастинками токсичних ефектів хімічної сполуки.

Відомо, що у патогенезі токсичного ураження різного генезу суттєву роль відіграє вивільнення цитокінів, які мають важливе значення у перебігу запальних процесів. Цитокіни – це ендогенні, біологічно-активні поліпептидні медіатори, які продукуються активованими клітинами різних типів, у тому числі макрофагами і купферівськими клітинами печінки, у відповідь на зовнішній позаклітинний стимул і беруть участь у формуванні та регуляції захисних реакцій організму [267, 268]. При запаленні вони служать посередниками деструкції тканин. У запуску специфічної імунної відповіді беруть участь прозапальні цитокіни: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , тоді як протизапальні цитокіни – IL-4, IL-10, IL-13, TGF – беруть участь у розвитку реакцій протизапального процесу і пригнічують синтез інтерлейкінів прозапального ряду [269].

Результати наших досліджень показали, що введення тваринам суспензії наночастинок оксиду цинку не призводило до достовірних змін цитокінового профілю сироватки крові щурів. Це дещо суперечить дослідженням S.H. Jeong et al. [270], які показали, що наночастинки ZnO здатні підсилювати продукцію прозапальних медіаторів, зокрема, фактору некрозу пухлин- α . В роботі [271] також було продемонстровано, що наночастинки оксиду цинку збільшують вироблення прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-8. Дослідження [272] було спрямоване на вивчення прозапального потенціалу наночастинок ZnO. Спостерігалось значне збільшення вмісту прозапальних цитокінів (TNF- α та IL-1 β) та АФО із супутнім зниженням

рівня глутатіону. Рівні експресії білків каскаду мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК), таких як p-ERK1/2, p-p38 і p-JNK, також були значно індуковані. Ці дані продемонстрували, що наночастинки ZnO індукують оксидативний стрес у клітинах, що призводить до посилення запальної відповіді через активацію сигнальних шляхів NF-κB і МАРК та генерацію TNF-α та IL-1β. В той же час R. Shabbir et al. [273] показали зниження рівня TNFα у культурах макрофагів і лімфоцитів, інкубованих з різними концентраціями наночастинок ZnO. Результати експресії мРНК підтверджують пригнічення регуляції TNFα після експозиції наночастинок у відповідних культурах. Автори роблять висновки про можливість використання наночастинок ZnO як протизапального засобу при хворобах коронарних артерій та інших захворюваннях.

Отже, дані про роль цитокінів у механізмах токсичних ефектів наночастинок ZnO суперечливі. Очевидно, що участь цитокінів у реалізації токсичної дії наночастинок залежить від ряду факторів, зокрема, від розміру, дози, способу і тривалості введення, досліджуваної моделі тощо.

На відміну від групи щурів, які отримували наночастинки ZnO, внутрішньошлункове введення гліфосату зумовило виражені зміни цитокінового профілю сироватки крові порівняно з контрольною групою тварин, зокрема, достовірно підвищувалася концентрація прозапальних цитокінів TNF-α, IL-1β та IL-6, яким належить фундаментальна роль у розвитку запальних процесів. Вони секретуються багатьма імунокомпетентними клітинами, найбільше макрофагами і моноцитами. При цьому вміст протизапальних цитокінів IL-4 і IL-10 в сироватці тварин, на відміну від прозапальних, достовірно не змінювався. Такі зміни, ймовірно, вказують на запальний компонент та активацію моноцит/макрофагальної системи під впливом гербіциду.

Значне підвищення концентрації прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів із гліфосатною інтоксикацією, отримане в наших дослідженнях,

узгоджується із даними інших авторів. В огляді [274] детально описано вплив гліфосату та гербіцидів на основі гліфосату на здоров'я ссавців і риб, з акцентом на імунній системі. Показано, що гліфосат і гербіциди на основі гліфосату виявляють цитотоксичну та генотоксичну дію, посилюють окислювальний стрес, порушують шлях естрогену, порушують деякі церебральні функції та, ймовірно, пов'язані з деякими видами раку. Вплив гліфосату на імунну систему, очевидно, змінює каскад комплементу, фагоцитарну функцію та відповідь лімфоцитів, а також збільшує виробництво прозапальних цитокінів. Дослідження, проведені J. K. Winstone et al. [275], показали, що гліфосат здатний проникати у мозок і збільшувати концентрацію TNF α як у плазмі, так і в тканині мозку. Примітно, що доза гліфосату позитивно корелювала з рівнем TNF α . Ці результати дозволяють припустити, що нейродегенеративні розлади, що викликаються гліфосатом, зумовлюються гіперекспресією прозапального TNF α . У роботі [276] автори також досліджували вплив гліфосату на продукцію прозапальних цитокінів. Показали, що гербіциди на основі гліфосату збільшували рівень IL-1 β , IL-6, TNF- α і експресію мРНК iNOS і COX-2, при цьому знижувалася активність антиоксидантних ферментів (SOD, GSH-Px). Щодо молекулярних механізмів таких ефектів, то було показано, що гліфосат індукує активізацію шляху Nrf2/НО-1 і фосфорилування I κ B- α і NF κ B p65, призводить до посилення регуляції LC3-II/LC3-I та зниження регуляції P62, а інгібування NF κ B зменшує експресію мРНК прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, IL-8).

Сумарне введення щурам наночастинок та гербіциду призвело до максимальних змін цитокінового профілю сироватки крові піддослідних тварин. Очевидно, що такий дисбаланс цитокінів зумовлений системним збільшенням в організмі гліфосату при його введенні разом з наночастинками оксиду цинку, що, в свою чергу, призводить до продемонстрованих раніше ефектів – активізації загальної активності NO

синтази, зумовленої гіперекспресією під впливом прозапальних цитокінів іNOS, оксидативного стресу, деструкції біологічних мембран.

Активізація окислювальних реакцій призводить до посилення запрограмованої загибелі клітин – апоптозу, який є необхідним для фізіологічного регулювання кількості клітин організму і для знищення старих клітин. Під впливом активних форм кисню руйнується внутрішня мітохондріальна мембрана, що призводить до втрати мітохондріального трансмембранного потенціалу, набухання матриксу з наступним розривом зовнішньої мембрани мітохондрій і звільненням проапоптотичних білків (AIF, Smac, прокаспаза 9, цитохром *c*) із міжмембранного простору в цитозоль. Вихід цитохрому *c* призводить до активації каспазного каскаду. Порівняно з іншими клітинами організму, продукція активних форм кисню є особливо значущою в нейтрофільних лейкоцитах.

Результати наших досліджень показали, що двотижневе введення щурам суспензії наночастинок оксиду цинку не викликало достовірних змін показників вмісту в нейтрофілах активних форм кисню, кількості клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, інтенсивності апоптозу/некрозу гранулоцитів. Необхідно відмітити, що в літературі є й протилежні дані. Зокрема, було показано, що при культивуванні наночастинок ZnO з клітинами меланоми посилено утворювалися активні форми кисню та мітохондріального супероксиду, що призводило до окисного стресу в клітинах, подальшого зниження потенціалу мітохондріальної мембрани та зменшення кількості мітохондріальних крист. Пошкоджені мітохондрії індукували вивільнення факторів апоптозу, що сприяло апоптозу клітин [277]. Також в роботі [278] було виявлено, що наночастинок ZnO індукували пригнічення росту і спричиняли апоптотичну загибель клітин плоскоклітинного раку ясен людини. Наночастинок ZnO підвищували генерацію внутрішньоклітинних активних форм кисню і, зокрема, рівня супероксиду, а також знижували потенціал мітохондріальної

мембрани і додатково активували апоптотичну смерть клітин через каскади каспаз. Важливо, що антиоксидант та інгібітор каспази запобігали загибелі клітин, спричиненій наночастинками, що вказує на той факт, що індукована супероксидом мітохондріальна дисфункція пов'язана з опосередкованим наночастинками каспазозалежним апоптозом у клітинах плоскоклітинного раку ясен людини. J. Z. Chen et al. [279] досліджували молекулярні механізми впливу наночастинок ZnO на проліферацію та апоптоз епітеліальних клітин легень людини і показали, що наночастинки блокували прогрес клітинного циклу та індукували клітинний апоптоз внаслідок накопичення активних форм кисню в епітеліальних клітинах.

На відміну від наночастинок ZnO, введення тваринам гліфосату зумовило виражені зміни усіх досліджуваних показників. Зокрема, концентрація активних форм кисню у нейтрофілах крові тварин, яким вводили гербіцид, була більше як в два рази вищою, ніж така в контрольній групі тварин. Відомо, що активні форми кисню відіграють важливу роль у фізіологічних процесах в клітинах, зокрема, підтримують фізико-хімічні властивості біологічних мембран, регулюють процеси проліферації, диференціювання й апоптозу, можуть відігравати роль вторинних месенджерів. Проте, при високих концентраціях АФО мають виражену цитотоксичну дію. Зважаючи на показаний нами раніше прооксидний ефект гліфосату і той факт, що утворення активних форм кисню є особливо значущим в нейтрофільних лейкоцитах, отримані нами дані щодо різкого підвищення вмісту кисневих радикалів в лейкоцитах після двотижневого введення тваринам даного гербіциду є цілком логічним і обґрунтованим.

Дослідження кількості нейтрофілів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом у тварин, які зазнавали впливу гліфосату, також показали їх достовірне збільшення порівняно з контрольними щурами. Підвищення кількості клітин зі зниженим трансмембранним потенціалом мітохондрій, очевидно, є безпосереднім наслідком накопичення в них

активних форм кисню. Кисневі радикали ініціюють ланцюговий процес ліпідної пероксидації, що призводить до дезінтеграції біологічних мембран, в тому числі і мітохондріальних, що, в свою чергу, якраз і зумовлює втрату мітохондріального трансмембранного потенціалу.

Зниження мітохондріального трансмембранного потенціалу сприяє утворенню пор в мембранах мітохондрій, наслідком чого є встановлення рівноваги іонів у матриксі та міжмембранному просторі мітохондрій, що призводить до розриву респіраторного ланцюга і, в результаті, до набряку мітохондріального матриксу, порушення цілісності зовнішньої мітохондріальної мембрани і виходу цитохрому с та інших проапоптотичних білків (AIF, Smac, прокаспаза 9) із міжмембранного простору у цитозоль. Вихід цих білків у цитозоль призводить до запуску каспазного каскаду і, як наслідок, до активації апоптозу.

У наших експериментах ми спостерігали достовірно підвищення інтенсивності процесів апоптозу в нейтрофільних лейкоцитах щурів, яким вводили гліфосат (відсоток ANV+ нейтрофілів, який відповідає за ранній апоптоз, перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин майже вдвічі). Необхідно відмітити, що під впливом гербіциду також достовірно підвищувалася кількість нейтрофілів з ознаками некрозу (рівень PI+-клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, перевищував показник норми в півтора рази).

Результати наших досліджень узгоджуються з рядом літературних даних. Дослідження [280] мало на меті оцінити вплив гліфосату на індукцію апоптозу в мононуклеарних клітинах периферичної крові людини. Автори спостерігали підвищення рівня активних форм кисню і рівнів цитозольних іонів кальцію, а також зниження трансмембранного мітохондріального потенціалу у мононуклеарних клітинах периферичної крові, які піддавалися дії гліфосату. Гліфосат змінював проникність мембран клітин, активував каспазу-8, -9, -3 і викликав конденсацію хроматину, що свідчить про те, що

він здатний індукувати апоптоз як зовнішнім, так і, особливо, внутрішнім шляхом. W. Wang et al., продемонстрували, що гліфосат може індукувати апоптоз лімфоцитів через вплив на miR-203 і, як наслідок, регулюючію PI3K/АКТ, що супроводжується активацією СУР, аномальною експресією цитокінів і запальною відповіддю [281]. Роль сигнального шляху PI3K/АКТ в індукції апоптозу під впливом гліфосату було також показано в роботі [282]. У цьому дослідженні клітини L8824 обробляли гліфосатом, в результаті чого підвищувалися рівні активних форм кисню і малонового діальдегіду, PTEN був активований, а сигнальний шлях PI3K/АКТ – інгібований. Також активувалися шляхи P53/Bcl-2/Bax/CytC/Caspase3 та RIPK1/RIPK3/MLKL і підвищувався вміст прозапальних цитокінів TNF- α та IL-1 β . В той же час H. Gao et al. [283] продемонстрували ще один механізм індукції апоптозу гліфосатом. Автори спостерігали підвищення регуляції апоптозу та експресії рецептора N-метил-d-аспартату в епітелії проксимальних каналців нирок і дисбаланс оксидантних і антиоксидантних продуктів, що переконливо свідчать про те, що активація шляху NMDAR1 разом з окисним стресом бере участь у індукованому гліфосатом апоптозі клітин.

Найбільш суттєво досліджувані показники змінювалися у крові тварин, яким вводили наночастинки оксиду цинку разом з гліфосатом. При цьому необхідно зазначити, що у тварин, які зазнавали поєданого впливу досліджуваних засобів, і рівень активних форм кисню в нейтрофілах, і кількість нейтрофілів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом, і інтенсивність апоптичних та некротичних процесів у клітинах були достовірно зміненими порівняно з аналогічними показниками у тварин, яким вводили сам гліфосат. Такі результати свідчать про те, що наночастинки оксиду цинку посилюють прооксидний ефект хімічного токсиканта гліфосату на нейтрофіли крові, а також проапоптичний і пронекротичний ефекти останнього.

Більшість сторонніх речовин, які потрапляють в організм, знешкоджуються в ендоплазматичному ретикулумі гепатоцитів за допомогою спеціальних ферментних систем. Процес біотрансформації ксенобіотиків складається з двох функціонально пов'язаних фаз: 1-а – трансформація ліпофільних ксенобіотиків за участю цитохром Р450-залежних монооксигеназ з приєднанням до ксенобіотиків функціональних груп -ОН, -SH, -NH₃; 2-а – кон'югація метаболітів і гідрофільних сполук.

За умов введення тваринам суспензії наночастинок оксиду цинку достовірно підвищувалася активність ферменту 1-ї фази біотрансформації ксенобіотиків етоксирезорурфін О-деетилази та ферменту 2-ї фази УДФ-глюкуроніл-трансфери. Очевидно, що наночастинок здатні проникати в клітини, взаємодіяти з мембранами ендоплазматичного ретикулуму і змінювати функціонування пов'язаних з ними ферментних систем. К. Rana et al. [284] показали, що взаємодія наночастинок металів з мембранами призводить до генерації реактивних радикалів, які змінюють цілісність мембрани (ультраструктурні дослідження показали проліферацію ендоплазматичного ретикулуму) та індукують окислювальний стрес, що може призвести до порушень діяльності мембранозв'язаних ферментів і активувати шляхи загибелі клітин. Вплив наночастинок на процеси знешкодження ксенобіотиків було також продемонстровано в роботі [285], в якій оцінювали ефект вуглецевих наноструктур на активність і експресію одного з ізоферментів цитохрому Р-450 – СYP2C9. Було показано, що наночастинок пригнічують ферментативну активність досліджуваних ізоферментів (спостерігалось зниження експресії на рівні мРНК і білка). Це вказує на те, що наноструктури можуть змінювати ферментативну функцію ізоферментів цитохрому 450 і молекулярні шляхи їх експресії.

Ураження тварин гліфосатом призводило до виражених змін активності ферментів першої та другої фази метаболізму ксенобіотиків – спостерігалось різке підвищення в мікросомній фракції печінки активності етоксирезорурфін

О-деетилазинеспецифічної монооксигенази та УДФ-глюкуронілтрансферази і, навпаки, зниження активності глутатіонтрансферази, яка належить до ензимів 2-ї фази детоксикації ксенобіотиків та бере участь в знешкодженні токсичних речовин різних хімічних класів. У роботі [286] було оцінено активність різних ферментів, що метаболізують ксенобіотики, у субклітинних фракціях печінки щурів, які піддалися впливу гліфосату. Мікросоми печінки щурів, які зазнали впливу гербіциду, мали нижчі (45-54 %) рівні печінкового цитохрому Р450 порівняно з відповідними контрольними тваринами, активність 7-етоксикумарин О-деетилаза була вищою у гербіцидних тварин порівняно з контрольними тваринами, також спостерігалася нижча активність етоксирезорурфін О-деетилази в мікросомах печінки. В той же час гербіцид не впливав на ферментативну активність глутатіонтрансферази і УДФ-глюкуроніл-трансферази. Це дослідження продемонструвало, що модифікації активності мікросомальних ферментів гліфосатом можуть впливати на метаболічну долю різних ендобіотичних і ксенобіотичних речовин.

Таким чином, як результати наших досліджень, так і дані літератури показують, що гліфосат виражено впливає на функціонування ферментних систем детоксикації ксенобіотиків в мікросомах гепатоцитів. Чи пов'язані такі зміни з безпосереднім впливом цього гербіциду на експресію чи активність ферментів, чи це опосередкована дія внаслідок впливу на структуру мембран ендоплазматичного ретикулуму через активацію оксидативного стресу, чи, можливо, такий ефект є наслідком перетворення самого гліфосату в мікросомах з утворенням токсичних метаболітів, ще належить з'ясувати в подальших експериментах.

Максимальні зміни показників функціонування активності ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків зафіксовано у тварин, яким сумісно вводили гліфосат з наночастинками оксиду цинку. При цьому, як і при дослідженні попередніх показників, активність

мікросомальних ферментів у тварин IV групи була достовірно зміненою порівняно з тваринами, яким вводили тільки гліфосат, що свідчить про те, що наночастинки потенціюють негативний вплив гербіциду на систему біотрансформації ксенобіотиків.

Описані вище біохімічні порушення в організмі експериментальних тварин при дії наночастинок оксиду цинку, гліфосату чи комбінації даних засобів закономірно корелювали з морфологічними змінами в їх органах. Зокрема, в печінці, нирках і селезінці тварин, яким вводили тільки наночастинки, спостерігалися незначні зміни судинного та паренхіматозного компонентів – незначне повнокров'я вен печінки і судинних клубочків нирок, дисциркуляторні зміни і гіперплазію лімфатичних фолікулів білої пульпи в селезінці.

В той же час, застосування гліфосату викликало виражені судинні розлади та суттєве порушення гістологічної структури печінки. Зокрема, спостерігалось спазмування міжчасточкових артерій, розширення синусоїдів, явища тромбозу. В паренхімі порушувалася балкова структура гепатоцитів, каріолема втрачала контури, розвивалася вакуольна дистрофія цитоплазми гепатоцитів. Подібно і в нирках, гербіцид призводив до гіпертрофії та деформації ниркових тілець, звуження просвіту капсули, гідропічної дистрофії епітеліоцитів проксимальних каналців, дистрофії нефроцитів, застійних процесів у венах, спазмів артеріол, набряку периваскулярної сполучної тканини, стазів в перитубулярних капілярах кіркової і мозкової речовини. У селезінці під впливом гліфосату судини ставали повнокровними, у їх просвітах формувалися тромби, відбувалася структурна перебудова стромального компоненту селезінки, деструктуризація білої пульпи, активна проліферація лімфоцитів.

Як і у випадку вивчення біохімічних параметрів, за умов поєднаного застосування гліфосату та наночастинок оксиду цинку спостерігався синергізм щодо їх впливу на морфологічну структуру досліджуваних органів

– судинні, запальні та деструктивно-дегенеративні зміни структурних компонентів печінки, нирок і селезінки були найбільш значними порівняно з експериментальними групами тварин, яким вводили тільки наночастинки чи тільки гербіцид гліфосат.

Механізм такого синергізму токсичності досліджуваних чинників залишається не до кінця зрозумілим і може залежати від ряду факторів. Зокрема, вважається, що підвищення токсичності хімічних сполук при їх попаданні в організм разом з наночастинками може бути результатом посилення біодоступності таких сполук внаслідок їх транспорту через біологічні бар'єри у зв'язаній з наночастинками формі. Наночастинки, за рахунок своїх унікальних фізико-хімічних властивостей, високорозвиненої поверхні і високої адсорбційної здатності, можуть посилювати проникнення токсикантів в організм, тобто служити певною мірою суперпровідниками.

Можлива також сумація токсичних ефектів наночастинок і хімічного токсиканта на біологічні внутрішньоклітинні структури. Відомо, що наночастинки проникають в клітини і можуть взаємодіяти з білками, ДНК, РНК, викликаючи деструктуризацію біомембран і макромолекул. Це призводить до зміни активності ензимних систем детоксикації ксенобіотиків в ендоплазматичному ретикулумі клітин чи ферментів антиоксидантного захисту, що, в свою чергу, призведе до модифікації токсичного впливу хімічних сполук на клітини і тканини. Можлива також сумісна прооксидантна дія наночастинок і більшості хімічних токсикантів.

Дані щодо потенціювання токсичного ефекту хімічних сполук при їх попаданні в організм разом з наночастинками також були отримані в роботах [287-290]. X. Yan et al. [287] досліджували спільний вплив наночастинок ZnO та популярного фосфорорганічного інсектициду диметоату на біохімічні параметри сироватки, оксидативний стрес і гістопатологічні зміни у мишей. Автори показали, що наночастинки ZnO в низьких дозах безпечні для застосування, однак у разі спільного впливу з диметоатом виникає серйозне

ураження гепатоцитів, що зумовлено посиленням накопиченням наночастинок і хімічного токсиканта у печінці мишей. Одночасне введення наночастинок і диметоату підвищувало концентрацію останнього в тканинах печінки на 42 %, що призводило до зниження активності холінестерази і різкого посилення оксидативного стресу. Також сумісне застосування наночастинок і токсиканта призводило до достовірного підвищення активностей амінотрансфераз, лужної фосфатази, лактатдегідрогенази порівняно з групами тварин, яким досліджувані чинники вводилися окремо. Біохімічні порушення корелювали з морфологічними змінами – одночасне введення наночастинок ZnO та диметоату викликало більше патологічних структурних пошкоджень у печінці, ніж введення або окремо наночастинок, або окремо диметоату. Автори пояснюють такий синергізм токсичності даних середників тим, що сумісне їх застосування призводить до підвищення системної концентрації хімічного токсиканта в органах тварин, що, очевидно, зумовлено «провідниковим» ефектом наночастинок.

Подібно інтерпретують синергізм токсичності наночастинок і хімічних токсикантів А. Glinski et al. в роботі [288], в якій було досліджено вплив наночастинок срібла і хлорорганічних пестицидів на перитонеальні макрофаги. Асоціація наночастинок і пестицидів показала суттєво вищу токсичність, ніж кожен з досліджуваних чинників окремо, що проявлялося морфологічними змінами, підвищенням рівня оксиду азоту та фагоцитарного індексу. Автори пояснюють таке підвищення токсичності механізмом «троянського коня», тобто тим фактом, що наночастинки срібла можуть доставляти хімічні сполуки всередину клітин.

В роботах [289, 290] продемонстровано здатність наночастинок оксиду титану адсорбувати інсектицид циперметрин, в результаті чого підвищувалося накопичення останнього в органах щура чи рибок даніо при сумісному попаданні в організм даних середників. Комбінація наночастинок оксиду титану і циперметрину знижувала активність глутатіонпероксидази і

каталази, одночасно збільшуючи вміст малонового діальдегіду, активність лактатдегідрогенази та інтенсивність апоптозу у щурів у достовірно вищому ступені, ніж застосування наночастинок чи інсектициду окремо [0048]. Наночастинки оксиду титану посилювали індуковану циперметрином нейротоксичність у рибок данію. Комбіновані токсикологічні ефекти проявлялися посиленням утворенням активних форм кисню, зниженням рухової активності, посиленням пригніченням експресії мРНК специфічних генів нейромедіаторів, інгібуванням дофаміну, ГАМК і серотоніну [290].

Отже, крім того, що наночастинок самі можуть проявляти токсичність, вони, як правило, реагують з іншими токсикантами навколишнього середовища, що може призвести до невідомих токсикологічних взаємодій в клітинах. Тому дослідження оцінки ризику наночастинок не повинні зосереджуватися лише на властивій їм токсичності, але також необхідно розглядати можливі їх взаємодії з існуючими речовинами, забруднюючими довкілля. Отримані нами дані можна використовувати для оцінки ризиків для здоров'я спільного впливу наночастинок оксиду цинку і популярного гербіциду гліфосату. Результати нашої роботи свідчать про те, що у зв'язку із зростаючим використанням у світі нанотехнологій, необхідно найретельніше звернути увагу на комбіновану токсичність наночастинок і пестицидів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуального наукового завдання, яке полягає у з'ясуванні біохімічних і морфологічних механізмів інтегральних ефектів токсичності наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату та оцінці загальних ризиків для здоров'я, пов'язаних з одночасним введенням в організм наноматеріалів і хімічних речовин.

1. Інтрагастральне введення щурам наночастинок ZnO в дозі 100 мг/кг протягом 14 днів призводить до підвищення активності АлАТ і АсАТ в 1,27 і 1,34 раза ($p < 0,05$). Введення гліфосату в дозі 250 мг/кг протягом 14 днів викликає цитоліз гепатоцитів, холестаза, порушення синтетичної та екскреторної функцій печінки: активність АлАТ і АсАТ в сироватці крові зростає в 1,8 і 1,7 раза, лужної фосфатази – в 1,4 раза, рівень загального білірубіну – в 1,9 раза, креатиніну – в 1,4 раза, вміст білка зменшується на 13 %, сечовини – в 1,4 раза ($p < 0,05$). При застосуванні наночастинок сумісно з гліфосатом активність амінотрансфераз, лужної фосфатази і вміст білірубіну достовірно підвищуються порівняно з щурами, яким вводили тільки наночастинок чи тільки гліфосат.

2. Наночастинок ZnO підвищують інтенсивність процесів вільнорадикального окислення ліпідів і білків та пригнічують антиоксидантну систему організму: у сироватці вміст ТБК-активних продуктів збільшувався на 23 %, карбонільних груп протеїнів – на 45-66 %, церулоплазміну – на 14 %, активність каталази знижувалася на 22 %, в печінці активність супероксиддисмутази зменшувалася в 1,3 раза, каталази – в 1,4 раза ($p < 0,05$). Застосування гліфосату призводить до ще більш вираженого оксидативного стресу. Наночастинок ZnO посилюють прооксидні властивості гліфосату – у тварин, яким вводили наночастинок

сумісно з гліфосатом зміни досліджуваних показників були достовірно вираженішими порівняно з групою тварин, яким вводили тільки гербіцид.

3. Введення тваринам наночастинок ZnO достовірно впливає на функціонування системи синтезу оксиду азоту (у печінці підвищується загальна активність NO-синтази, в крові – вміст метаболітів NO). Нітрооксидативний стрес є важливим патогенетичним механізмом розвитку інтоксикації гліфосатом – активність NO синтази в печінці зростає в 1,7 раза, рівень нітратів і нітритів в сироватці – в 1,8 раза ($p < 0,05$). Наночастинки потенціюють негативний ефект гліфосату на систему синтезу оксиду азоту (активність NO-синтази та вміст NO_x при поєднаному застосуванні наночастинок і гліфосату достовірно зростає порівняно з аналогічними показниками у тварин, яким вводили тільки гербіцид).

4. Застосування наночастинок ZnO не впливає достовірно на цитокіновий профіль сироватки крові тварин. При інтоксикації гліфосатом спостерігається суттєвий дисбаланс цитокінів (рівні прозапальних ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6 достовірно підвищуються (відповідно у 3,5, 4,8 і 3,3 раза), а антизапальних ІЛ-4 та ІЛ-10, навпаки, знижуються (в 1,5 і 1,4 раза)). Наночастинки посилюють токсичний ефект гліфосату на цитокіновий профіль, про що свідчить той факт, що рівень прозапальних цитокінів у тварин, яким сумісно вводилися досліджувані чинники був достовірно вищим, а протизапальних – достовірно нижчим, ніж такий у тварин, яким вводили тільки гербіцид.

5. Введення тваринам наночастинок ZnO не впливає на утворення активних форм кисню нейтрофільними лейкоцитами крові та кількість клітин зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом. Застосування гліфосату зумовлює інтенсифікацію (в 1,9 раза, $p < 0,05$) генерації активних форм кисню нейтрофілами, а також підвищення (в 1,7 раза, $p < 0,05$) кількості нейтрофілів зі зниженим мітохондріальним потенціалом. Наночастинок ZnO посилюють здатність гліфосату підвищувати продукцію

внутрішньоклітинних радикалів кисню і знижувати потенціал мітохондріальних мембран.

6. Наночастинки ZnO суттєво не впливають на інтенсивність апоптичних і некротичних процесів в нейтрофільних лейкоцитах крові. Введення тваринам гліфосату достовірно підвищує кількість лейкоцитів, в яких активуються процеси апоптозу (в 1,9 раза) та некрозу (в 1,6 раза). Наночастинки ZnO посилюють здатність хімічного токсиканта підвищувати кількість апоптично та некротично змінених нейтрофілів крові.

7. Застосування наночастинок ZnO достовірно підвищує в мікосомальній фракції печінки активність ферментів біотрансформації ксенобіотиків – етоксирезорурфін О-деетилази (в 1,9 раза) і УДФ-глюкуронілтрансферази (в 1,4 раза). Гліфосат призводить до ще більшої активізації даних ферментів, а також до пригнічення активності (в 1,8 раза, $p < 0,05$) ферменту II-ї фази детоксикації ксенобіотиків – глутатіонтрансферази. Максимальні зміни показників функціонування ферментативної системи біотрансформації ксенобіотиків спостерігаються у тварин, яким вводили гліфосат разом з наночастинками ZnO.

8. Введення тваринам наночастинок ZnO призводить до незначних пристосувальних змін судинного та паренхіматозного компонентів печінки, нирок і селезінки. Застосування гербіциду гліфосату викликає суттєві судинні розлади (розширення і повнокров'я вен, спазмування просвітів міжчасточкових артерій, явища тромбозу та складж феномену еритроцитів) та порушення гістоархітекtonіки (порушення балкового розміщення гепатоцитів, втрата контурів каріолеми, ознаки вакуольної дистрофії цитоплазми, гіпертрофія ниркових тілець, звуження просвіту капсули, набряк та дистрофія нефроцитів, підвищена гідратація основної речовини сполучної тканини селезінки, деструктуризація білої пульпи) досліджуваних органів. У тварин, яким одночасно вводили токсикант гліфосат та наночастинки оксиду цинку, спостерігається їх синергічний ефект – судинні,

деструктивно-дегенеративні та запальні зміни структурних компонентів органів були найбільш значними порівняно з іншими експериментальними групами.

9. Наночастинки ZnO посилюють токсичні ефекти популярного гербіциду гліфосату на різні органи. При оцінюванні ризику наночастинок для здоров'я людини необхідно розглядати можливість їх взаємодії з хімічними сполуками – забруднюючими довкілля. Дану обставину необхідно враховувати при гігієнічному нормуванні наночастинок оксиду цинку в об'єктах навколишнього середовища.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine / S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi et al. *Molecules*. 2019. Vol. 25, № 1. P. 112.
2. He X., Deng H., Hwang H. M. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *J. Food Drug Anal.* 2019. Vol. 27, № 1, P. 1–21.
3. Czyzowska, A., Barbasz A. A review: Zinc oxide nanoparticles — Friends or enemies? *International Journal of Environmental Health Research*. 2020. Vol. 32. P. 885–901.
4. Faizan M., Hayat S., Pichtel, J. Effects of zinc oxide nanoparticles on crop plants: A perspective analysis. *Sustainable agriculture reviews*. 2020. Vol. 41, P. 83–99.
5. Beneficial and toxicological aspects of zinc oxide nanoparticles in animals / H. S. Rahman, H. H. Othman, R. Abdullah et al. *Vet. Med. Sci.* 2022. Vol. 8, № 4. P. 1769–1779.
6. Newman M. D., Stotland M., Ellis J. I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxidebased sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009. Vol. 61, № 4. P. 685–692.
7. Jiang J., Pi J., Cai J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2018. Vol. 5, P. 1–19.
8. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications / J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, D. G. Wingett. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010. Vol. 7, № 9. P. 1063–1077.
9. Zhang Z. Y., Xiong H. M. Photoluminescent ZnO nanoparticles and their biological applications. *Materials (Basel)*. 2015. Vol. 8, № 6. P. 3101–3127.

10. Xiong H. M. ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. *Advanced Materials*. 2013. Vol. 25, № 37. P. 5329–5335.

11. Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology / C. Egbuna, V. K. Parmar, J. Jeevanandam et al.. *J. Toxicol.* 2021. Vol. 2021. P. 9954443.

12. Ibrahim D., Ali H. A., El-Mandrawy S. A. Effects of different zinc sources on performance, biodistribution of minerals and expression of genes related to metabolism of broiler chickens. *Zagazig Veterinary Journal*. 2017. Vol. 45, № 3. P. 292–304.

13. Effects of long-term exposure to zinc oxide nanoparticles on development, zinc metabolism and biodistribution of minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in mice / C. Wang, J. Lu, J. L. Le Zhou et al. *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 10. P. 1–14.

14. In vitro cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in mouse ovarian germ cells / M. Saber, R. S. Hayaei-Tehrani, S. Mokhtari et al. *Toxicology in Vitro*. 2021. Vol. 70. P. 105032.

15. Behavioral effects of zinc oxide nanoparticles on the brain of rats / A. Rahdar, M. R. Hajinezhad, M. Bilal et al. *Inorganic Chemistry Communications*. 2020. Vol. 119. P. 108131.

16. Subchronic effects of different doses of zinc oxide nanoparticle on reproductive organs of female rats: An experimental study / H. S. Mohammad, M. A. Hossein, R. Amani et al. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2019. Vol. 17, № 2, P. 107–118.

17. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles / X. Zhang, H. Sun, Z. Zhang et al. *Chemosphere*. 2007. Vol. 67, № 1. P. 160–166.

18. Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite / H. Sun, X. Zhang, Z. Zhang et al. *Environ. Pollut.* 2009. Vol. 157, № 4. P. 1165–1170.

19. Pesticides and herbicides / B. S. Choudri, Y. Charabi, N. Al-Nasiri, Al-T. Awadhi. *Water Environ Res.* 2020. Vol. 92, № 10. P. 1425–1432.

20. Gill J. P. K., Sethi N., Mohan A. Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. *Environ. Chem. Lett.* 2017. Vol. 15. P. 85–100.

21. Degradation dynamics of glyphosate in different types of citrus orchard soils in China / C. Zhang, X. Hu, J. Luo et al. *Molecules.* 2015. Vol. 20. P. 1161–1175.

22. Dill G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest. Manag. Sci.* 2005. Vol. 61, № 3. P. 219–224.

23. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms—A stable isotope co-labeling approach / S. Wang, B. Seiwert, M. Kästner et al. *Water Res.* 2016. Vol. 99. P. 91–100.

24. Gut microbiota and neurological effects of glyphosate / L. Rueda-Ruzafa, F. Cruz, P. Roman, D. Cardona. *Neurotoxicology.* 2019. Vol. 75. P. 1–8.

25. Glyphosate-Based Herbicides Potently Affect Cardiovascular System in Mammals: Review of the Literature / S. Gress, S. Lemoine, G.-E. Séralini, P. E. Puddu. *Cardiovasc. Toxicol.* 2015. Vol. 15. P. 117–126.

26. Electrocardiographic abnormalities associated with acute glyphosate toxicity / R. Brunetti, J. A. Maradey, R. S. Dearmin et al. *Hear. Case Rep.* 2020. Vol. 6. P. 63–66.

27. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide / R. Mesnage, G. Renney, G. E. Séralini et al. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 1–15.

28. Glyphosate and AMPA of agricultural soil, surface water, groundwater and sediments in areas prevalent with chronic kidney disease of unknown etiology, Sri Lanka / S. Gunarathna, B. Gunawardana, M. Jayaweera et al. *J. Environ. Sci. Health Part B.* 2018. Vol. 53. P. 729–737.

29. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. *Agência Internacional para a Investigação do Cancro*. Lyon, France. 2017. Vol. 112, P. 321–412.
30. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits / R. Mesnage, N. Defarge, J. Spiroux de Vendômois, G. E. Séralini. *Food Chem. Toxicol.* 2015. Vol. 84. P. 133–153.
31. Effects of ZnO Nanoparticles on Dimethoate-Induced Toxicity in Mice / X. Yan, R. Rong, S. Zhu et al. *J Agric Food Chem.* 2015. Vol. 63, № 37. P. 8292–8298.
32. The combined effect of titanium dioxide nanoparticles and cypermethrin on male reproductive toxicity in rats / Y. Li, M. Zhong, X. He et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2023. Vol. 30, № 9. P. 22176–22187.
33. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability and neurotoxicity of cypermethrin in zebrafish larvae / M. Li, Q. Wu, Q. Wang et al. *Aquat. Toxicol.* 2018. Vol. 199, P. 212–219.
34. Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages / A. Glinski, S. Liebel, È. Pelletier et al. *Toxicol Mech Methods.* 2016. Vol. 26, № 4. P. 251–259.
35. Increased ZnO nanoparticle toxicity to wheat upon co-exposure to phenanthrene / J. Zhu, Z. Zou, Y. Shen et al. *Environ. Pollut.* 2019. Vol. 247. P. 108–117.
36. Mirzaei H., Darroudi M. Zinc oxide nanoparticles: biological synthesis and biomedical applications. *Ceramics International.* 2017. Vol. 43, № 1. P. 907–914.
37. Nanoparticles applied to plant science: a review / S. C. C. Arruda, A. L. D. Silva, R. M. Galazzi et al. *Talanta.* 2015. Vol. 131. P. 693–705.
38. A review on ZnO nanostructured materials: energy, environmental and biological applications / J. Theerthagiri, S. Salla, R. A. Senthil et al. *Nanotechnology.* 2019. Vol. 30, № 39. P. 392001.

39. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications / P. K. Mishra, H. Mishra, A. Ekielski et al. *Drug Discovery Today*. 2017. Vol. 22, № 12. P. 1825–1834.

40. Smijs T. G., Pavel S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology Science and Applications*. 2011. Vol. 4. P. 95–112.

41. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review / J. A. Ruszkiewicz, A. Pinkas, B. Ferrer et al. *Toxicology Reports*. 2017. Vol. 4. P. 245–259.

42. Kolodziejczak-Radzimska A., Jesionowski T. Zinc oxide—from synthesis to application: a review. *Materials*. 2014. Vol. 7, № 4. P. 2833–2881.

43. Effect of zinc oxide nanoparticles as cure activator on the properties of natural rubber and nitrile rubber / S. Sahoo, M. Maiti, A. Ganguly et al. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007. Vol. 105, № 4. P. 2407–2415.

44. Osmond M. J., McCall M. J. Zinc Oxide Nanoparticles in Modern Sunscreens: An Analysis of Potential Exposure and Hazards. *Nanotoxicology*. 2010. Vol. 4, № 1. P. 15-41.

45. Zinc oxide nanostructure modified textile and its application to biosensing, photocatalysis, and as antibacterial material / A. Hatamie, A. Khan, M. Golabi et al. *Langmuir*. 2015. Vol. 31, № 39. P. 10913–10921.

46. Spatially branched hierarchical ZnO nanorod-TiO₂ nanotube array heterostructures for versatile photocatalytic and photoelectrocatalytic applications: towards intimate integration of 1D-1D hybrid nanostructures / F. X. Xiao, S. F. Hung, H. B. Tao et al. *Nanoscale*. 2014. Vol. 6, № 24. P. 14950–14961.

47. Barui A. K., Kotcherlakota R., Patra C. R. Chapter 6 – Biomedical applications of zinc oxide nanoparticles, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu. *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*. William Andrew Publishing, 2018. P. 239–278.

48. Krol A., Pomastowski P., Rafinska K., Railean-Plugaru V., Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017. Vol. 249. P. 37-52.

49. Bacterial exopolysaccharide (EPS)-coated ZnO nanoparticles showed high antibiofilm activity and larvicidal toxicity against malaria and Zika virus vectors / M. Abinaya, B. Vaseeharan, M. Divya et al. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2018. Vol. 45. P. 93–103.

50. Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster* / C. T. Ng, L. Q. Yong, M. P. Hande et al. *Int. J. Nanomedicine*. 2017. Vol. 28, № 12. P. 1621–1637.

51. Development and characterization of metal oxide nanoparticles for the delivery of anticancer drug / H. Sharma, K. Kumar, C. Choudhary et al. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016. Vol. 44, № 2. P. 672–679.

52. Biomedical applications of zinc oxide nanomaterials / Y. Zhang, T. R. Nayak, H. Hong, W. Cai. *Current molecular medicine*. 2013. Vol. 13, № 10. P. 1633–1645.

53. Martinez-Carmona M., Gun'ko Y., Vallet-Regi M. ZnO nanostructures for drug delivery and theranostic applications. *Nanomaterials*. 2018. Vol. 8, № 4. P. 268.

54. Stowe D. F., Camara A. K. S. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2009. Vol. 11, № 6. P. 1373–1414.

55. Transferrin targeted liposomal 5-fluorouracil induced apoptosis via mitochondria signaling pathway in cancer cells / E. Moghimipour, M. Rezaei, Z. Ramezani et al. *Life Sciences*. 2017. Vol. 194. P. 104–110.

56. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases / C. Y. Guo, L. Sun, X. P. Chen, D. S. Zhang. *Neural Regeneration Research*. 2013. Vol. 8, № 21. P. 2003–2014.

57. Sharma V., Anderson D., Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*. 2012. Vol. 17, № 8. P. 852–870.

58. Eco-friendly formulated zinc oxide nanoparticles: induction of cell cycle arrest and apoptosis in the MCF-7 cancer cell line / A. B. Moghaddam, M. Moniri, S. Azizi et al. *Genes*. 2017. Vol. 8, № 10. P. 281.

59. Chandrasekaran M., Pandurangan M. In vitro selective anti-proliferative effect of zinc oxide nanoparticles against co-cultured C2C12 myoblastoma cancer and 3T3-L1 normal cells. *Biological Trace Element Research*. 2016. Vol. 172, № 1. P. 148–154.

60. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation / K. N. Yu, T. J. Yoon, A. Minai-Tehrani et al. *Toxicology in Vitro*. 2013. Vol. 27, № 4. P. 1187–1195.

61. Nanoparticle-induced photocatalytic head and neck squamous cell carcinoma cell death is associated with autophagy / S. Hackenberg, A. Scherzed, A. Gohla et al. *Nanomedicine*. 2014. Vol. 9, № 1. P. 21–33.

62. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells / D. P. Bai, X. F. Zhang, G. L. Zhang et al. *International Journal of Nanomedicine*. 2017. Vol. 12. P. 6521–6535.

63. Zinc oxide nanoparticle energy band gap reduction triggers the oxidative stress resulting into autophagy-mediated apoptotic cell death / M. Arakha, J. Roy, P. S. Nayak et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. Vol. 110. P. 42–53.

64. Zinc oxide nanoparticles harness autophagy to induce cell death in lung epithelial cells / J. Zhang, X. Qin, B. Wang et al. *Cell Death and Disease*. 2017. Vol. 8, № 7. P. e2954.

65. Erathodiyil N., Ying J. Y. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications. *Accounts of Chemical Research*. 2011. Vol. 44, № 10. P. 925–935.

66. Novel ZnO hollow-nanocarriers containing paclitaxel targeting folatereceptors in a malignant pH-microenvironment for effective monitoring and promoting breast tumor regression / N. Puvvada, S. Rajput, B. N. Kumar et al. *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5, № 1. Article 11760.

67. Exploration of zinc oxide nanoparticles as a multitarget and multifunctional anticancer nanomedicine / J. Wang, J. S. Lee, D. Kim, L. Zhu. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2017. Vol. 9, № 46. P. 39971–39984.

68. Functionalization of ZnO nanoparticles by 3-mercaptopropionic acid for aqueous curcumin delivery: synthesis, characterization, and anticancer assessment / S. B. Ghaffari, M. H. Sarrafzadeh, Z. Fakhroueian et al. *Materials Science and Engineering: C*. 2017. Vol. 79. P. 465–472.

69. The effects of baicalein or baicalin on the colloidal stability of ZnO nanoparticles (NPs) and toxicity of NPs to Caco-2 cells / Y. Li, C. Zhang, L. Liu et al. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2017. Vol. 28, № 3. P. 167–176.

70. Synthesis and characterization of doxorubicin modified ZnO/PEG nanomaterials and its photodynamic action / R. Hariharan, S. Senthilkumar, A. Suganthi, M. Rajarajan . *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012. Vol. 116. P. 56–65.

71. Deng Y. Zhang H. The synergistic effect and mechanism of doxorubicin-ZnO nanocomplexes as a multimodal agent integrating diverse anticancer therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*. 2013. Vol. 8. P. 1835–1841.

72. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation / N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia et al. *Chemical Society Reviews*. 2012. Vol. 41, № 7. P. 2971–3010.

73. Zinc oxide nanoparticles induce lipoxygenase-mediated apoptosis and necrosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells / K. Jun-Hyung, S. J. Myeong, K. Dong-Yung et al. *Neurochemistry International*. 2015. Vol. 90. P. 204–214.

74. Green synthesis, characterization, and anticancer activity of hyaluronan/zinc oxide nanocomposite / F. Namvar, S. Azizi, H. S. Rahman et al. *OncoTargets and therapy*. 2016. Vol. 9. P. 4549–4559.

75. Synergistically enhanced photocatalytic and chemotherapeutic effects of aptamerfunctionalized ZnO nanoparticles towards cancer cells / Z. Han, X. Wang, C. Heng et al. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015. Vol. 17, № 33. P. 21576–21582.

76. Ma Y. Y., Ding H., Xiong H. M. Folic acid functionalized ZnO quantum dots for targeted cancer cell imaging. *Nanotechnology*. 2015. Vol. 26, № 30. Article 305702.

77. PEG functionalized zinc oxide nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen speciesdependent impairment of DNA damage repair enzyme NEIL2 / S. Chakraborti, S. Chakraborty, S. Saha et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. Vol. 103. P. 35–47.

78. Zhang Z. Y., Xiong H. M. Photoluminescent ZnO nanoparticles and their biological applications. *Materials*. 2015. Vol. 8, № 6. P. 3101–3127.

79. Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review / L. E. Shi, Z. H. Li, W. Zheng et al. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 2014. Vol. 31, № 2. P. 173–186.

80. Role of physical and chemical interactions in the antibacterial behavior of ZnO nanoparticles against *E. coli* / Y. Jiang, L. Zhang, D. Wen, Y. Ding. *Materials Science and Engineering: C*. 2016. Vol. 69. P. 1361–1366.

81. Antibacterial effect of chronic exposure of low concentration ZnO nanoparticles on *E. coli* / R. K. Dutta, B. P. Nenavathu, M. K. Gangishetty, A. V. Reddy. *Journal of Environmental Science and Health: Part A*. 2013. Vol. 48, № 8. P. 871–878.

82. Interaction of biologically relevant proteins with ZnO nanomaterials: Aconfounding factor for in vitro toxicity endpoints / E. Da. Silva, Y. Kembouchea, U. Tegnera et al. *Toxicology in Vitro*. 2019. Vol. 56. P. 41–51.

83. Ohira T., Yamamoto O. Correlation between antibacterial activity and crystallite size on ceramics. *Chemical Engineering Science*. 2012. Vol. 68, № 1. P. 355–361.

84. The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* ToxR protein / T. Chatterjee, S. Chakraborti, P. Joshi et al. *FEBS Journal*. 2010. Vol. 277, № 20. P. 4184–4194.

85. Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* / W. Salem, D. R. Leitner, F. G. Zingl et al. *International Journal of Medical Microbiology*. 2015. Vol. 305, № 1. P. 85–95.

86. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype / S. Sarwar, S. Chakraborti, S. Bera et al. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016. Vol. 12, № 6. P. 1499–1509.

87. Zinc oxide nanoparticles provide anti-cholera activity by disrupting the interaction of cholera toxin with the human GM1 receptor / S. Sarwar, A. Ali, M. Pal, P. Chakrabarti. *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, № 44. P. 18303–18311.

88. Nazarizadeh A., Asri-Rezaie S. Comparative study of antidiabetic activity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in diabetic rats. *AAPS Pharm. SciTech*. 2016. Vol. 17, № 4. P. 834–843.

89. Umrani R. D., Paknikar K. M. Zinc oxide nanoparticles show antidiabetic activity in streptozotocin-induced Type 1 and 2 diabetic rats. *Nanomedicine*. 2014. Vol. 9, № 1. P. 89–104.

90. Zinc deficiency and cell-mediated and humoral autoimmunity of insulin-dependent diabetes in thalassemic subjects / R. Malizia, A. Scorsone, P. D'Angelo et al. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism: JPEM*. 1998. Vol. 11, № 3. P. 981–984.

91. ZnO nanoparticles red sandalwood conjugate: a promising anti-diabetic agent / R. Kitture, K. Chordiya, S. Gaware et al. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015. Vol. 15, № 6. P. 4046–4051.

92. Biocompatible zinc oxide nanocrystals stabilized via hydroxyethyl cellulose for mitigation of diabetic complications / J. Hussein, M. El-Banna, T. A. Razik, M. E. El-Naggar. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 107. P. 748–754.

93. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 beta generation / L. Ferrero-Miliani, O. H. Nielsen, P. S. Andersen, S. E. Girardin. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006. Vol. 147, № 2. P. 227–235.

94. Skin-protective effects of a zinc oxide-functionalized textile and its relevance for atopic dermatitis / C. Wiegand, U. C. Hipler, S. Boldt et al. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2013. Vol. 2013. P. 115–121.

95. Topically applied ZnO nanoparticles suppress allergen induced skin inflammation but induce vigorous IgE production in the atopic dermatitis mouse model / M. Ilves, J. Palomaki, M. Vippola et al. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014. Vol. 11, № 1. P. 38.

96. Antioxidant and antiinflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract / P. C. Nagajyothi, S. J. Cha, I. J. Yang et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*. 2015. Vol. 146. P. 10–17.

97. Biomedical applications of functionalized ZnO nanomaterials: from biosensors to bioimaging / P. Zhu, Z. Weng, X. Li et al. *Advanced Materials Interfaces*. 2016. Vol. 3, № 1. article 1500494.

98. Photo-mediated green synthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using aqueous extracts of two mangrove plant species, *Heritiera fomes* and *Sonneratia apetala* and investigation of their biomedical applications / P. Tatoi,

R. G. Kerry, S. Gouda et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016. Vol. 163. P. 311–318.

99. Stable aqueous ZnO polymer core-shell nanoparticles with tunable photoluminescence and their application in cell imaging / H. M. Xiong, Y. Xu, Q. G. Ren, Y. Y. Xia. *Journal of the American Chemical Society*. 2008. Vol. 130, № 24. P. 7522–7523.

100. Jiang H., Wang H., Wang X. Facile and mild preparation of fluorescent ZnO nanosheets and their bioimaging applications. *Applied Surface Science*. 2011. Vol. 257, № 15. P. 6991–6995.

101. Synthesis of ZnO nanoparticles with tunable emission colors and their cell labeling applications / X. Tang, E. S. G. Choo, L. Li et al. *Chemistry of Materials*. 2010. Vol. 22, № 11. P. 3383–3388.

102. Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo / M. Ghosh, S. Sinha, M. Jothiramajayam et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2016. Vol. 97. P. 286–296.

103. Serum biochemical and histopathological changes in liver and kidney in lambs after zinc oxide nanoparticles administration / H. Najafzadeh, S. Ghoreishi, B. Mohammadian et al. *VeterinaryWorld*. 2013. Vol. 6, № 8. P. 534–537.

104. Talebi A. R., Khorsandi L., Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013. Vol. 30, № 9. P. 1203–1209.

105. Effect of zinc oxide nanoparticles on cellular oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in mouse liver / S. Syama, S. Reshma, P. Sreekanth et al. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2013. Vol. 95, № 3. P. 495–503.

106. Zinc oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in

macrophages and adult mice / R. Pati, I. Das, R. K. Mehta et al. *Toxicological Sciences*. 2016. Vol. 150, № 2. P. 454–472.

107. Zinc Oxide Particles Can Cause Ovarian Toxicity by Oxidative Stress in Female Mice Model / Y. Xu, Y. Zhao, S. Liu et al. *International Journal of Nanomedicine*. 2022. Vol. 17. P. 4947–4960.

108. Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo / M. Ghosh, S. Sinha, M. Jothiramajayam et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2016. Vol. 97. P. 286–296.

109. Rat pancreatitis produced by 13-week administration of zinc oxide nanoparticles: Biopersistence of nanoparticles and possible solutions / S. H. Seok, W. S. Cho, J. S. Park et al. *Journal of Applied Toxicology*. 2013. Vol. 33, № 10. P. 1089–1096.

110. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in rats treated by two different routes: Single intravenous injection and single oral administration / J. S. Choi, H. Kim, P. Kim et al. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2015. Vol. 78, № 4. P. 226–243.

111. A 90-day study of subchronic oral toxicity of 20nmpositively charged zinc oxide nanoparticles in Sprague Dawley rats / H. S. Park, S. J. Kim, T. J. Lee et al. *International Journal of Nanomedicine*. 2014. Vol. 9, № 2. P. 93–107.

112. Toxicity of zinc oxide nanoparticles on adult male Wistar rats / R. Abbasalipourkabir, H. Moradi, S. Zarei et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2015. Vol. 84. P. 154–160.

113. Zinc oxide nanoparticles induce renal toxicity through reactive oxygen species / L. Xiao, C. Liu, X. Chen, Z. Yang. *Food and Chemical Toxicology*. 2016. Vol. 90. P. 76–83.

114. A review of critical factors for assessing the dermal absorption of metal oxide nanoparticles from sunscreens applied to humans, and a research strategy to

address current deficiencies / B. Gulson, M. J. McCall, D. M. Bowman, T. Pinheiro. *Arch Toxicol.* 2015. Vol. 89, № 11. P. 1909-1930.

115. Nano-zinc oxide damages spatial cognition capability via over-enhanced long-term potentiation in hippocampus of Wistar rats / D. Han, Y. Tian, T. Zhang et al. *International Journal of Nanomedicine.* 2011. Vol. 6. P. 1453–1461.

116. Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats / E. Jo, G. Seo, J. T. Kwon et al. *Journal of Toxicological Sciences.* 2013. Vol. 38, № 4. P. 525–530.

117. The influence of zinc oxide nanoparticles affects reproductive health development and biodistribution in rat offspring / E. Jo, G. Seo, J. T. Kwon et al. *J. Toxicol. Sci.* 2013. Vol. 38. P. 525–530.

118. NMRbased metabolomics to determine acute inhalation effects of nano- and fine-sized ZnO particles in the rat lung / S. H. Lee, T. Y. Wang, J. H. Hong et al. *Nanotoxicology.* 2016. Vol. 10, № 7. P. 924–934.

119. Costas-Ferreira C., Durán R., Faro L. R. F. Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2022 Vol. 23, № 9. P. 4605.

120. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: a critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies / M. E. Báez, E. Fuentes, M. J. Espina, J. Espinoza. *J. Sep. Sci.* 2014. Vol. 37, № 21. P. 3125–3132.

121. Glyphosate in German adults—Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide / A. Conrad, C. Schröter-Kermani, H. W. Hoppe et al. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2017. Vol. 220. P. 8–16.

122. Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring toxicity and degradation: A review / S. Singh, V. Kumar, S. Datta et al. *Environ. Chem. Lett.* 2020. Vol. 18. P. 663–702.

123. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC / J. V. Tarazona, D. Court-Marques, M. Tiramani et al. *Arch Toxicol.* 2017. Vol. 91. P. 2723–2743.

124. Haslam E. The Shikimate Pathway: Biosynthesis of Natural Products Series. London : Butterworths -Heinemann, 2015. 326 p.

125. Recent advances in glyphosate biodegradation / H. Zhan, Y. Feng, X. Fan, S. Chen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. Vol. 102, № 12. P. 5033–5043.

126. New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity / F. Hadi, A. Mousavi, K. A. Noghabi et al. *J. Environ. Sci. Health – Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* 2013. Vol. 48. P. 208–213.

127. Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazonia / J. M. Dos Santos Teixeira, V. da Silva Lima, F. R. de Moura et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018. Vol. 25. P. 25383–25389.

128. Annett R., Habibi H. R., Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 2014. Vol. 34. P. 458–479.

129. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality / I. Hanke, I. Wittmer, S. Bischofberger et al. *Chemosphere.* 2010. Vol. 81. P. 422–429.

130. Shushkova T., Ermakova I., Leontievsky A. Glyphosate bioavailability in soil. *Biodegradation.* 2010. Vol. 21. P. 403–410.

131. Degradation of glyphosate in soil photocatalyzed by Fe₃O₄/SiO₂/TiO₂ under solar light / X. Xu, F. Ji, Z. Fan, L. He. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2011. Vol. 8. P. 1258–1270.

132. FAO/WHO. Pesticide Residues in Food 2016. Rome, 2017. URL: <https://www.fao.org/3/I6926EN/bookmarks-i6926en.pdf>

133. Williams G. M., Kroes R., Munro I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2000. Vol. 31. P. 117–165.

134. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 2016. Vol. 13, № 11. P. 4302.

135. Glyphosate residues in Swiss market foods: Monitoring and risk evaluation / O. Zoller, P. Rhy, H. Rupp et al. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* 2018. Vol. 11. P. 83–91.

136. Fast analysis of glufosinate, glyphosate and its main metabolite, aminomethylphosphonic acid, in edible oils, by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry / M. Chiarello, M. L. Jiménez-Medina, J. Marín Saéz et al. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2019. Vol. 36. P. 1376–1384.

137. Van Eenennaam A. L., Young A. E. Detection of dietary DNA, protein, and glyphosate in meat, milk, and eggs. *J. Anim. Sci.* 2017. Vol. 95. P. 3247–3269.

138. Food Safety Commission of Japan Glyphosate. Glyphosate: Summary. *Food Saf.* 2016. Vol. 4. P. 93–102.

139. Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease / J. R. Richardson, A. Roy, S. L. Shalat et al. *JAMA Neurol.* 2014. Vol. 71. P. 284–290.

140. Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate / D. L. Bernal-Rey, C. G. Cantera, M. Santos Afonso et al. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. Vol. 187. P. 109673.

141. Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory / C. E. Gallegos, C. J. Baier, M. Bartos et al.. *Neurotox. Res.* 2018. Vol. 34. P. 363–374.

142. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity /

D. Cattani, V. L. de Liz Oliveira Cavalli, C. E. Heinz Rieg et al. *Toxicology*. 2014. Vol. 320. P. 34–45.

143. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure / M. A. Martínez, I. Ares, J. L. Rodríguez et al. *Environ. Res.* 2018. Vol. 161. P. 212–219.

144. Intranasal glyphosate-based herbicide administration alters the redox balance and the cholinergic system in the mouse brain / C. E. Gallegos, M. Bartos, F. Gumilar et al. *Neurotoxicology*. 2020. Vol. 77. P 205–215.

145. Martinez A., Al-Ahmad A. J. Effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid on an isogeneic model of the human blood-brain barrier. *Toxicol. Lett.* 2019. Vol. 304. P 39–49.

146. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation / M. S. Balbuena, L. Tison, M. L. Hahn, U. Greggers. *J. Exp. Biol.* 2015. Vol. 218, № 17. P 2799–2805.

147. Soudani N., Chaâbane M., Ghorbel I. Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. *Gen. Physiol. Biophys.* 2019. Vol. 38. P 123–134.

148. Toxicity of glyphosate in feed for weanling piglets and the mechanism of glyphosate detoxification by the liver nuclear receptor CAR/PXR pathway / H. Fu, S. Qiu, X. Yao et al. *J. Hazard. Mater.* 2020. Vol. 387. P. 121707.

149. Nephrotoxicity of Kalach 360 SL: biochemical and histopathological findings / L. Hamdaoui, M. Naifar, M. Mzid et al. *Toxicol. Mech. Methods*. 2016. Vol. 26. P 685–691.

150. Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure / M. H. Li, L. Y. Ruan, J. W. Zhou et al. *Aquat. Toxicol.* 2017. Vol. 188. P 159–169.

151. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen* / C. R. Murussi, M. D. Costa, J. W. Leitemperger et al. *Fish Physiol.* 2016. Vol. 42. P 445–455.

152. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp / J. Ma, J. Zhu, W. Wang et al. *Environ. Pollut.* 2019. Vol. 252. P 1288–1300.

153. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat / P. Dai, P. Hu, J. Tang et al. *Acta Histochem.* 2016. Vol. 118. P 519–526.

154. Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats / F. Avdatek, Y. O. Birdane, R. Türkmen, H. H. Demirel. *Andrologia.* 2018. Vol. 50. P. e13036.

155. Exposure to a glyphosate-based herbicide formulation, but not glyphosate alone, has only minor effects on adult rat testis / H. K. L. Johansson, C. L. Schwartz, L. N. Nielsen et al. *Reprod. Toxicol.* 2018. Vol. 82. P. 25–31.

156. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses / X. Ren, R. Li, J. Liu et al.. *Environ. Pollut.* 2018. Vol. 243. P. 833–841.

157. Effects of melatonin in rats in the initial third stage of pregnancy exposed to sub-lethal doses of herbicides / L. L. De Almeida, A. A. C. Teixeira, A. F. Soares et al. *Acta Histochem.* 2017. Vol. 119. P. 220–227.

158. Eur. Food Saf. Auth. (EFSA). EFSA explains the carcinogenicity assessment of glyphosate. *EFSA J.* 2015. Vol. 13. P. 4302.

159. Peillex C., Pelletier M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology.* 2020. Vol. 17, № 1. P. 163–174.

160. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate / K. Z. Guyton, D. Loomis, Y. Grosse et al. *Lancet Oncol.* 2015. Vol. 16. P. 490–491.

161. Cancer incidence among glyphosateexposed pesticide applicators in the agricultural health study / A. J. De Roos, A. Blair, J. A. Rusiecki et al. *Environ. Health Perspect.* 2005. Vol. 113. P. 49–54.

162. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the agricultural health study / O. Landgren, R. A. Kyle, J. A. Hoppin et al. *Blood*. 2009. Vol. 113. P. 6386–6391.

163. Pesticide exposure as risk factor for non-^o Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis / M. Eriksson, L. Hardell, M. Carlberg, M. Akerman . *Int. J. Cancer*. 2008. Vol. 123. P. 1657–1663.

164. Activation of the N-methyl-d-aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis / H. Gao, J. Chen, F. Ding et al. *J. Appl. Toxicol.* 2019. Vol. 39. P. 1096–1107.

165. Oxidative stress, cholinesterase activity, ' and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate / M. Milic, S. Žunec, V. Micek et al. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2018. Vol. 69. P. 154–168.

166. Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original / F. R. Moura, K. R. Brentegani, A. Gemelli et al. *Chemosphere*. 2017. Vol. 185. P. 445–451.

167. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*) / W. Ge, S. Yan, J. Wang et al. *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63. P. 1856–1862.

168. Roy N. M., Carneiro B., Ochs J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016. Vol. 42. P. 45–54.

169. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro / M. Mladinic, S. Berend, A. L. Vrdoljak et al. *Environ. Mol. Mutagen.* 2009. Vol. 50. P. 800–807.

170. . Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate-Roundup using zebrafish (*Danio rerio*) as a model / G. Dal Santo, A. Grotto, A. A. Boligon et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018. Vol. 25. P. 11703–11715.

171. Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis* / Y. Hong, X. Yang, Y. Huang et al. *Chemosphere*. 2018. Vol. 210. P. 896–906.

172. Zhang J. W., Xu D. Q., Feng X. Z. The toxic effects and possible mechanisms of glyphosate on mouse oocytes. *Chemosphere*. 2019. Vol. 237. P. 124435.

173. Roundup confers cytotoxicity through DNA damage and mitochondria-associated apoptosis induction / Y. Hao, H. Chen, W. Xu et al. *Environ. Pollut.* 2019. Vol. 252. P. 917–923.

174. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp) / V. D. Sinhorin, A. P. Sinhorin, J. M. Teixeira et al. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014. Vol. 106. P. 181–187.

175. Sub-chronic exposure to Kalach 360 SL–induced damage in rats’ liver and hematological system / L. Hamdaoui, M. Naifar, F. Rahmouni et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. Vol. 26. P. 36634–36646.

176. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice / Y. A. Bali, N. E. Kaikai, S. Ba-M’hamed, M. Bennis. *Toxicology*. 2019. Vol. 415. P. 18–25.

177. Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets / S. Qiu, H. Fu, R. Zhou et al. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. Vol. 187. P. 109846.

178. Pala A. The effect of a glyphosate-based herbicide on acetylcholinesterase (AChE) activity, oxidative stress, and antioxidant status in freshwater amphipod: *Gammarus pulex* (Crustacean). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. Vol. 26. P. 36869–36877.

179. Modulation of antioxidant gene expressions by Roundup® exposure in the decapod *Macrobrachium potiana* / M. S. De Melo, E. M. Nazari,

Y. M. R. Müller, E. Gismondi. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. Vol. 190. P. 110086.

180. In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes / L. Luo, F. Wang, Y. Zhang et al. *J. Environ. Sci. Health B.* 2017. Vol. 52. P. 410–417.

181. Natural pyrethrins induce autophagy of HepG2 cells through the activation of AMPK/mTOR pathway / Y. Yang, J. Gao, Y. Zhang et al. *Environ. Pollut.* 2018. Vol. 241. P. 1091–1097.

182. Role of the mTOR signalling pathway in salivary gland development / M. Sakai, M. Fukumoto, K. Ikai et al. *FEBS J.* 2019. Vol. 286. P. 3701–3717.

183. Roundup-induced AMPK/mTOR-mediated autophagy in human A549 cells / Y. Hao, W. Xu, J. Gao et al. *J. Agric. Food Chem.* 2019. Vol. 67. P. 11364–11372.

184. Glyphosatebased herbicide impairs energy metabolism and increases autophagy in C6 astrogloma cell line / K. Neto da Silva, L. Garbin Cappellaro, C. N. Ueda et al. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2020. Vol. 83. P. 153–167.

185. Evaluation of apoptotic ' potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study) / M. Kwiatkowska, J. Michałowicz, P. Jarosiewicz et al. *Food Chem. Toxicol.* 2020. Vol. 135. P. 110888.

186. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling / D. M. Rhoads, A. L. Umbach, C. C. Subbaiah, J. N. Siedow. *Plant Physiol.* 2006. Vol. 141. P. 357–366.

187. Gomes M. P., Juneau P. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? *Environ. Pollut.* 2016. Vol. 218. P. 402–409.

188. Acute exposure to a glyphosate-containing herbicide formulation inhibits Complex II and increases hydrogen peroxide in the model organism

Caenorhabditis elegans / S. L. Burchfield, D. C. Bailey, C. E. Todt et al. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2019. Vol. 66. P. 36–42.

189. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Дозозалежний ефект токсичності наночастинок оксиду цинку і гліфосату. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 11 червня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 57.

190. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg (18.03.1986, Strasbourg). *Council of Europe Treaty Series.* 1986. Vol. 123, P. 52 .

191. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. Київ : Авіцена, 2002. 156 с.

192. Oral exposure to zinc oxide nanoparticles induced oxidative damage, inflammation and genotoxicity in rat's lung / N. Howaida, H. Atti, M. Shalaby, M. Arafah. *Life Science Journal.* 2013. Vol. 10, № 1. P. 1969–1979.

193. Use of a glyphosate-based herbicide-induced nephrotoxicity model to investigate a panel of kidney injury biomarkers / K. Wunnapuk, G. Gobe, Z. Endre et al. *Toxicol. Lett.* 2014. Vol. 225, № 1. P. 192–200.

194. Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело.* 1988. № 11. С. 41–43.

195. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові. *Буковин. мед. вісн.* 1998. Т. 2, № 1. С. 156–158.

196. Чевари С., Чаба Й., Секей С. Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале. *Лаб. дело.* 1985. № 11, С. 678–681.

197. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело.* 1988. № 1. С. 16–19.

198. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl group. *Arch of Bioch. and Biophys.* 1959. Vol. 82. P. 70–77.
199. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической. Минск : Беларусь, 1982. 311 с.
200. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stock, J. M. Gutteridge, R. J. Sharp et al. *Clin. Sci. and Mol. Med.* 1974. Vol. 47. P. 215–222.
201. Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine / D. N. Stuehr, D. Stuehr, N. S. Kwon et al. *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 6259–6263.
202. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media / L. Ridnour, J. E. Sim, M. Hayward et al. *Anal. Biochem.* 2000. Vol. 281. P. 223–229.
203. Кисеньзалежні функції фагоцитів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень / Є. М. Нейко, П. Р. Герич, М. М. Островський, Л. М. Томащук. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини.* 2010. № 1. С. 100–104.
204. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза / О. Е. Чечина, А. К. Биктасова, Е. В. Сазонова и др. *Бюллетень сибирской медицины.* 2009. № 2. С. 67–72.
205. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation / D. A. Bass, J. W. Parce, L. R. Dechatelet et al. *J. Immunol.* 1983. Vol. 130, № 4. P. 1910–1917.
206. Механизмы апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите / О. Е. Чечина, Н. В. Рязанцева, Е. В. Сазонова и др. *Бюллетень сибирской медицины.* 2011. № 6. С. 61–66.
207. Apoptosis of neutrophils / N. A. Maianski, A. N. Maianski, T. W. Kuijpers, D. Roos. *Acta Haematol.* 2004. Vol. 111, № 1–2. P. 56–66.

208. Cinti D. L., Moldeus P., Schenkman L. J. B. Kinetic parameters of drug – metabolizing enzymes in Ca^{2+} – sedimented microsomes from rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 1972. Vol. 21. P. 3249–3256.

209. Klotz A. V., Stegeman J. J., Walsh C. V. An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Anal. Biochem.* 1984. Vol. 140. P. 138–145.

210. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, № 22. P. 7130–7139.

211. Сорочинников А. Г., Доросевич А. Е. Гистологическая и микроскопическая техника. Смоленск : САУ, 2000. 480 с.

212. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Вплив наночастинок оксиду цинку на функціональний стан печінки щурів. *Матеріали XII українського біохімічного конгресу*, 30 вересня. – 4 жовтня 2019р. Тернопіль, 2019;21:3(80). с. 172-173.

213. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки ZnO посилюють прооксидні ефекти гліфосату. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 червня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 141–142.

214. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки оксиду цинку посилюють гепатотоксичний ефект гербіциду гліфосату. *Медична та клінічна хімія*. 2019. Т. 21, № 4. С. 32–36.

215. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки оксиду цинку посилюють викликаний гербіцидом гліфосатом оксидативний та нітрооксидативний стрес. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 2. С. 77–82.

216. Летняк Н. Я., Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату на продукцію активних форм

оксигену. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : матеріали IV наук.-практ. конф. з міжнародною участю, 18 листопада 2021р. Харків., 2021. С. 171.

217. Гапоненко Я. Ю., Корда М. М. Нітрооксидативний стрес в патогенезі ураження печінки наночастинками ZnO і гліфосатом. В: *Особливості науково-педагогічного процесу в період пандемії COVID-19* : матеріали пленуму Українського наукового товариства патофізіологів, 15-17 вересня 2022 р.. Тернопіль, 2022. С. 18–19.

218. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату на стан гуморальної ланки імунної системи. *Медична та клінічна хімія*. 2022. Т. 24, № 4. С. 62–66.

219. Гапоненко Я. Ю., Корда М. М. Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокіновий профіль наночастинками оксиду цинку. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2023. № 1 (15). С. 5–9.

220. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив наночастинок оксиду цинку на прооксидний та проапоптичний ефекти гліфосату. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2023. Т. 96, № 1. С. 5–11.

221. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив наночастинок ZnO та гліфосату на морфофункціональний стан печінки щурів. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали V наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, 18 травня 2023 р. Харків, 2023. С. 249–250.

222. Петенко Я.Ю., Летняк Н.Я., Корда М.М. Гістологічні зміни в органах тварин під впливом наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2023, № 2: С. 156-163.

223. He X., Deng H., Hwang H. M. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *J. Food Drug Anal.* 2019. Vol. 27, № 1. P. 1–21.

224. Singh S., Nalwa H. S. Nanotechnology and health safety – toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007. Vol. 7, № 9. P. 3048–3070.

225. Metal/Metal Oxide Nanoparticles: Toxicity, Applications, and Future Prospects / R. G. Chaudhary, G. S. Bhusari, A. D. Tiple et al. *Curr. Pharm. Des.* 2019. Vol. 25, № 37. P. 4013–4029.

226. Ponzoni A. Metal Oxide Chemiresistors: A Structural and Functional Comparison between Nanowires and Nanoparticles. *Sensors (Basel)*. 2022. Vol. 22, № 9. P. 3351.

227. George J. M., Antony A., Mathew B. Metal oxide nanoparticles in electrochemical sensing and biosensing: a review. *Mikrochim. Acta*. 2018. Vol. 185, № 7. P. 358.

228. Metal- and metal/oxide-based engineered nanoparticles and nanostructures: a review on the applications, nanotoxicological effects, and risk control strategies / R. Solano, D. Patiño-Ruiz, L. Tejeda-Benitez, A. Herrera. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2021 Vol. 28, № 14. P. 16962–16981.

229. Forman H. J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. Vol. 20, № 9. P. 689–709.

230. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015. Vol. 4. P. 180–183.

231. Jones D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018. Vol. 295, № 4. P. 849–868.

232. Spinelli J. B., Haigis M. C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* 2018. Vol. 20, № 7. P. 745–754.

233. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017. Vol. 11. P. 613–619.

234. Yang B., Chen Y., Shi J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based

Nanomedicine. *Chem. Rev.* 2019. Vol. 119, № 8. P. 4881–4985.

235. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation / A. Sarniak, J. Lipińska, K. Tytman, S. Lipińska. *Postepy Hig. Med. Dosw.* (Online). 2016. Vol. 70. P. 1150–1165.

236. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2020. Vol. 20, № 1. P. 16–26.

237. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species / L. He, T. He, S. Farrar et al. *Cell Physiol. Biochem.* 2017. Vol. 44, № 2. P. 532–553.

238. Milisav I., Ribarič S., Poljsak B. Antioxidant Vitamins and Ageing. *Subcell Biochem.* 2018. Vol. 90. P. 1–23.

239. Hawkins C. L., Davies M. J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294, № 51. P. 19683–19708.

240. Hawkins C. L. Hypochlorous acid-mediated modification of proteins and its consequences. *Essays Biochem.* 2020. Vol. 64, № 1. P. 75–86.

241. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition / R. Roy, S. K. Singh, L. K. Chauhan et al. *Toxicol. Lett.* 2014. Vol. 227, № 1. P. 29–40.

242. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage / D. Xiong, T. Fang, L. Yu et al. *Sci. Total Environ.* 2011. Vol. 409, № 8. P. 1444–1452.

243. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways / M. A. Martínez, J. L. Rodríguez, B. Lopez-Torres et al. *Environ. Int.* 2020. Vol. 135. P. 105414

244. Glyphosate decreases bovine oocyte quality by inducing oxidative stress and apoptosis / E. Zhiqiang, Y. Zhao, J. Sun et al. *Zygote.* 2022. Vol. 30, № 5. P. 704–711.

245. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats / Q. Tang, J. Tang, X. Ren, C. Li. *Environ. Pollut.* 2020. Vol. 261. P. 114129.

246. Bhardwaj J. K., Mittal M., Saraf P. Effective attenuation of glyphosate-induced oxidative stress and granulosa cell apoptosis by vitamins C and E in caprines. *Mol. Reprod. Dev.* 2019. Vol. 86. P. 42–52 .

247. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling / Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi. *J. Cell Biol.* 2018. Vol. 217, № 6. P. 1915–1928.

248. Bresciani G., da Cruz I. B., González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *J. Adv. Clin Chem.* 2015. Vol. 68. P. 87–130.

249. Nguyen N. H., Tran G. B., Nguyen C. T. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2020. Vol. 98, № 1. P. 59–69.

250. Lewandowski Ł., Kepinska M., Milnerowicz H. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase activity by selected environmental xenobiotics. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2018. Vol. 58. P. 105–113.

251. Superoxide Anion Chemistry-Its Role at the Core of the Innate Immunity / C. M. C. Andrés, J. M. Pérez de la Lastra, C. Andrés Juan et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 3. P. 1841.

252. Sepasi Tehrani H., Moosavi-Movahedi A. A. Catalase and its mysteries. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2018. Vol. 140. P. 5–12.

253. Catalase: A critical node in the regulation of cell fate / A. Baker, C. C. Lin, C. Lett et al. *Free Radic. Biol. Med.* 2023. Vol. 199. P. 56–66.

254. Healy J., Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2007. Vol. 114, № 6. P. 777–781.

255. Molecular Functions of Ceruloplasmin in Metabolic Disease Pathology / Z. Liu, M. Wang, C. Zhang et al. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2022. Vol. 15. P. 695–711.

256. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine / K. Larsen, R. Najle, A. Lifschitz, G. Virkel. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2012. Vol. 34, № 3. P. 811–818.

257. Effects of exposure to glyphosate on oxidative stress, inflammation, and lung function in maize farmers, Northern Thailand / S. Sidthilaw, R. Sapbamrer, C. Pothirat et al. *BMC Public Health.* 2022. Vol. 22, № 1. P. 1343.

258. Oestreicher J., Morgan B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport 1. *Biochem. Cell Biol.* 2019. Vol. 97, № 3. P. 270–289.

259. Forman H. J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 2009. Vol. 30, № 1–2. P. 1–12.

260. Lu S. C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys Acta.* 2013. Vol. 1830, № 5. P. 3143–3153.

261. Goshi E., Zhou G., He Q. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. *Med. Gas. Res.* 2019. Vol. 9, № 4. P. 192–207.

262. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition / M. A. Cinelli, H. T. Do, G. P. Miley, R. B. Silverman. *Med. Res. Rev.* 2020. Vol. 40, № 1. P. 158–189.

263. Acute toxicological effects of zinc oxide nanoparticles in mice after intratracheal instillation / D. Wang, H. Li, Z. Liu et al. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 2017. Vol. 23, № 1. P. 11–19.

264. Effects of zinc oxide nanoparticles on human coronary artery endothelial cells / K. J. Chuang, K. Y. Lee, C. H. Pan et al. *Food Chem. Toxicol.* 2016. Vol. 93. P. 138–144.

265. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways / M. A. Martínez, J. L. Rodríguez, B. Lopez-Torres et al. *Environ. Int.* 2020. Vol. 135. P. 105414.

266. El-Shenawy N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2009. Vol. 28, № 3. P. 379–385.

267. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification / C. Liu, D. Chu, K. Kalantar-Zadeh et al. *Adv. Sci. (Weinh)*. 2021. Vol. 8, № 15. P. e2004433.

268. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly / T. Ramani, C. S. Auletta, D. Weinstock et al. *Int. J. Toxicol.* 2015. Vol. 34, № 4. P. 355–365.

269. Opal S. M., DePalo V. A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000. Vol. 117, № 4. P. 1162–1172.

270. ZnO nanoparticles induce TNF- α expression via ROS-ERK-Egr-1 pathway in human keratinocytes / S. H. Jeong, H. J. Kim, H. J. Ryu et al. *J. Dermatol. Sci.* 2013. Vol. 72, № 3. P. 263–273.

271. Silva L. R., Girard D. Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. *Toxicol. Lett.* 2016. Vol. 259. P. 11–20.

273. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach / V. A. Senapati, A. Kumar, G. S. Gupta et al. *Food Chem. Toxicol.* 2015. Vol. 85. P. 61–70.

274. Nanoparticles as a Novel Tool to Inhibit Inflammatory Cytokines in Human Lymphocytes and Macrophages of Coronary Artery Disease / R. Shabbir, A. Raza, A. Liaquat et al. *J. Pharm. Sci.* 2022. Vol. 111, № 5. P. 1509–1521.

275. Glyphosate infiltrates the brain and increases pro-inflammatory cytokine TNF α : implications for neurodegenerative disorders / J. K. Winstone,

K. V. Pathak, W. Winslow et al. *J. Neuroinflammation*. 2022. Vol. 19, № 1. P. 193.

276. Glyphosate-based herbicides induces autophagy in IPEC-J2 cells and the intervention of N-acetylcysteine / G. Bai, R. Zhou, X. Jiang et al. *Environ. Toxicol.* 2022. Vol. 37, № 8. P. 1878–1890.

277. ZnO nanoparticles stimulate oxidative stress to induce apoptosis of B16F10 melanoma cells: In vitro and in vivo studies / P. Fan, C. Yang, L. Wang et al. *Biomed. Phys. Eng. Express*. 2021. Vol. 7. P. 6.

278. ZnO Nanoparticles Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Gingival Squamous Cell Carcinoma through Mitochondrial Dysfunction and p70S6K Signaling Pathway / S. W. Wang, C. H. Lee, M. S. Lin et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 5. P. 1612.

279. Effects of ZnO nanoparticles on proliferation and apoptosis of human lung epithelial BEAS-2B cells / J. Z. Chen, X. Y. Li, D. M. Liu et al. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2022. Vol. 38, № 5. P. 443–447.

280. Evaluation of apoptotic potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study) / M. Kwiatkowska, J. Michałowicz, P. Jarosiewicz et al. *Food Chem. Toxicol.* 2020. Vol. 135. P. 110888.

281. Glyphosate induces lymphocyte cell dysfunction and apoptosis via regulation of miR-203 targeting of PIK3R1 in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / W. Wang, Q. Liu, T. Zhang et al. *Fish Shellfish Immunol.* 2020. Vol. 101. P. 51–57.

282. Tannin alleviates glyphosate exposure-induced apoptosis, necrosis and immune dysfunction in hepatic L8824 cell line by inhibiting ROS/PTEN/PI3K/AKT pathway / L. Zhang, L. Chen, D. Tao et al. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2023. Vol. 266. P. 109551.

283. Activation of the N-methyl-d-aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis / H. Gao, J. Chen, F. Ding et al. *J. Appl. Toxicol.* 2019. Vol. 39, № 8. P. 1096–1107.

284. Rana K., Verma Y., Rana S. V. S. Possible Mechanisms of Liver Injury Induced by Cadmium Sulfide Nanoparticles in Rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 2021. Vol. 199, № 1. P. 216–226.

285. Influence of Selected Carbon Nanostructures on the CYP2C9 Enzyme of the P450 Cytochrome / J. Sekretarska, J. Szczepaniak, M. Sosnowska et al. *Materials (Basel)*. 2019. Vol. 12, № 24. P. 4149.

286. Effects of Sublethal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide Formulation on Metabolic Activities of Different Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats / K. Larsen, R. Najle, A. Lifschitz et al. *Int. J. Toxicol.* 2014. Vol. 33, № 4. P. 307–318.

287. Effects of ZnO Nanoparticles on Dimethoate-Induced Toxicity in Mice / X. Yan, R. Rong, S. Zhu et al. *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63, № 37. P. 8292–8298.

288. Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages / A. Glinski, S. Liebel, È. Pelletier et al. *Toxicol. Mech. Methods*. 2016. Vol. 26, № 4. P. 251–259.

289. The combined effect of titanium dioxide nanoparticles and cypermethrin on male reproductive toxicity in rats / Y. Li, M. Zhong, X. He et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2023. Vol. 30, № 9. P. 22176–22187.

290. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability and neurotoxicity of cypermethrin in zebrafish larvae / M. Li, Q. Wu, Q. Wang et al. *Aquat. Toxicol.* 2018. Vol. 199. P. 212–219.

ДОДАТОК А

Список опублікованих праць здобувача:

1. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки оксиду цинку посилюють гепатотоксичний ефект гербіциду гліфосату. *Медична та клінічна хімія*. 2019. Т. 21, № 4. С. 32–36. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i4.10824
2. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки оксиду цинку посилюють викликаний гербіцидом гліфосатом оксидативний та нітрооксидативний стрес. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2020. № 2. С. 7–82. DOI: 10.11603/1811-2471.2020.v.i2.11314
3. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату на стан гуморальної ланки імунної системи. *Медична та клінічна хімія*. 2022. Т. 24, № 4. С. 62–66. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2022.i4.13574
4. Гапоненко Я. Ю., Корда М. М. Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокиновий профіль наночастинками оксиду цинку. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2023. № 1 (15). С. 5–9. DOI: 10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13444
5. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив наночастинок оксиду цинку на прооксидний та проапоптичний ефекти гліфосату. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2023. Т. 96, № 1. С. 5–11. DOI: 10.25040/espb2023.01-02.005
6. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Гістологічні зміни в органах тварин під впливом наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2023. № 2. С. 156–163. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13949
7. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Вплив наночастинок оксиду цинку на функціональний стан печінки щурів. *Матеріали XII*

українського біохімічного конгресу, 30 вересня. – 4 жовтня 2019р. Тернопіль, *Медична та клінічна хімія*. 2019. Т. 21, № 3 (80). С. 172–173.

8. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Наночастинки ZnO посилюють прооксидні ефекти гліфосату. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 червня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 141–142.

9. Гапоненко Я. Ю., Летняк Н. Я., Корда М. М. Дозозалежний ефект токсичності наночастинок оксиду цинку і гліфосату. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 червня 2021 р. Тернопіль, 2021. С. 57.

10. Летняк Н. Я., Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гліфосату на продукцію активних форм кисню. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : матеріали IV наук.-практ. конф. з міжнародною участю, 18 листопада 2021р. Харків, 2021. С. 171.

11. Гапоненко Я. Ю., Корда М. М. Нітрооксидативний стрес в патогенезі ураження печінки наночастинками ZnO і гліфосатом. В: *Особливості науково-педагогічного процесу в період пандемії COVID-19* : матеріали пленуму Українського наукового товариства патофізіологів, 15-17 вересня 2022 р. Тернопіль, 2022. С. 18–19.

12. Петренко Я. Ю., Летняк Н. Інтегральні токсичні ефекти наночастинок хімічних речовин в біологічних системах. *Майбутнє за наукою* : матеріали XXVII конгресу студентів та молодих учених, 10-12 квітня 2023 р. Тернопіль, 2023. С. 242.

13. Петренко Я. Ю., Корда М. М. Вплив наночастинок ZnO та гліфосату на морфофункціональний стан печінки щурів. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали V наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, 18- травня 2023 р. Харків, 2023. С. 249–250.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- XII український біохімічний конгрес, Тернопіль, 30 вересня. – 4 жовтня 2019р. (публікація);
- Підсумкова LXIII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», Тернопіль, 12 червня 2020р. (публікація);
- Підсумкова LXIII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», Тернопіль, 11 червня 2021 р. (публікація);
- IV Науково-практична конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція», Харків, 18 листопада 2021р. (публікація);
- Пленум Українського наукового товариства патофізіологів «Особливості науково-педагогічного процесу в період пандемії COVID-19», Тернопіль, 15-17 вересня 2022 р. (публікація);
- XXVII конгрес студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою», Тернопіль, 10-12 квітня 2023р. (публікація);
- V науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації», Харків, 18 травня 2023 р. (публікація);

ДОДАТОК В.1



"ЗАТВЕРДЖУЮ"

Перший проректор з науково-педагогічної роботи
 Львівського національного медичного
 університету імені Данила Галицького
 доц. *І.І. Солонинко* І.І. Солонинко
 "06" "04" 2023р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального та наукового процесу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокіновий профіль наночастинками оксиду цинку.
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПП авторів:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України, кафедри патологічної фізіології, Петренко Яна Юріївна.
3. **Джерело інформації:** Петренко Я.Ю., Корда М.М. Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокіновий профіль наночастинками оксиду цинку. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2023; 1(15): 5-9.
4. **Базова установа де впроваджено:** кафедра патологічної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес — у матеріали лекцій і практичні заняття.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів роботи Петренко Я.Ю. у навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів щодо негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокіновий профіль наночастинками оксиду цинку.
7. **Термін подання:** 2023 р.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри патологічної фізіології
 Львівського національного медичного університету
 імені Данила Галицького
 доктор медичних наук, професор

M.C. Regeda

ДОДАТОК В.2

«ЗАТВЕДЖУЮ»



Проректор закладу вищої освіти
наукової роботи

Тернопільського національного медичного
університету імені І.Я. Горбачевського
д. біол.н., проф. І.М. Кліщ

19 » шовтня 20 22р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального та наукового процесу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Наночастинки оксиду цинку посилюють викликаний гербіцидом гліфосатом оксидативний та нітрооксидативний стрес.
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІП авторів:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, Петренко Яна Юріївна.
3. **Джерело інформації:** Я. Ю. Гапоненко, Н. Я. Летняк, М. М. Корда. Наночастинки оксиду цинку посилюють викликаний гербіцидом гліфосатом оксидативний та нітрооксидативний стрес. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020. № 2, С. 77-82.
4. **База установа де впроваджено:** кафедра функціональної і лабораторної діагностики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій і практичні заняття.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів роботи Петренко Я.Ю. у навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів щодо комбінованої дії наночастинок та токсикантів на стан антиоксидантної системи.
7. **Термін подання:** 2022р.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри функціональної

і лабораторної діагностики

Тернопільського національного медичного

університету імені І. Я. Горбачевського

доктор медичних наук, професор

М.І. Марущак

ДОДАТОК В.3

«ЗАТВЕДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти
з наукової роботиТернопільського національного медичного
університету імені І.Я. Горбачевського

д. біол.н., проф. І.М. Кліщ

« 13 » вересня 2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального та наукового процесу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Наночастинки оксиду цинку посилюють гепатотоксичний ефект гербіциду гліфосату
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПП авторів:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, Петренко Яна Юріївна.
3. **Джерело інформації:** Гапоненко Я.Ю., Летняк Н.Я., Корда М.М. Наночастинки оксиду цинку посилюють гепатотоксичний ефект гербіциду гліфосату Медична та клінічна хімія. – 2019. – 21, №4. – С. 32 – 36.
4. **Базова установа де впроваджено:** кафедра патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій і практичні заняття.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів роботи Петренко Я.Ю. у навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів щодо комбінованої дії наночастинок та токсикантів на функціональний стан печінки.
7. **Термін подання:** 2022р.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження
Завідувач кафедри патологічної фізіології
Тернопільського національного медичного
університету імені І. Я. Горбачевського
доктор медичних наук, професор

О.В. Денефіль

ДОДАТОК В.4

«ЗАТВЕДЖУЮ»



Проректор закладу вищої освіти
наукової роботи
Тернопільського національного медичного
університету імені І.Я. Горбачевського
д. біол.н., проф. І.М. Кліщ
« 08 » лютого 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального та наукового процесу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату на стан гуморальної ланки імунної системи.
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПП авторів:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, Петренко Яна Юріївна.
3. **Джерело інформації:** Я. Ю. Гапоненко, М. М. Корда. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату на стан гуморальної ланки імунної системи. Медична та клінічна хімія. 2022. Т. 24. № 4, С. 62-66.
4. **Базова установа де впроваджено:** кафедра медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій і практичні заняття.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів роботи Петренко Я.Ю. у навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів щодо комбінованої дії наночастинок та токсикантів на стан гуморальної ланки імунної системи.
7. **Термін подання:** 2023р.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри медичної біохімії
Тернопільського національного медичного
університету імені І. Я. Горбачевського
доктор медичних наук

С.Р. Підручна

ДОДАТОК В.5

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор закладу вищої освіти з
науково-педагогічної роботиБуковинського державного
медичного університету

к.мед.наук., доцент

Ігор GERUSH



2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального та наукового процесу

1. **Назва пропозиція для впровадження:** Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокінетичний профіль наночастинками оксиду цинку.
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІІ авторів:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, Петренко Яна Юріївна.
3. **Джерело інформації:** Петренко Я.Ю., Корда М.М., Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокінетичний профіль наночастинками оксиду цинку. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2023; 1(15): 5-9.
4. **Базова установа, де впроваджено :** кафедра патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій і практичні заняття.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів роботи Петренко Я.Ю. у навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів щодо негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокінетичний профіль наночастинками оксиду цинку.
7. **Термін подання:** 2023 р.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної фізіології
Буковинського державного медичного університету.
доктор медичних наук, професор

Юрій РОГОВИЙ

ДОДАТОК В.6

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перша проректорка

Івано-Франківського національного

медичного університету

Ганна д.біол.н., проф. Ганна ЕРСТЕНЮК«*02*» *березня* 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального та наукового процесу

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату на стан гуморальної ланки імунної системи.
 2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПП авторів:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, Петренко Яна Юріївна.
 3. **Джерело інформації:** Петренко Я.Ю., Корда М.М. Вплив комбінованої дії наночастинок оксиду цинку та гербіциду гліфосату на стан гуморальної ланки імунної системи. Медична та клінічна хімія. 2022; 4: 62-66.
 4. **Базова установа де впроваджено:** кафедра патофізіології Івано-Франківського національного медичного університету.
 5. **Форма впровадження:** у навчальний процес - у матеріали лекцій і практичні заняття.
 6. **Результати впровадження:** Використання результатів роботи Петренко Я.Ю. у навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів щодо комбінованої дії наночастинок та токсикантів на стан гуморальної ланки імунітету.
 7. **Термін впровадження:** 2023 р.
- Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри патофізіології
Івано-Франківського національного
медичного університету,
заслужений діяч науки і техніки України,
доктор медичних наук, професор



Любомир ЗАЯЦЬ