

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР «ІНСТИТУТ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ»
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РОМАНЬКО МАРИНА ЄВГЕНІВНА

УДК 577.1:615.9:57.083:[576.3/.5+54–022.532–182]

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОХІМІЧНА І ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ДІЇ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ НА КЛІТИНИ ЕВКАРІОТИЧНИХ
ТА ПРОКАРІОТИЧНИХ ОРГАНІЗМІВ**

03.00.04 «Біохімія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук.

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

_____ М.Є. Романько

Науковий консультант: **Головко Анатолій Миколайович**,
доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН

Харків – 2018

АНОТАЦІЯ

Романько М.Є. Біохімічна і токсикологічна характеристика дії наночастинок металів на клітини еукаріотичних та прокаріотичних організмів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», НААН, Харків; Інститут біології тварин, НААН, Львів, 2018.

Зміст анотації

Дисертаційну роботу виконано згідно з тематичними планами наукових досліджень Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ»): за НТП 37 (2006–2010), завдання 37.01-017.04 «Визначити структурно-метаболичні характеристики виробничих штамів мікроорганізмів за умов їх підтримання та зберігання», яке виконувалось у рамках завдання 37.01-017 «Вивчити основи формування імунітету і регуляції метаболізму в патогенезі хвороб та застосуванні засобів профілактики і терапії» (ДР 0107U003196); за НТП 32 (2011–2015), завдання 32.01.07.02 Ф «Вивчити механізми впливу наночастинок металів на прокаріотичні та еукаріотичні клітини для забезпечення нанобіотехнологій ветеринарних імунобіологічних препаратів» (ДР 0111U000800) і 32.02.01.03 Ф «Вивчити біосумісність наноконпонентів кормових добавок, їх вплив на якість і безпечність продукції птахівництва» (ДР 0111U000801), у яких автор визначала біохімічну і токсикологічну дію NPMe на окремі клітини та організм щурів.

У дисертаційній роботі одержані нові дані щодо біохімічної і токсикологічної характеристики дії наночастинок металів (NPMe) на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів. Вирішення цієї проблеми

здійснено шляхом визначення біохімічних і цитологічних маркерів токсичної дії та біосумісності NPMe (Au, Ag, Cu, MnO₂, Fe, Co[Fe(CN)₆], Co, Zn) на еукаріотичні клітини, біохімічних маркерів мембраннотоксичної дії NPAu і NPAg – на прокаріотичні клітини і біосумісності суміші NPMe (Ag, Cu, Fe, MnO₂) – на організм білих щурів. З'ясовано провідну роль інтенсивності мембранно-зв'язаних оксидативних процесів, антиоксидантних показників і ключових показників енергетичного метаболізму прокаріотичних клітин у розвитку цитотоксичних або протективних ефектів за дії з NPAu і NPAg, які мають залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальними для різних штамів мікроорганізмів у межах одного таксономічного виду.

Наукова новизна і практичне значення роботи підтвержені 4-ма патентами України на корисні моделі й 3-ма розробленими методичними рекомендаціями, які були затверджені в установленому порядку.

Основні результати роботи. На моделі еукаріотичних клітин встановлено, що NPAu розміру ~30 нм, NPAg – ~30 нм, NPFe – ~100 нм, NPCu – ~70 нм та NPMnO₂ – ~50 нм у діапазоні концентрацій 0,22–1061,00 мкг/мл за металом є безпечними за відсутістю генотоксичної і мембраннотоксичної дії на еукаріотичні клітини та мутагенної – на апікальну меристему *Allium cepa*. Дослідні зразки NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] і NPZn розміру ~100 нм у діапазоні концентрації 0,12–830,00 мкг/мл за металом чинять генотоксичну (утворення моменту «хвоста» апоптичних ДНК-комет і збільшення рівня I_{ДНК}), промутагенну (зниження рівня I_{МТ} і збільшення кількості аберантних клітин у 2,4–4,6 і 3,9–10,0 разів) і мембраннотоксичну дію (зниження активності мембранної Na⁺, K⁺-АТФ-ази на 19,7 %) (P<0,05).

За характером змін ензиматичної активності клітин лінії U937 доведено дискретність мембраннотоксичної дії NPAu: частинки розміру ~10 нм виявляли інгібування мембранної Na⁺, K⁺-АТФ-азної активності до 70 %, а розміру ~30 і ~45 нм – її збільшення у межах 20–40 % (P<0,05). Під час тестування цитозольної ЛДГ-ази за дії NPAu розміру ~10, ~20 і ~30 нм

виявляли її активацію у 1,5–4,5 разу, за дії розміру ~45 нм – її пригнічення в 5,0 разів ($P < 0,05$).

За впливу NPMe розміру ~30 нм на мембранні фракції клітин *Esherichiaspp.* і *Salmonella spp.* визначено підвищення рівня показника загальної АОА у середньому в 2,0 і 2,2 разу, у цілому, зниження активності каталази до 50,0 % (за дії NPAu) та підвищення – до 57,0 % (за дії NPAg), зростання питомої мембранної H^+ -АТФ-азної та дихальної активності у межах 15,5–33,0 % та 10,7–32,6 % ($P < 0,05$) відповідно. Це справляє регуляторний вплив на рівень утворення мембранотоксичних продуктів ПОЛ і карбоксильних похідних ОМБ ($p \leq 0,05$). Отже, NPMe розміру ~30 нм є біосумісними і мембранотропними для еукаріотичних і прокаріотичних клітин.

Установлено, що токсична дія суміші NPMe (Ag, Cu, Fe, MnO_2) за хронічного надходження у дозі 4,0 мг/кг маси тіла в організмі білих щурів призводить: до цитолітичних ушкоджень мембран гепатоцитів (гіперферментемія АсАТ, ГГТП, АлАТ і ЛФ у середньому на 14,8; 22,3; 96,8 і 69,1 %), розвитку імуносупресії і запальних реакцій (підвищення кількості лейкоцитів на тлі зниження еритроцитів і гемоглобіну, гіпопротеїнемія (на 13,5 %), надмірне утворення ЦІК і гострофазних білків серомукоїдів (на 36,1 і 62,8 %)) через оксидативний стрес (зниження каталазної активності і рівня загальної АОА (на 22,6 і 38,0 %), уповільнення процесів ПОЛ поряд із нагромадженням похідних ОМБ) ($P < 0,05$) відповідно. Визначене збільшення рівня глюкози, сечовини і креатиніну (на 36,1; 75,8 і 14,8 %) у плазмі крові узгоджується із динамікою вмісту Cu, Fe і Mn ($P < 0,05$) в органах щурів за впливу суміші металів у обох дисперсних формах, свідчить про інтенсифікацію їх елімінації залежно від часу надходження та енергетичного забезпечення тварин.

Доведено вищу біодоступність NPMe порівняно з солями металів, на що вказує підвищення вмісту Cu, Fe і Mn на 60-ту добу досліду в шлунку, тонкому кишечнику і плазмі крові та зниження Mn – у товстому кишечнику і

Cu, Fe і Mn – у печінці і нирках щурів ($P < 0,05$), та свідчить про значну роль цих органів у депонуванні металів. За результатами регуляції показників неспецифічної резистентності та ендогенної АОС в організмі щурів встановлено адаптогенну дію суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла порівняно з дією солей відповідних металів з оптимальним терміном задавання не більше 30 діб.

Доведено властивість NPAu та NPAg розміру ~ 30 нм сприяти індукуванню інтенсивності приросту біомаси прокаріотичних клітин виробничих штамів після їх ліофілізації/регідратації. З'ясовано, що за дії NPAu і NPAg на клітини *E. coli* підвищення приросту біомаси (на 28,8 і 22,3 %) супроводжується зниженням у їх мембранах вмісту продуктів ПОЛ (штами 57 і 25) і карбоксильних похідних ОМБ (штами 57, 25, 24 і 20) на тлі збільшення рівня загальної АОА на 91,9 %, гальмування каталазної активності у 1,5–4,5 разу, підвищення питомої H^+ -АТР-ази у 3,2 разу та дихальної активності на 53,5 % ($P < 0,05$). Це є експериментально-теоретичною засадою застосування NPMe при отриманні біомаси та в якості криопротекторів під час ліофілізації/регідратації прокаріотичних організмів.

Інтенсифікація приросту біомаси регідратованих клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 (на 15,1 і 36,6 %) за дії NPAu і NPAg розміру ~ 30 нм забезпечується активацією мембранної H^+ -АТР-ази на 52,6 % щодо контрольного рівня показника, а клітин штамів *S. Enteritidis* 34, *S. Typhimurium* 16 та *S. Dublin* 12 (на 25,1 і 20,2 %) навпаки, за рахунок гальмування ензиму на 25,8 % та посилення ендогенного дихання клітин на 42,6 % ($P < 0,05$), що може бути ознакою структурно-функціональних ушкоджень клітинних мембран під час ліофілізації.

Ключові слова: наночастинки металів, біохімічні маркери, генотоксичність, мутагенність, цитотоксичність, біосумісність, клітина, еукаріоти, прокаріоти, щури.

ANNOTATION

Roman'ko M.Ye. Biochemical and toxicological characteristics of the metal nanoparticles action on the cells of eukaryotic and prokaryotic organisms. – Qualifying scientific manuscript.

Dissertation for scientific degree of doctor of biological sciences, specialty 03.00.04 – «Biochemistry». – National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv; Institute of animal biology NAAS, Lviv, 2018.

The content of annotation

The dissertation was performed according to the thematic plans of scientific researches of the National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» (NSC «IECVM»), within the framework of scientific research programs of the NAAS under the tasks: 37.01–017.04 «To determine the structural and metabolic characteristics of production strains of microorganisms under conditions of their maintenance and storage», which was carried out within the framework of the task 37.01–017 «To study the basis of the immunity formation and regulation of metabolism in the pathogenesis of diseases and use of preventive measures and therapy» (CR 0107U003196) (2006–2010); 32.01.07.02 F «To study the mechanisms of influence of nanoparticles of metals on prokaryotic and eukaryotic cells for the provision of nanobiotechnologies of veterinary immunobiological preparations» (CR 0111U000800) and 32.02.01.03 F «To study the biocompatibility of nanocomponents of feed additives and their impact on the quality and safety of poultry products» (CR 0111U000801) (2010–2015).

In the dissertation, new data on the biochemical and toxicological characteristics of the action of nanoparticles of metals (NPMe) on cells of eukaryotic and prokaryotic organisms have been obtained.

The solution of this problem was carried out by determining the biochemical and cytological markers of toxicity and biocompatibility of NPMe (Au, Ag, Cu, MnO₂, Fe, Co[Fe(CN)₆], Co, Zn) on the model of cells of eukaryotic organisms, as well as biochemical markers of membranotoxic effects of NPAu and NPAg on prokaryotic organisms and studying the biocompatibility of NPMe (Ag, Cu, Fe, MnO₂) mixture on white rats.

There has been established the leading role of intensity of membrane-bound oxidation processes, some indicators of AOS and key parameters of energy metabolism of prokaryotic cells in the development of cytotoxic and/or protective effects under the action of NPAu and NPAg, which are discrete-size dependent and are individual for different strains within a single taxonomic species of microorganisms.

Scientific novelty and practical value of work are confirmed by 4 patents of Ukraine on utility models and 3 developed methodological recommendations, which were approved in accordance with established procedure.

Main results of work. On the model of eukaryotic cells, it was found that NPAu of average size ~ 30 nm, NPAg – ~ 30 nm, NPFe – ~ 100 nm, NPCu – ~ 70 nm and NPMnO₂ – ~ 50 nm in the concentration range of 0.22–1061.00 µg/ml by metal are safe due to the absence of genotoxic and membrane-toxic effects on eukaryotic test cells and mutagenic – on apical meristem *Allium cepa*.

Experimental samples of NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] and NPZn by size of ~ 100 nm in the concentration range 0.12–830.00 µg/ml by metal produce genotoxic effect (by the formation of tracks of the tail of the DNA comet and an increase in the level of the I_{DNA}), promutagenic with a decrease in the level of I_{MIT} and an increase in the number of aberrant cells (with in 2.4–4.6 and 3.9–10.0 times) and membranotoxic activity (by reduction of membranous Na⁺, K⁺-ATPase activity by 19.7 %) (p≤0.05).

By the nature of the changes in the enzymatic activity of the cell line U937 there was proved the discreteness of the membrane-toxic action of NPAu: particles ~ 10 nm in size caused the inhibition of the membrane Na⁺, K⁺-ATPase (up to

70 %), and particles ~30 nm and ~ 45 nm in size – its induction (with in 20–40 %). During the testing of cytosolic LDGase activity there was determined its induction by 1.5–4.5 times with the action of NP Au in size of ~ 10, ~ 20 and ~ 30 nm and its inhibition by 5.0 times ($P<0.05$) – for the size of ~ 45 nm.

Under the influence of NP Me of size ~ 30 nm on the membrane fractions of cells *Esheria* spp. and *Salmonella* spp. an increase in the level of total AOA of lipids was observed on average by 2.0 and 2.2 times; in general, the decrease in the activity of catalase up to 50.0 % (under the action of NP Au) and increase – up to 57.0 % (under the action of NP Ag), growth activity of membrane H^+ -ATPase and level of specific respiratory activity within 15.5–33.0 % and 10.7–32.6 %, ($P<0.05$), respectively.

This has a regulatory effect on the level of formation of membrane-toxic products of LPO and carboxylic derivatives of OMP ($p\leq 0.05$). Consequently, NP Me of ~30 nm in size are biocompatible and membranotropic for cells of eukaryotic and prokaryotic organisms.

It has been established that the toxic effect of the mixture of NP Me (Ag, Cu, Fe, MnO_2) at a chronic administration in a dose of 4.0 mg/kg of body weight in the body of white rats leads to: cytolytic damage of hepatocyte membranes (by hyperfermentemia of AST, GGTP, ALT and AP an average of 14.8; 22.3; 96.8 and 69.1 %), the development of immunosuppression (with an increase in the number of leukocytes on the background of reduction of erythrocytes and hemoglobin, hypoproteinemia (13.5 %), excessive formation of CIC and acute phase seromuroid proteins (by 36.1 and 62.8 %)) and oxidative stress (with decreasing catalase activity and the level of total AOA (22.6 and 38.0 %), slowing the LPO process along with OMP intensification) ($P<0.05$) respectively.

The determined increase in glucose, urea and creatinine levels (by 36.1; 75.8 and 14.8 %) is consistent with the dynamics of the content of Cu, Fe and Mn ($P<0.05$) in blood plasma of rats under the influence of mixture of metals in both dispersed forms and shows the intensification of their elimination, depending on the time of receipt and energy supply of animals.

It has been proved that NPMe have a higher bioavailability compared to metal salts, indicating an increase in the content of Cu, Fe and Mn on the 60th day of the experiment in the stomach, small intestine and blood plasma, and the reduction of Mn in the large intestine and Cu, Fe and Mn in the liver and kidneys of rats ($P < 0.05$), which indicates the significant role of these organs in depositing and metabolism of metals.

According to the results of regulation of indices of nonspecific resistance and endogenous AOS in the rat body, the adaptogenic effect of the NPMe mixture in the dose of 0.3 mg/kg of body weight was established in comparison with the action of the salts of corresponding metals with an optimal term of administration no more than 30 days.

It has been proved the property of NPAu and NPAg of ~30 nm in size to have an inducing effect on the intensity of prokaryotic cells of production strains biomass growth after their lyophilization/rehydration. It was found that under the effect of NPAu and NPAg on *E. coli* cells the increase of the growth of biomass (by 28.8 and 22.3 %) is accompanied by a decrease in the content of LPO products (strains 57 and 25) in their membranes and carboxylic derivatives OMP (strains 57, 25, 24 and 20) with an increase in the level of total AOA by 91.9 %, inhibition of catalase activity 1.5–4.5 times, induction of membrane H^+ -ATPase 3.2 times and specific respiratory activity by 53.5 % ($P < 0.05$). This gives grounds to consider such NPMe as protective substances because of their antioxidant effects, that is the experimental and theoretical basis for their use in obtaining biomass and as cryoprotectants during lyophilization of microorganisms.

Intensification of the growth of biomass of rehydrated cells *P. multocida* strains 606 and 877 (by 15.1 and 36.6 %) under the action of NPAu and NPAg of ~30 nm in size is ensured by the capacity of membrane H^+ -ATPase due to its activation by 52.6 % relative to the control level of indicators, cells of *S. Enteritidis* 34, *S. Typhimurium* 16 and *S. Dublin* 12 (by 25.1 and 20.2 %) on average, on the other hand, occurs at the background of inhibition of H^+ -ATPase activity by 25.8 % and of increase of menogenic cell respiration by 42 % ($P < 0.05$),

which can be a feature of structural and functional damage to cellular membranes during lyophilization.

Key words: nanoparticles of metals, biochemical markers, genotoxicity, mutagenicity, cytotoxicity, biocompatibility, cell, eukaryotes, prokaryotes, rats.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових виданнях України:

1. **Романько М. Є.,** Ушкалов В. О., Головка А. М. Стрес у мікроорганізмів та вірулентність. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2006. № 8. С. 222–241.
2. **Романько М. Є.** Інтенсивність ліпопероксидації в мембранах бактеріальних клітин в оцінюванні ефектів стресу ліофілізації. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2008. № 13 (2). С. 214–223.
3. **Романько М. Є.,** Андрущенко В. В. Вивчення ростових властивостей нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2009. № 14. С. 286–292.
4. **Романько М. Є.** Оцінка ефектів стресу ліофілізації за інтенсивністю ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів у мембранах клітин мікоплазм. *Біотехнологія.* 2009. Т. 2. № 2. С. 105–110.
5. Визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів, перспективних для біотехнологій / С. М. Дибкова, **М. Є. Романько,** Т. Г. Грузіна, Л. С. Резніченко, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Біотехнологія.* 2009. Т. 2. № 3. С. 80–85.
6. Вплив наночастинок золота та срібла на АТФ-азну активність нативних і регідратованих клітин виробничих штамів *Escherichia coli* / **М. Є. Романько,** Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Укр. біохім. журн.* 2009. Т. 81. № 6. С. 70–76.

7. **Романько М. Є.**, Ушкалов В. О., Андрущенко В. В. Інтенсивність дихання нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2009. Т. 11. № 1–2. С. 307–311.
8. Застосування методу ДНК-комет для визначення генотоксичності препаратів ветеринарних вакцин / С. М. Дибкова, **М. Є. Романько**, Т. Г. Грузіна, Л. С. Резніченко, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Biopolymers and cell.* 2010. Vol. 26. No. 3. P. 200–204.
9. **Романько М. Є.** Мембранотропний вплив наночастинок ауруму та аргентуму на інтенсивність окиснювальних процесів у клітинах *Escherichia* за умов їх ліофілізації/регідратації. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2010. Т. 12. № 2. С. 460–473.
10. Оцінювання та контролювання біологічної безпеки наноматеріалів у ветеринарній медицині / А. М. Головка, В. О. Ушкалов, Л. С. Резніченко, **М. Є. Романько**, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, З. Р. Ульберг. *Вісн. аграр. науки.* 2011. № 5. С. 24–28.
11. **Романько М.Є.** Проліферативні властивості клітин періодичних культур *Salmonella* виробничих штамів за умов культивування у присутності наночасток металів. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2012. Т. 14. № 1–2. С. 618–623.
12. **Романько М. Є.**, Резніченко Л. С. Наночастинки ауруму та аргентуму як потенційні кріопротектори за довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів. *Біотехнологія.* 2012. Т. 5. № 5. С. 100–108.
13. **Романько М. Є.** Фізіолого-біохімічні маркери безпечності наночасток металів на моделі ізольованих бактеріальних клітин роду *Salmonella*. *Біологія та валеологія : зб. наук. пр.* Харків, 2012. Вип. 14. С. 67–77.
14. Куцан О. Т., Оробченко О. Л., **Романько М. Є.** Токсикокінетика Купруму в організмі щурів за умов тривалого введення наноконструкції

металів (Ag, Cu, Fe та двоокис Mn) з кормом. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2015. Т. 17, № 1. С. 68–77.

15. **Roman'ko M. E.** Physiological and biochemical mechanisms of contact interaction of nanoparticles of gold with *Bacillus anthracis* vaccine strain Sterne 34F2 cells. *J. Vet. Med. Biotech. Biosafety.* 2016. Vol. 2, iss. 3. P. 12–18.

16. **Roman'ko M.** Intensity of lipid oxidation and oxidativemodification of proteins in blood of rats under the conditions of chronic influence of mixture of nanoparticles of metals and tier macrodisperse analogue. *Sci. Rep. of NULES of Ukraine.* 2017. № 5(69). Mode to access : <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/9480>.

17. **Романько М. Є.** Біохімічні маркери безпечності наночастинок металів на моделі ізольованих субклітинних фракцій еукаріотів. *Reg. Mech. Biosyst.* 2017. Vol. 8(4). P. 564–568.

18. **Романько М. Є.** Рівень інтенсивності процесів переокиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* як біомаркер тестування біосумісності наночастинок металів. *Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна, серія: Біологія.* 2017. Вип. 29. С. 19–33.

19. **Романько М. Є.** Рівень показників імунної реактивності у крові щурів за умов одноразового внутрішньошлункового введення суміші наночастинок металів (Ag, Fe, Cu, двоокис Mn). *Біоресурси і природокористування.* 2017. Т. 9. № 5–6. 68–79.

20. **Романько М. Є.** Вплив наночастинок металів на показники енергетичного метаболізму бактерійних клітин за їх ліофілізації і регідратації. *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* 2017. № 4(80). С. 24–31.

21. **Романько М. Є.** Визначення біохімічних показників функціонального стану печінки в крові білих щурів за одноразового внутрішньошлункового введення суміші наночастинок металів (Ag, Cu, Fe, MnO₂). *ScienceRise: Biol. Sci.* 2017. Vol. 6(9). P. 14–22.

**Статті у наукових виданнях інших держав,
включені до наукометричних баз:**

22. Оценка генотоксических свойств наноматериалов ветеринарного назначения методом ДНК-комет *in vitro* / **М. Е. Романько**, С. Н. Дыбкова, Т. Г. Грузина, Л. С. Резниченко, З. Р. Ульберг, В. А. Ушкалов, А. Н. Головки. *Аграр. наука : журн. Межгос. совета по аграр. науке и инф-ции стран СНГ*. 2010. № 1. С. 28–31..

23. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., **Романько М. Е.** Токсикокинетика железа у крыс после внутрижелудочного введения нанокompозита металлов в условиях острого эксперимента. *Аграр. наука : журн. Межгос. совета по аграр. науке и инф-ции стран СНГ*. 2013. № 7. С. 22–26.

24. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., **Романько М. Е.** Токсикокинетика марганца в организме крыс после введения нанокompозита металлов (Ag, Cu, Fe, двуокись Mn) с кормом в условиях хронического эксперимента. *Актуальн. вопр. вет. биологии*. 2014. № 1 (21). С. 57–64.

25. Оробченко А. Л., **Романько М. Е.**, Куцан А. Т. Токсикологическая оценка нанокompозита металлов (Ag, Cu, Fe и двуокись Mn) по уровню биохимических маркеров крови крыс в условиях хронического эксперимента. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология : науч.-практ. журн.* 2014. № 3. С. 21–29.

Публікації у нефармацевтичних виданнях України:

26. **Романько М. Є.** Оксидативний стрес у мікроорганізмів. *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту*. 2005. Вип. 33. С. 317–327.

27. **Романько М. Є.**, Ушкалов В. О., Андрущенко В. В. АТФ-аза плазматичних мембран клітин тест-штамів мікоплазм за умов ефектів ліофілізації. *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту*. 2008. Вип. 56. С. 142–145.

28. **Романько М. Є.** Ефекти мікробіоцидної дії срібла. *Наук. вісн. вет. медицини*. 2010. Вип. 6 (79). С. 18–23.

29. Вплив наночасток металів на інтенсивність ростових процесів бактерій / **М. Є. Романько**, О. В. Кольчик, О. Т. Куцан, В. О. Ушкалов.

Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. наук.-досл. конгр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок. Львів, 2011. Вип. 12, № 3, 4. С. 404–410.

30. **Романько М. Є.** Біологічні ефекти іонного і колоїдного (нанорозмірного) ауруму та його препаратів. Перспективи застосування. *Вет. медицина : міжвідом. темат. наук. зб.* Харків, 2011. Вип. 95. С. 74–77.

31. Оцінка генотоксичності та мутагенності наночастинок металів, перспективних компонентів ветеринарних нанонутрицевтиків / С. М. Дибкова, **М. Є. Романько**, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, О. Т. Куцан. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2011. № 19. С. 61–69.

32. Оробченко О. Л., **Романько М. Є.**, Куцан О. Т. Зміни коефіцієнтів маси внутрішніх органів у щурів після внутрішньошлункового введення нанокмпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. наук.-досл. конгр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок.* Львів, 2013. Вип. 14, № 1–2. С. 295–300.

33. Куцан О. Т., Оробченко О. Л., **Романько М. Є.** Клінічні та органічні зміни у щурів після внутрішньошлункового введення нанокмпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2013. № 22. С. 298–309.

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези та матеріали конференцій:

34. Metal nanoparticles as method of renovation of biological potential of cells of production strains of microorganisms under the conditions of lyophilization stress / **M. Roman'ko**, L. Rieznichenko, T. Gruzina, V. Ushkalov, A. Golovko. *Ukrainian Biochem. J.* 2009. Vol. 81, No. 4, spec. iss. : VII Parnas Conf. on Biochem. and Molec. Biology (Yalta, Ukraine, 3–7 Oct. 2009). P. 309.

35. Gold nanoparticles genotoxicity / S. Dibkova, **M. Roman'ko**, T. Gruzina, L. Rieznichenko, V. Ushkalov, Z. Ulberg. *Ukrainian Biochem. J.*

2009. Vol. 81, No. 4, spec. iss.: VII Parnas Conf. on Biochem. and Molec. Biology (Yalta, Ukraine, 3–7 Oct. 2009). P. 291.

36. **Roman'ko M. Ye.**, Reznichenko L. S., Ushkalov V. O. Membranotropic effect of metal nanoparticles on the bacterial cells under the condition of their lyophilization/rehydration. *Ukrainian-German Symp. on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Beregove, Crimea, Ukraine, 6th–10th Sept. 2010) : book of abstr.* 2010. P. 256.

37. Інтенсивність мембранних процесів виробничих штамів роду *Escherichia* в умовах впливу наночастинок золота / **М. Є. Романько**, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов. *Укр. біохім. журн.* 2010. Т. 82, спец. вип. 4 : Матеріали Х Укр. біохім. з'їзду (м. Одеса, 13–17 верес. 2010 р.). С. 304–305.

38. Metal nanoparticles: synthesis, properties, and application in medicine and veterinary / L. S. Rieznichenko, T. G. Gruzina, S. N. Dybkova, Z. R. Ulberg, **M. E. Roman'ko**, V. A. Ushkalov, I. S. Chekman. *Mediaterranean-East-Europe Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed 2011 (Uzhgorod, Ukraine, 12–14 May 2011) : prog. and materials.* Uzhgorod, 2011 P. 60–61.

39. Ушкалов В. О., Головка А. М., **Романько М. Є.** Гармонізація нормативної бази для оцінювання біологічної безпеки наноматеріалів з метою їх реєстрації. *Етика нанотехнологій та нанобезпека : тез. доп. міжнар. семінару (м. Київ, Україна, 13 жовт. 2011 р.).* Київ, 2011. С. 54–55.

40. **Roman'ko M.**, Kolchik O., Uskalov V. The study of properties of nanoparticles bakteriotsidnyh Ag, Zn, Cu, Mn, Fe against *Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus*. *3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the Environment (Aix-en-Provence, France, 26–29 June 2012) : final prog. and abstr.* Washington, DC : ASM, 2012. P. 58.

41. Протективная роль наночастиц металлов в физиолого-биохимических механизмах репарационных процессов лиофилизированных/регидратированных клеток *Salmonella* / **М. Е. Романько**, Л. С. Резніченко,

В. А. Ушкалов, М. В. Рубленко. *Materiály VIII mezinárodní věd.-prakt. konf. «Moderní vymoženosti vědy — 2012» (Praha, 27 ledna–05 února 2012 r.)*. Praha : Publ. House «Education and Science», 2012. Díl 22. Biologické vědy. Zeměpis a geologie. Zvěrolékařství. S. 87–90.

42. Куцан А. Т., **Романько М. Е.**, Оробченко А. Л. Оценка безопасности и токсичности наночастиц металлов, как прототипов ветеринарного нанонутрицевтика, по определению системных биомаркеров в экспериментах *in vitro* и *in vivo* *Materiály VIII mezinárodní věd.-prakt. konf. «Moderní vymoženosti vědy — 2012» (Praha, 27 ledna–05 února 2012 r.)*. Praha : Publ. House «Education and Science», 2012. Díl 22. Biologické vědy. Zeměpis a geologie. Zvěrolékařství. S. 84–87.

43. **Романько М. Є.** Ростстимулююча активність наночасток аргентуму щодо періодичних культур клітин ентеробактерій виробничих штамів. *Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів : зб. матеріалів наук.-практ. конф. (у рамках V міжнародного форуму «Комплексне забезпечення лабораторій»)* (м. Київ, 26–27 верес. 2012 р.). Київ, 2012. С. 110–111.

44. Біодоступність композиції наночасток Ag, Cu, Fe та двоокису Mn в організмі щурів за умов гострого токсикологічного експерименту / О. Т. Куцан, О. Л. Оробченко, **М. Є. Романько**, Р. В. Доценко. *Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів : зб. матеріалів наук.-практ. конф. (у рамках V міжнародного форуму «Комплексне забезпечення лабораторій»)* (м. Київ, 26–27 верес. 2012 р.). Київ, 2012. С. 93–95.

45. **Романько М. Є.** Застосування наночасток ауруму в біотехнологіях отримання біомаси клітин ентеробактерій виробничих штамів після їх ліофілізації/регідратації. *Етика нанотехнологій та нанобезпека : тез. доп. II міжнар. семінару* (м. Київ, 10 жовт. 2012 р.). Київ, 2012. С. 57–59.

46. **Романько М. Е.**, Мачусский А. В., Ушкалов В. А. Наночастицы золота в биотехнологиях культивирования биомассы *Bacillus anthracis* вакцинного штамма. *Биотехнология. Взгляд в будущее : материалы II междунар. науч. интернет-конф. (г. Казань, 26–27 марта 2013 г.)*. Казань, 2013. С. 294–297.

47. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., **Романько М. Е.** Токсикокинетика марганца в организме крыс после внутрижелудочного введения нанокompозита металлов (Ag, Cu, Fe, двуокись Mn) в условиях острого эксперимента. *Материалы IV съезда вет. фармакологов и токсикологов России «Актуал. вопр. вет. фармакологии, токсикологии и фармации»*. Воронеж : Истоки, 2013. С. 372–375.

48. **Roman'ko M. Ye.** Protective effect of metal nanoparticles for generation of oxidation of lipids and proteins in membrane fractions of bacterial cells at lyophilization/rehydration. *23rd Int. Symp. «New Technologies in Contemporary Animal Production» (Novi Sad, Serbia, 19–21 June 2013) : proc.* P. 337–340.

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації

Монографії:

49. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине : справ. пособ. / А. Н. Головки, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрышник, Б. Т. Стегний, В. В. Герман, Л. В. Олейник, М. В. Бабкин, **М. Е. Романько**, Ю. А. Собко, Р. А. Кучерявенко, Н. Г. Пинчук, А. В. Скрышник, Т. Ю. Трускова, М. Р. Ковпак, О. А. Головки, В. О. Коцимон, Д. А. Ордынская, Я. А. Древаль ; под ред. д-ра вет. наук, проф., акад. УААН А. Н. Головки. Х. : НТМТ, 2007. 512 с.

50. Токсико-біохімічна оцінка нанометалів за системними маркерами при застосуванні у ветеринарній медицині : монографія / О. Т. Куцан, М. Є. Романько, О. Л. Оробченко, В. О. Ушкалов. Харків : НТМТ, 2016. 328 с.

Патенти України на корисну модель:

51. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів : декл. пат. на корис. модель 48540, Україна / С. М. Дибкова, О. В. Годовський, **М. Є. Романько**, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. № u200909287 ; заявл. 10.09.09 ; опубл. 25.03.10, бюл. № 6. 5 с.

52. Спосіб отримання біомаси *Bacillus anthracis* з використанням наночастинок золота : декл. пат. на корис. модель 58450, Україна / А. М. Головка, В. О. Ушкалов, О. В. Мачуський, Л. С. Резніченко, **М. Є. Романько**, С. М. Дибкова, М. В. Бабкін. № u201011927 ; заявл. 08.10.10. ; опубл. 11.04.11, бюл. № 7. 2 с.

53. Спосіб отримання біомаси бактеріальних клітин сальмонел з використанням наночасток золота і срібла : декл. пат. на корис. модель 72608, Україна / **М. Є. Романько**, Б. Т. Стегній, О. В. Обуховська, В. О. Ушкалов. № u201201110 ; заявл. 03.02.12. ; опубл. 27.08.12, бюл. № 16. 4 с.

54. Наноккомпозит металів, як потенційний компонент біопрепаратів і кормових добавок для тварин : декл. пат. на корис. модель 92804, Україна / **М. Є. Романько**, О. Л. Оробченко, О. Т. Куцан, В. О. Ушкалов. № u201401499 ; заявл. 17.02.14 ; опубл. 10.09.14, бюл. № 17. 6 с.

Методичні рекомендації:

55. Методи оцінки інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та його регуляції у біологічних об'єктах : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держ. ком. вет. медицини України (протокол № 1 від 20.12.2007 р.) / Б. Т. Стегній, Л. В. Коваленко, **М. Є. Романько**, В. О. Ушкалов, С. П. Долецький, В. С. Бойко, Ю. М. Кротовська, Л. В. Матюша ; ННЦ «ІЕКВМ». Харків, 2009. 59 с.

56. Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих клітин : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держ. ком. вет. медицини України (протокол № 3 від 20.06.2009 р.) / С. М. Дибкова, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, А. М. Головка, В. О. Ушкалов, М. В. Бабкін,

О. В. Годовський, Л. І. Акименко, О. А. Лаврик, Д. С. Тимченко,
М. Є. Романько ; ДНКІБШМ. Київ, 2010. 23 с.

57. Токсико-біохімічна оцінка наночасток металів, як потенційних компонентів біопрепаратів і кормових добавок, за показниками безпеки в експериментах *in vivo* : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держветфітослужби України (протокол № 1 від 21.12.2012 р.) / О. Т. Куцан, **М. Є. Романько**, О. Л. Оробченко, Г. М. Шевцова, Р. В. Доценко ; ННЦ «ІЕКВМ». Харків, 2013. 40 с.

З М І С Т

	С.
ВСТУП	27
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	35
1.1 Коротка довідка щодо термінів і поняття «нанотехнологія». Загальні відомості про наноматеріали та наночастинки, їх фізико-хімічна характеристика та властивості	35
1.2 Теоретичне обґрунтування та напрями використання наночастинок у біології та медицині	41
1.2.1 Використання наноматеріалів при створенні діагностичних засобів	41
1.2.2 Використання наноматеріалів за цільової доставки ліків у клітини-мішені	44
1.2.3 Використання наноматеріалів при конструюванні нанонутрицевтиків та біологічно активних добавок спрямованої дії	46
1.2.4 Використання наноматеріалів з метою регуляції функціональної активності клітин мікроорганізмів та при отриманні їх біомаси	49
1.3 Характеристика, способи отримання та фармакологічні властивості деяких наночастинок металів	52
1.3.1 Наночастинки Аргентуму	53
1.3.2 Наночастинки Купруму	57
1.3.3 Наночастинки Ауруму	59
1.3.4 Наночастинки Феруму	64
1.4 Біохімічні механізми впливу наночастинок металів на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів	67
1.4.1 Структурно-метаболична теорія виникнення стресу в клітин прокаріотичних організмів	67

1.4.2	Метаболізм-залежні механізми взаємодії наночастинок металів з клітинами еукаріотичних і прокаріотичних організмів	80
1.5	Біохімічні механізми токсичності наноматеріалів і наночастинок металів	83
1.5.1	Ефекти токсичної дії наночастинок в експериментах <i>in vivo</i>	84
1.5.2	Прооксидантні механізми цитотоксичної дії наночастинок в експериментах <i>in vitro</i> на моделі еукаріотичних і прокаріотичних клітин	91
1.6	Висновок з огляду літератури та формування основних напрямків експериментальних досліджень	94
	РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	99
	РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	133
3.1	Вивчення цитотоксичності та біосумісності наночастинок металів у розмірно-концентраційному діапазоні на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів	133
3.1.1	Цитотоксикологічна характеристика дії наночастинок металів на клітини еукаріотичних організмів	133
3.1.1.1	Вивчення генотоксичної дії наночастинок металів у розмірно-концентраційному діапазоні на моделі еукаріотичних тест-клітин	133
3.1.1.2	Дослідження мутагенної дії наночастинок металів (NPCo, NPCo[Fe(CN) ₆], NPZn) на моделі апікальної меристеми <i>Allium sera</i>	141
3.1.1.3	Визначення рівня біохімічних маркерів цитотоксичності наночастинок металів на моделі субклітинних фракції еукаріотичних організмів	143
3.1.2	Біохімічні маркери цитотоксичної дії NPAu і NPAg у гострому експерименті на ізольовані мембранні фракції клітин прокаріотичних організмів	147

- 3.1.2.1 Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень показників їх антиоксидантної регуляції в мембранах клітин *Escherichia spp.* за дії NPAu і NPAg у розмірному діапазоні 148
- 3.1.2.2 Рівень питомої H⁺-АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності у клітин *Escherichia spp.* і *Salmonella spp.* за дії NPAu і NPAg у розмірно-концентраційному діапазоні 154
- 3.1.3 Оцінювання біохімічних маркерів токсичної дії та біосумісності суміші NPMe у порівнянні з солями відповідних металів в організмі білих щурів 160
- 3.1.3.1 Визначення біохімічних показників у крові та окремих органах білих щурів за дії суміші NPMe у порівнянні з солями відповідних металів у гострому токсикологічному експерименті 160
- 3.1.3.2 Визначення біохімічних показників у крові та окремих органах білих щурів за дії суміші NPMe у порівнянні з солями відповідних металів у хронічному токсикологічному експерименті 194
- 3.2 Біохімічна характеристика дії NPMe на прокаріотичні організми за ліофілізації/регідратації та отримання біомаси функціонально активних клітин 228
- 3.2.1 Дослідження впливу процесів ліофілізації/регідратації на рівень біохімічних показників функціональної активності прокаріотичних клітин різних таксономічних видів 228
- 3.2.2 Мікроскопічне дослідження контактної взаємодії NPAu та NPAg з клітинами прокаріотичних організмів 243
- 3.2.3 Інтенсивність приросту біомаси клітин *Escherichia spp.*, *Pasteurella spp.* і *Salmonella spp.* за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації 247
- 3.2.4 Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних

показників їх регуляції у мембранах клітин <i>Escherichia</i> spp. за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації	257
3.2.5 Рівень питомої H ⁺ -АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності у клітин <i>Escherichia</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp. і <i>Salmonella</i> spp. за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації	273
3.2.6 Вивчення впливу NPAu на інтенсивність приросту біомаси, рівень питомої H ⁺ -АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності клітин штаму <i>B. anthracis</i> Sterne 34F2	281
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ	286
ВИСНОВКИ	335
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	339
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	340
ДОДАТКИ	404

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ,
СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАНЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АМК – активні метаболіти кисню

АОА – загальна антиокиснювальна активність

АОС – антиокиснювальна система

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини

ВР – вільні радикали

ВРХ – велика рогата худоба

ГГТП – гамаглутамілтранспептидаза

ГДР – гранично допустимі рівні

ДА – дихальна активність

ДК – дієнові кон'югати

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЗДА – залізодефіцитна анемія

ІФА – імуноферментний аналіз

КР – контрастуюча речовина

КУО – колонії утворюючі одиниці

КФК – креатинфосфокіназа

ЛДГ-аза – лактатдегідрогеназа

ЛКС – лазернокореляційна спектрометрія

ЛФ – лужна фосфатаза

МДА – малоновий діальдегід

МНА – модифіковані наноалмази

нм – нанометр

МЕБ – Міжнародне епізоотичне бюро
МПБ – м'ясопептонний бульйон
МРТ – магнітно-резонансна томографія
НХ – карбоксильні похідні нейтрального характеру
ОМБ – окиснювальна модифікація білків
ОХ – карбоксильні похідні основного характеру
ПЕГ – поліетіленгліколь
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
РЕС – ретикуло-ендотеліальна система
РНК – рибонуклеїнова кислота
РФА – рентгенофлуоресцентний аналіз
СМФ – сумарні мембранні фракції
СОД – супероксиддисмутаза
ТБК – тіобарбітурова кислота
ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія
ТХО – трихлороцтова кислота
УЗ – ультразвук
УФ – ультрафіолет
ФСБ – фосфатно-сольовий буфер
ЦІК – циркулюючі імунні комплекси
ШКТ – шлунково-кишковий тракт
АТР-аза – аденозінтрифосфатаза
O₂⁻ – суперпероксид аніон
ОН⁻ – гідроксил радикал
NP_{Au} – наночастинки Ауруму
NP_{Ag} – наночастинки Аргентуму
NP_{Cu} – наночастинки Купруму
NP_{Fe} – наночастинки Феруму
NP_{Me} – наночастинки металів
NP_{MnO₂} – наночастинки двоокису мангану

NPFeO – наночастинки оксиду феруму

NPZn – наночастинки Цинку

NPCo – наночастинки Кобальту

NPCo[Fe(CN)₆] – наночастинки гексаціаноферату кобальту

NPSi – наночастинки силіцію

NPTi – наночастинки титану

H₂O₂ – перекис водню

pH – концентрація водневих іонів

P_i – неорганічний фосфор

Sm – серомукоїди

TNF- α – фактор некрозу пухлин

ВСТУП

Актуальність теми. В останні десятиліття спостерігається стрімкий розвиток і використання нових наноматеріалів, зокрема наночастинок металів (NPMe), які мають високу хімічну стабільність та біосумісність, що визначає їх високий комерційний потенціал з перспективами широкомасштабного застосування в біології та медицині [14, 55, 59, 75, 109 – 113, 130, 146, 158, 161, 193, 201, 233, 262].

Малі розміри та значний рівень біодоступності відомих наноматеріалів дозволяють вступати їм в прямий контакт з інфекційними агентами, токсинами, біологічними системами та окремими структурами клітин (протеїнами, ліпідами, нуклеїновими кислотами) [30, 34, 59, 69, 77, 90 – 93, 113, 115, 130, 214, 241, 302, 333, 433]. Водночас, нанорозмірність цих матеріалів може призводити до їх токсичності [41, 8, 81, 213, 238] порівняно з речовинами іншого розміру, що вимагає вивчення потенційного ризику використання наночастинок окремих видів на клітинному, органному та організменному рівнях і є актуальним завданням.

Припускають, що цитотоксичність таких наноматеріалів, як фулерени, карбонові нанотрубки, модифіковані наноалмази, ліпосоми, зумовлена структурно-функціональним пошкодженням цілісності плазматичної мембрани поряд із інгібуванням синтезу АТФ та процесів дихання [82, 170, 171, 200 – 204, 209, 214, 243, 249, 251 – 256, 264, 265, 307], а також окисненням глутатіону, тіольних груп білків і пероксидним окисненням ліпідів та пов'язаними з цим наслідками, такими як оксидативний стрес [274, 286, 328, 463 – 465, 468, 469], генотоксичність і апоптоз [31, 83, 266, 289, 291, 309, 345, 459, 467, 470, 471].

Відомості щодо токсичних ефектів NPMe є суперечливими, що зумовлено біологічною активністю металу в їх складі, їхньою концентрацією і розміром, не вистачає також ґрунтовного розуміння їх біохімічних

механізмів. Доведено можливі механізми контактної взаємодії металів у різних хімічних формах з клітинами еукаріотичних і прокаріотичних організмів [195, 210 – 213, 218, 234, 282, 310, 311, 579, 580]: пасивна та метаболізм-залежна кумуляція металів. Вони пов'язані з функціонуванням ферментних систем, які задіяні в реакціях обміну речовин та енергетичному забезпеченні клітин.

Водночас цитотоксичність і біосумісність NPMе складно виокремити серед інших проблем і вони поки що мають дискусійний характер. Так, наночастинки різного хімічного походження можуть виступати і як прооксиданти через мембранотоксичну дію [601 – 604], і як антиоксиданти [208, 284, 304, 605 – 610], що призводить до блокування цитолітичного синдрому.

Зі зростанням використання наноматеріалів у біотехнології, медицині і сільському господарстві виникла потреба глибшої біохімічної і токсикологічної оцінки дії NPMе у розмірно-концентраційному діапазоні на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів. Необхідно також визначити найбільш небезпечні NPMе, здатні впливати на біохімічні процеси, стан і функціональну активність клітин різних видів організмів, що є також актуальним науково-практичним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано згідно з тематичними планами наукових досліджень Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ»): за НТП 37 (2006–2010), завдання 37.01-017.04 «Визначити структурно-метаболічні характеристики виробничих штамів мікроорганізмів за умов їх підтримання та зберігання», яке виконувалось у рамках завдання 37.01-017 «Вивчити основи формування імунітету і регуляції метаболізму в патогенезі хвороб та застосуванні засобів профілактики і терапії» (ДР 0107U003196); за НТП 32 (2011–2015), завдання 32.01.07.02 Ф «Вивчити механізми впливу наночастинок металів на прокаріотичні та еукаріотичні клітини для забезпечення нанобіотехнологій

ветеринарних імунобіологічних препаратів» (ДР 0111U000800) і 32.02.01.03 Ф «Вивчити біосумісність наноконпонентів кормових добавок, їх вплив на якість і безпечність продукції птахівництва» (ДР 0111U000801), у яких автор визначала біохімічну і токсикологічну дію NPMе на окремі клітини та організм щурів.

Мета роботи – визначити біохімічну і токсикологічну дію колоїдних дисперсій наночастинок металів залежно від їх розмірів на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів та субклітинні фракції, а також експериментально обґрунтувати біосумісність таких наночастинок при отриманні біомаси функціонально активних клітин мікроорганізмів та під час їх зберігання у ліофілізованому стані.

Для досягнення цієї мети у роботі вирішували такі завдання:

1. Визначити генотоксичну дію NPMе (Au, Ag, Cu, Fe, Co[Fe(CN)₆], Co, Zn, MnO₂) у розмірно-концентраційному діапазоні на моделі ізольованих еукаріотичних тест-клітин лінії CHO-K1.

2. Дослідити мутагенну дію NPMе (Co[Fe(CN)₆], Co, Zn) на моделі апікальної меристеми *Allium cepa*.

3. Визначити рівень біохімічних маркерів цитотоксичності наночастинок металів (Ag, Fe, Cu, MnO₂, Au) на моделі субклітинних фракцій еукаріотичних організмів.

4. Вивчити інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних показників їх регуляції в мембранах клітин *Escherichia* spp. за дії NPAu і NPAg залежно від розміру частинок.

5. Визначити рівень питомої H⁺-АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності клітин *Escherichia* spp. та *Salmonella* spp. за дії NPAu і NPAg у розмірно-концентраційній залежності.

6. Визначити біохімічні показники крові та окремих органів білих щурів за дії суміші NPMе порівняно з солями відповідних металів у гострому токсикологічному експерименті.

7. Визначити біохімічні показники крові та окремих органів білих щурів за дії суміші NPMe порівняно з солями відповідних металів у хронічному токсикологічному експерименті.

8. Провести мікроскопічне дослідження контактної взаємодії NPAu та NPAg з клітинами прокаріотичних організмів.

9. Дослідити вплив процесів ліофілізації/регідратації на функціональну активність та рівень біохімічних показників прокаріотичних клітин різних таксономічних видів.

10. Визначити інтенсивність приросту біомаси клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації.

11. Дослідити інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних показників їх регуляції у мембранах клітин *Escherichia* spp. за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації.

12. Оцінити рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації.

13. Вивчити вплив NPAu на інтенсивність приросту біомаси, рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2.

Об'єкт дослідження – біохімічні і токсикологічні процеси за дії колоїдних дисперсій NPMe залежно від розмірів на еукаріотичні та прокаріотичні клітини й на організм білих щурів; структурно-функціональні показники прокаріотичних клітин за взаємодії з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації.

Предмет дослідження – цитотоксичність (генотоксичність, мутагенність, ензиматична активність), біосумісність NPMe (пероксидне окиснення ліпідів, окиснювальна модифікація білків, показники

антиоксидантної системи і енергетичного метаболізму, інтенсивність накопичення біомаси і дихальної активності) за взаємодії з клітинами та після ліофілізації/регідратації; біохімічні і токсикологічні показники дії суміші NPMe на організм щурів.

Методи дослідження – фізико-хімічні (хімічна конденсація, лазерно-кореляційна спектрометрія); біохімічні (спектрофотометрія: визначення ензиматичних активностей, вмісту субстратів і продуктів метаболічних реакцій); трансмісійна електронна мікроскопія; рентгенофлуоресцентний аналіз (визначення вмісту металів); цитогенетичні (гель-електрофорез: «ДНК-кометний» тест; анафазний метод); мікробіологічні; препаративна й аналітична біохімія (отримання субклітинних фракцій); гематологічні; клінічні; статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Доведено, що колоїдні дисперсії NPAu розміру ~30 нм, NPAg – ~30 нм, NPFe – ~100 нм, NPCu – ~70 нм та NPMnO₂ – ~50 нм є безпечними (біосумісними), тоді як NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] і NPZn – ~100 нм у вивчених концентраціях чинять генотоксичну, мутагенну та мембранотоксичну дію на еукаріотичні клітини. На моделі клітин *Escherichia spp.* та *Salmonella spp.* показано біосумісність NPAu і NPAg розміру ~30 нм, яка характеризується уповільненням процесів пероксидного окиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків через зміни каталазної активності, підвищення рівня загальної АОА, мембранної H⁺-АТР-азної і дихальної активності клітин, що носить індивідуальний характер для різних штамів мікроорганізмів у межах одного таксономічного виду. Тоді як NPAu розміру ~20 і ~45 нм за тестуванням цитологічних і біохімічних маркерів спричиняють прооксидантну дію.

Уперше доведено вплив суміші NPMe на організм щурів залежно від дози і тривалості введення. За введення впродовж 30 діб суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла має адаптогенну дію – за біосумісністю та вищою біодоступністю порівняно з її аналогом – солями відповідних металів. Токсична дія суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг і солей металів у дозі 0,3 мг/кг

маси тіла, починаючи з 15-ї і 30-ї діб введення, полягає у розвитку імуносупресії та гепатотоксикозу через оксидативний стрес, превалюванні анаболічних процесів над катаболічними, пов'язаних з адаптаційною мобілізацією ресурсів енергетичного та пуринового обміну, що свідчить про інтенсифікацію видалення і вибірккову дозову тропність металів у організмі тварин.

Виявлено здатність NPAu і NPAg впливати на утворення біомаси *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. після ліофілізації/регідратації та вакцинного штаму *B. anthracis* Sterne 34F2, рівень накопичення якої залежить від показників структурно-функціонального стану мембран та енергетичного метаболізму прокариотичних клітин.

Практичне значення одержаних результатів. Визначення генотоксичності NPMe з використанням методу «ДНК-комет» на моделі евкаріотичних тест-клітин використано в рекомендаціях «Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих клітин» (НМР Держкомітету з ветеринарної медицини України, прот. № 3 від 20.07.2009 р.). Запропоновано нове методичне рішення при визначенні дії NPAu та NPAg за біохімічними маркерами цитотоксичності, що увійшли до рекомендацій «Методи оцінки інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та його регуляції у біологічних об'єктах» (НМР Держкомітету з ветеринарної медицини України, прот. № 1 від 20.12.2007 р.). Розроблений алгоритм системного вивчення біохімічних параметрів токсичності та/або біосумісності NPMe на лабораторних тваринах викладено в рекомендаціях «Токсико-біохімічна оцінка наночасток металів, як потенційних компонентів біопрепаратів і кормових добавок, за показниками безпеки в експериментах *in vivo*» (НМР Держветфітослужби України, прот. № 1 від 21.12.2012 р.).

Експериментально доведено здатність колоїдних дисперсій NPAu і NPAg у діапазоні концентрацій стимулювати накопичення біомаси клітин *Bacillus* spp., *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. виробничих

штамів. Це дає змогу експериментально обґрунтувати використання NРМе при культивуванні прокаріотичних організмів та як кріопротекторів під час їх зберігання у ліофілізованому стані.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно обґрунтовано тему і концепцію дисертаційної роботи, здійснено аналіз даних літератури, розроблено схему та методологію досліджень, виконано усі гематологічні та біохімічні дослідження, проведено статистичну обробку, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено до друку публікації за темою дисертації. Формулювання основних положень, висновків і практичних рекомендацій виконано під керівництвом наукового консультанта академіка НААН А. М. Головка.

Синтез, ідентифікацію та характеристику дослідних зразків NРМе проведено в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ) спільно з к.б.н. Т. Г. Грузіною і Л. С. Рєзніченко; рентгенофлуоресцентний аналіз виконано за консультативною допомогою членкора НААН О. Т. Куцана та спільно з д.вет.н. О. Л. Оробченком; мікробіологічні дослідження – за консультативною допомогою членкора НААН В. О. Ушкалова та спільно з к.б.н. С. М. Дибковою і к.вет.н. О. В. Мачуським. В опублікованих у співавторстві наукових працях задекларовано частку автора.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації оприлюднені на 12 міжнародних наукових і вітчизняних науково-практичних конференціях, конгресах, семінарах та симпозіумах: VII Parnas conference on Biochemistry and Molecular Biology (October 3–7, 2009, Yalta, Crimea, Ukraine); Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (6th–10th September, 2010, Beregove, the Crimea, Ukraine); X Український біохімічний з'їзд (13–17 вересня 2010 р., Одеса, Україна); Mediterranean-East-Europe Meeting. Nano-Euro-Med, 2011 (12–14 May, 2011, Uzhgorod, Ukraine); Міжнародний семінар: Етика нанотехнологій та нанобезпека (13 жовтня 2011 р., Київ, Україна); 3rd ASM

Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens (26–29 June, 2012, in Aix-en-Provence, France); Moderni vymozenosti vedy – 2012 (2012, Praha, Czech Republic); Науково-практична конференція «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів» у межах V Міжнародного форуму «Комплексне забезпечення лабораторій» (26–27 вересня 2012 р., Київ, Україна); II Міжнародний семінар: Етика нанотехнологій та нанобезпека (10 жовтня 2012 р., Київ, Україна); Биотехнология. Взгляд в будущее: II Международная научная Интернет-конференция (26–27 марта 2013 г., Казань, РФ); IV съезд ветеринарных фармакологов и токсикологов России «Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации» (2013, Воронеж, РФ); 23rd International Symposium «New technologies in contemporary animal production» (June 19–21, 2013, Novi Sad, Serbia); конкурсі на премію УААН «За видатні досягнення в аграрній науці» (Київ, 2008 р., отримано диплом лауреата премії), були схвалені на засіданнях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» (2006–2017).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковані у 57 наукових працях, із них: 2 книги, 33 статті (21 – у наукових фахових виданнях України з біологічних наук та 4 – у зарубіжних, які включені до міжнародних наукометричних баз даних, 8 – у наукових періодичних виданнях), 4 деклараційні патенти України на корисну модель, 3 методичні рекомендації, 15 матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Загальний обсяг дисертації – 457 сторінок комп'ютерного тексту, з них основний зміст – 325 сторінок. Роботу ілюстровано 47 таблицями та 67 рисунками, з яких 14 повністю займають площу сторінки. Робота сформована із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, узагальнення результатів досліджень та їх аналізу, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел (включає 617 найменувань, з яких 368 праць – латиницею), 9 додатків.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Коротка довідка щодо термінів і поняття «нанотехнологія». Загальні відомості про наноматеріали та наночастинки, їх фізико-хімічна характеристика та властивості

Перше згадування про методи, які у подальшому будуть названі нанотехнологією, пов'язують з науковою доповіддю Ричарда Фейнмана на щорічній зустрічі Американського товариства фізиків «Там внизу багато місця: запрошення увійти в нову галузь фізики» (1959 р., Каліфорнійський технологічний інститут), в якій науковець довів перспективи мініатюризації з точки зору фундаментальних законів фізики щодо створення речовин прямо з атомів [1].

Термін «нанотехнологія» уперше вжив Норіо Танігучі в 1974 р., визначив його як методи отримання структур розміром від 1 до 100 нм і назвав їх «наночастинками» [2].

У 1981 р. німецькі фізики Г. Бінніг і Г. Рорер створили скануючий тунельний мікроскоп, що дозволив діяти на речовину на атомарному рівні, а у 1985 р. – американські фізики Р. Керл, Х. Крото і Р. Смоллі створили технологію точного вимірювання предметів діаметром в 1 нм.

Вже у 1986 р. термін «нанотехнологія» став відомий широкій публіці. Американський футуролог Е. Дрекслер опублікував книгу, в якій передбачив, що нанотехнологія незабаром почне активно розвиватися [3].

У 2000 р. Адміністрація США оголосила програму «Національна нанотехнологічна ініціатива», у 2004 р. з федерального бюджету було виділено \$3,7 млрд., що вплинуло на розділення нанонауки на значну кількість самостійних напрямків досліджень (наноелектроніка, нанофармакологія, нанобіотехнологія тощо), і по кожному з них здобуто досить багато нових знань щодо наносвіту.

За визначенням «Національної нанотехнологічної ініціативи» (США) «*нанотехнологія*» (англ. *nanotechnology*) – це розуміння і управління матерією на рівні від 1 до 100 нм, коли унікальні явища створюють можливості для незвичайного застосування.

Європейське патентне відомство довело, що термін «*нанотехнологія*» покриває об'єкти, контрольований геометричний розмір хоч би один з функціональних компонентів яких в одному або декількох вимірах не перевищує 100 нм, зберігаючи властиві їм на цьому рівні фізичні, хімічні, біологічні ефекти, а також методи контрольованого аналізу, маніпуляції, обробки, виробництва або виміру.

У матеріалах II загального плану по науці і технологіям (Японія, 2001–2005) термін «*нанотехнологія*» трактовано як міждисциплінарну галузь науки і техніки, що включає інформаційні технології, науки про довкілля, про життя, матеріали, та служить для використання атомів і молекул розміром порядку нм, що дає можливість виявляти нові функції завдяки унікальним властивостям матеріалів на нанорівні.

У Програмі розвитку наноіндустрії в Російській Федерації до 2015 р. зазначено, що «*нанотехнології*» направлені на створення і ефективно практичне використання нанооб'єктів та наносистем із заданими властивостями.

Українська концепція Державної цільової НТП «Нанотехнології та наноматеріали» (2010–2015) свідчить, що «*нанотехнології*» – міждисциплінарні технології, які розроблені для об'єктів розмірами менш як один мікрон і дають змогу проводити дослідження, маніпуляції та обробку речовин у діапазоні розмірів від 0,1 до 100,0 нм.

Так, деякі автори [4, 5] виділяють «нанонауку», що займається пізнанням властивостей нанорозмірних об'єктів і аналізом їх впливу на властивості матеріалів, та «нанотехнологію», що має за мету розвиток цих властивостей для виробництва структур [6, 7]. На практиці ж провести відмінність між цими дисциплінами практично неможливо [8, 9], тому

окремі дослідники [10] пропонують обмежитися лише одним терміном – «нанотехнології», об'єднавши в ньому обидві складові. На міжнародному рівні зі всього різноманіття підходів, що трапляються в наукових публікаціях і політичних документах різних країн, виділяються кілька визначень, які є базовими для створення гармонізованої в міжнародному масштабі уніфікованої системи збору і аналізу статистичної інформації про сферу нанотехнологій [11].

У теперішній час узагальнені такі терміни і поняття в галузі нанотехнології [12, 13]:

Наночастинки – за номенклатурою Міжнародного союзу теоретичної та прикладної хімії це частинки, лінійні розміри яких складають по кожному із трьох вимірів більше 1 та менше 100 нм (греч. *nano*, *nanos* – карлик, гномик, 1 мільярдна метра).

Нанооб'єкт – матеріальний об'єкт (природний або створений за допомогою нанотехнологій), який має хоча б по одному із вимірів лінійний розмір від 1 до 100 нм.

Наноматеріали – матеріали і продукція, які містять структурні елементи, геометрія яких хоча б у одному вимірі не перевищує 100 нм, та володіють якісно новими властивостями, функціями і характеристиками.

Композиційні наноматеріали (лат. *composition*) – матеріали, що містять у своєму складі компоненти з наноматеріалів (наночастинки, нановолокна, вироби зі зміненим або модифікованим поверхневим шаром або покриттям).

Нанонаука (англ. *nanoscience*) – наука надгалузєва, яка вивчає фізичні, фізико-хімічні, хімічні, біологічні, фармакологічні і токсикологічні властивості наночастинок розміром до 100 нм, їх синтез за допомогою сучасних нанотехнологій і використання в різноманітних галузях народного господарства.

Нанобіотехнологія – науковий і технологічний напрям, який об'єднує методи і засоби нанотехнології та біотехнології.

Біосумісність (англ. *biocompatibility*) – здатність наночастинок (донора) вбудовуватися до організму реципієнта, не викликати побічних клінічних проявів та індукувати клітинну відповідь, необхідну для досягнення оптимального терапевтичного ефекту.

Біобезпечність (англ. *biosafety*) – відсутність у наночастинок токсичності для здоров'я людей (тварин) теперішнього і майбутнього поколінь та зовнішнього середовища.

Виділяють такі види наноматеріалів: квантові точки (нанопори), наночастинки, нанотрубки і нановолокна, фулерени, наноструктуровані поверхні і плівки, нанодисперсії, нанокристали і нанокластери [14 – 16]. Проте існує декілька класифікацій, відповідно до яких наноматеріали можна розділяти за багатьма параметрами [17, 18].

За хімічним походженням відокремлюють такі наночастинки [19]: неорганічні – кераміка, метали, сплави; органічні – полімери, біологічні наноструктури (ліпосоми, целосоми), карбонові (фулерени, нанотрубки); неорганічно-органічні – метал-органічні, метал-полімерні структури. Наночастинки металів (NPMе) посідають основне місце серед наноматеріалів.

За типом структур наночастинок класифікують: за особливостями будови, форми, розмірів таких. У природі зустрічаються матеріали, що мають структуру кулі, плівки, трубки, капсули, дендримера, голки, диска, сніжинки, нитки, черепашки, нанопористого матеріалу тощо [13, 14, 20 – 23]. За формою кристали поділяються на сферичні, пластинчасті, волокнисті, рівноважні [24, 25], при цьому товщина шару, діаметр волокна і розмір частинки має бути меншим за 100 нм.

За розмірністю визначають такі види наночастинок [24]: нульвимірні; одновимірні; двовимірні; тривимірні.

Загальні фізико-хімічні властивості наночастинок. Під час переходу речовини від макро- до нанорозмірного стану відбувається різка зміни їх властивостей та біологічної дії, пов'язані зі збільшенням площі

поверхні та зміною електронної структури через квантові ефекти. Речовини у нанорозмірному стані мають низку фізико-хімічних особливостей [26 – 28]:

1. *Збільшення хімічного потенціалу речовин на міжфазній межі високої кривизни, що не є значним для макрочастинок (розмірами близько мікрону та більше).*

2. *Більша питома поверхня наночастинок (в розрахунку на одиницю маси) у порівнянні з макрочастинками збільшує їх адсорбційну ємність, хімічну реакційну, каталітичну і оптичну здатність, що відкриває абсолютно несподівані технологічні та біологічні перспективи, а з іншого боку – може призвести до посилення продукції вільних радикалів (ВР) і активних метаболітів кисню (АМК) та у подальшому до порушення біологічних структур [29, 30].*

3. *Поверхневий натяг і поверхнева енергія наночастинок зумовлюють їх різноманітні властивості, наприклад, термодинамічні (теплоємність у 3–10 разів вища ніж у макрочастинок) [31 – 33].*

4. *Невеликі розміри та різноманітність форм наночастинок дозволяють зв'язуватися їм з нуклеїновими кислотами (викликаючи, наприклад, утворення адуктів дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК)), білками, вбудовуватись у біомембрани, проникати до клітинних органел та змінювати функції біоструктур; мігрувати з повітряними і водними потоками, накопичуватись у ґрунтах, донних відкладеннях.*

5. *Магнітні властивості наночастинок зумовлені дискретністю їх електронних і фонових станів [34].*

6. *Висока адсорбційна активність наночастинок.* Завдяки розвинутій поверхні НР здатні поглинати на одиницю своєї маси у декілька разів більше адсорбуючих речовин, ніж мікрочастинки, але адсорбція на наночастинки різних контамінантів і покращення їх транспорту всередину клітини може підвищувати токсичність останніх. Більшість наночастинок володіє гідрофобними властивостями або є електрично зарядженими, що

посилює процеси адсорбції на них різних токсикантів і здатність проникати через бар'єри організму.

7. *Висока здатність наночастинок щодо акумуляції.* Через маленькі розміри NP заважається їх ідентифікація захисними системами організму, біотрансформація та елімінація, що призводить до їх накопичення у рослинах, тваринах і мікроорганізмах, передаванню харчовим ланцюгом.

8. *Оптичні властивості наночастинок* зумовлені іншою здатністю розсіювання та поглинання світла для макрочастинок (наприклад, колоїдні наночастинки Ауруму дають гамму кольорів – від помаранчевого (розмір менший за 10 нм) і рубінового (10–20 нм) до синього (близько 40 нм) [35 – 37].

Технології отримання наноматеріалів можна поділити на два класи [38 – 42]: технологія «зверху-вниз» заснована на подрібненні, зрушенні масивного матеріалу до рівня наночастинки; технологія «знизу-вверх» – заснована на з'єднанні атомів і молекул до отримання наночастинок. На сьогодні відомі два основні способи одержання наночастинок [38, 39 – 44]:

1) **фізичний**, який включає термічне випарювання наночастинок за умов обробки плазмою, лазером, електричною дугою, конденсацію вихідного матеріалу у вакуумі, механохімічне диспергування, електроерозію, літографію;

2) **хімічний**, що полягає в одержанні наночастинок методами: термічного або радіаційного відновлення металовмісних сполук, розкладання за впливу ультрафіолету (УФ), ультразвуку (УЗ), температури або синтезу у зворотних міцелах, на межі розділу фаз або золь-гель метод.

На жаль, більшість відомих на сьогоднішній день методів дозволяють одержувати наночастинки із широкими коливаннями за розмірами і формою [42 – 54]. Найбільш широке застосування у сучасній біології та медицині знаходять сферичні за своєю геометрією NPMe у розмірному діапазоні 2–100 нм, методом отримання яких є хімічне відновлення водного розчину солі відповідного металу [39, 55].

Унікальні фізико-хімічні властивості визначають значний медико-біологічний потенціал наночастинок і перспективність їх використання у біотехнологіях, діагностиці та клінічній практиці [55 – 79]. З іншого боку, інші властивості та біологічна дія, у тому числі токсична [40, 77 – 83], ніж в речовин у макророзмірному стані, вимагають відносити наночастинок до нових видів матеріалів і продукції, характеристика потенційного ризику яких для здоров'я людини і стану навколишнього середовища є нагальною.

1.2 Теоретичне обґрунтування та напрями використання наночастинок у біології та медицині

Напрями використання наночастинок визначаються перш за все їх унікальним розміром або високим ступенем подрібнення, які суттєво впливають на стан фізико-хімічних властивостей та дозволяють їм вступати в прямий контакт з біологічними тканинами і системами, з інфекційними агентами [30, 55 – 79, 84 – 86], токсинами, у тому числі мікотоксинами [87 – 95], з різними хімічними сполуками органічної і неорганічної природи та структурами клітин (протеїнами, ліпідами, нуклеїновими кислотами) [88 – 93].

Удосконалення існуючих технологічних процесів при виробництві засобів захисту та продуктів (кормів) для людей (тварин), спрямованих на підвищення ефективності кінцевого продукту (специфічності, імуногенності, посилення імунної пам'яті та біодоступності, адаптогенності, поживності, якості), залишається пріоритетним напрямком сучасної біотехнології, медицини та сільського господарства. Одним із можливих шляхів вирішення цих проблемних питань є використання здобутків відносно нового інноваційного сегменту наукового пошуку – нанобіотехнологій.

1.2.1 Використання наноматеріалів при створенні діагностичних засобів. За даними Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ) [94] нанотехнології знаходять широке застосування у практиці лабораторної діагностики гуманної і ветеринарної медицини. Перспективи впровадження

нанотехнологій у діагностику особливо небезпечних захворювань та виявлення структур або речовин, хімічних агентів у макроорганізмі та навколишньому середовищі пов'язано [30, 79, 92, 96] перш за все із використанням обладнання, яке дозволить визначати окремі об'єкти на атомарному і молекулярному рівні та реєструвати міжмолекулярні взаємодії із розробкою нанопристроїв, а також введенням у систему діагностики міток на основі наночастинок і нанокластерів [97, 98].

Наприклад, притаманні наночастинам Феруму (NPFe) якісно нові властивості суперпарамагнетизму і підвищеної реакційної здатності визначають перспективність їх застосування як контрастних агентів для магнітно-резонансної томографії (МРТ), а також у магнітній доставці лікарських засобів [99 – 102].

Дослідженнями показано, що УЗ-хвилі, магнітний резонанс, флуоресценція, ядерна та комп'ютерна томографія, сприймаючи наночастинок, можуть візуалізувати отримане зображення [35, 103 – 105]. Яскраві плями вказують на те, що декілька клітин у зазначеній області можуть бути на межі мутації і неконтрольного росту, що дозволяє припускати можливість здійснення прикінцевого діагнозу без застосування інвазивних процедур, таких як біопсія.

Наночастинок, на які нанесені антитіла і фрагменти ДНК, мають властивість посилювати сигнал з численних біомолекул організмів, проявляючи величезний потенціал для виявлення маркерів захворювань, передракових клітин і фрагментів вірусів. Так, синтезовано спеціально заряджений нанопровід зв'язаний рецептором антитіла, який може виявляти наявність онкомаркерів у крові [106].

Для спрощення детекції біотоксинів, ксенобіотиків, наркотиків, а також бойових отрут та їх ідентифікації намагаються створити спеціальні біочипи і наносенсиори [30, 84, 107, 108]. Вже розроблені такі пристрої дозволяють ідентифікувати, збудники віспи тварин, сибірки, біотоксини різного генезу, сероваріанти збудника грипу, включаючи пташиний грип.

Для спрощення діагностичних тестів на небезпечні інфекційні захворювання у наукових установах колишнього СРСР розроблялися тест-системи імуноферментного аналізу (ІФА) для індикації бактерійних токсинів (ботулізм, сальмонела, лістерія тощо) у сировині тваринного походження, харчових продуктах і кормах [99, 109]. Біоспецифічна агрегація наночастинок призводить до зміни кольору колоїдної наносистеми, що дозволяє використовувати їх як нанодатчики і наносенсиори небезпечних речовин, при детекції збудників інфекційних захворювань у клінічному матеріалі.

За полімеразною ланцюговою реакцією на смужках нітроцелюлозних мембран розроблено лабораторну модель біосенсорної індикації геномів і антигенів збудників сальмонельозу у об'єктах ветеринарного нагляду, що забезпечує високу чутливість, специфічність, швидкість проведення аналізу в режимі реального часу (1–2 год) [39, 110, 111].

Доволі актуальною на сьогодні є проблема діагностики паразитарної та бактеріальної інфекції в людей через продукцію тваринництва. З 2005 р. у секторі функціональної геноміки ІЦІГ СО РАН проводять роботи щодо молекулярно-генетичного дослідження із використанням наночипів трематод *Opisthorchiidae*, які викликають важкі захворювання печінки.

Ведуться пошукові дослідження щодо отримання штамів мікроскопічних грибів-суперпродуцентів за допомогою гетерологічної експресії, кристалічних стандартів мікотоксинів і розроблення тест-систем для експрес-аналізу наноконцентрацій мікотоксинів в продуктах харчування, кормах, об'єктах санітарного і ветеринарного нагляду та наноелектронних «лабораторій на чипі» з біосенсорами для моніторингу забруднення зерна Т-2 токсином, афлатоксином, зеараленоном, охратоксином, фумонізином, а також створення наносорбенту і обладнання для поточного очищення зернової продукції [87 – 95, 111 – 113].

Отже, впровадження нанотехнологій у лабораторну практику дозволить підвищити чутливість і експресність систем діагностики

емерджентних хвороб тварин і детекції основних небезпечних контамінантів у сировині, кормах та продукції тваринництва.

1.2.2 Використання наноматеріалів за цільової доставки ліків у клітини-мішені. Завдяки нанобіотехнологіям з'явилися нові способи введення і доставки імунотропних препаратів та лікарських засобів шляхом закріплення їх на наноматеріалах (альбумін, ліпосоми, поліетиленгліколь(ПЕГ)-вмісні структури, фулерени, дендримери, хітозан, нанотрубки, нанокапсули, наносфери), лігандів спрямованої дії (антигени або антитіла), таргетної доставки антигену до імунокомпетентних органів та антигенпрезентуючих клітин, зменшення дози та забезпечення пролонгованої дії ліків [15, 102, 107, 108, 114 – 116].

Деякі наноматеріали саме володіють терапевтичними властивостями, наприклад, доведено здатність фулеренів проявляти противірусну та антибактеріальну дію [115].

Найкраще зарекомендували себе ліпосоми і полімерні наночастинки, скільки такі структури підлягають біодеградації та не здатні до кумуляції [53, 59, 61, 77, 91, 92, 117, 118], адже завдяки швидкому проникненню крізь мембрани клітин, можуть інкапсулювати, що підвищує їх стабільність, розчинність й абсорбцію.

У експериментах на тваринах доведено здатність біокон'югованих наночастинок доставляти такі протипухлинні препарати як паклітаксель, 5-флуорурацил, доксорубіцин [59, 119 – 124], але необхідні дослідження щодо контролю надходження їх до органа-мішені та вивільнення лікарського засобу з них не проведені [67, 125 – 127].

Ефективність застосування наноматеріалів як засобів доставки продемонстровано на моделі збудника бруцельозу [124].

За даними МЕБ [94] більшість розробок імунотропних засобів із залученням нанотехнологій спрямовані на удосконалення таргетної доставки препарату та ефективність. Так, NPMe мають виражені ад'ювантні властивості, а їх введення до складу вакцин забезпечує доставку відповідного

антигену безпосередньо до клітин, мінімізуючи можливі ризики, та наробку антитіл навіть на не імуногенні молекули [128 – 133].

У роботі Дикмана Л.О. і Богатирьова В.О. [130] описано успішний досвід застосування наночастинок Ауруму (NPAu) у складі антивірусної вакцини як носіїв білкового антигену вірусу кліщового енцефаліту, що має більш високі протективні властивості порівняно з комерційними аналогами.

Ще один напрям застосування наночастинок – як засобів з доставки антигенів особливо небезпечних патогенів і ДНК-вакцин [131, 132, 134]. Імобілізація компонентів вакцин на наногранулах призводить до підвищення їх імуногенності та стабільності.

Прикладом нановакцини є емульсія, яка містить надмаленькі крапельки олії з активною поверхнею, стабілізовані детергентами та які специфічно реагують із зовнішніми мембранами клітин інфікованих організмів. За результатами тестів на мишах, яким розпилювали наноемульсію інтраназальним шляхом, реєстрували високу імунну відповідь в організмі [135].

Досить цікаві напрацьовані результати щодо трансдермальної доставки імунотропних препаратів із застосуванням нанопластичів з мікропротрузією [94]: наноструктуровані антигени та інші білки, пептиди, пептидні гормони та речовини вивільнюються з оболонки протрузії та приймаються крізь епідермальний бар'єр клітинами імунної системи.

На сьогодні є актуальним вивчення імуногенетичних факторів патогенності збудників емерджентних захворювань с.-г. тварин (бруцельоз, сап, кампілобактеріоз, клостридіоз, некробактеріоз) і розроблення біобезпечних препаратів з високою протективною активністю на основі нанопротеоліпосомальних комплексів. Доведено, що ліпосоми є подібними за гідрофільністю та гідрофобністю до фосфоліпідів біологічних мембран, тому забезпечують не лише цільову доставку, а й регуляцію швидкості вивільнення діючої речовини [121, 134, 136 – 142]. Вже впроваджені в

медичну практику такі ліпосомні препарати, як ліпін, ліолів, ліподокс, ліпофлавіон, амбісон, ліпоферон.

На основі ліпосомальної суспензії з розміром частинок 10–50 нм, отриманої із фосфатидного концентрату сої і L-токоферолу, створено вірусвакцину суху ліпосомальну проти інфекційного ларинготрахеїту птиці та захисне середовище на основі суспензії «Ліпоферол» [116, 123].

У досліджах *in vivo* та *in vitro* за різних патологічних моделей (гіпоксія, ішемія міокарда, геморагічний шок, вплив радіації), встановлено профілактичну та лікувальну дію фосфатидилхолінових ліпосом на стан тканинного метаболізму, функцію судин, гемодинаміки та діяльність серця [139 – 141, 143].

Полімери – наночастинки полісахариду хітозану також можуть бути використані як системи для таргетної доставки [143]. Зараз розробляють водорозчинні полімерні наночастинки, що знаходяться в комплексі з білком чи молекулою препарату та представляють наносферу або капсулу [125, 127, 128]. Така структура зменшує імуногенність нанопрепаратів, збільшує їхній період півжиття, підвищує їх проникність через гістогематичні бар'єри та всередину клітини [137, 143 – 138].

Внутрішньоклітинна локалізація ряду патогенів через клітинний бар'єр заважає лікуванню відомими антибіотиками, ефективними у тестах *in vitro*. Уведення у систему таргетної доставки ліків наночастинок забезпечує пролонговане потрапляння речовин до «клітин–мішеней», зменшення концентрації діючої речовини, знижуючи її токсичну дію та покращуючи фармакологічні властивості препарату [28, 59, 149, 150].

1.2.3 Використання наноматеріалів при конструюванні нанонутрицевтиків та біологічно активних добавок спрямованої дії. Унікальні біологічно-активні властивості наночастинок відкривають широкі перспективи їх використання у біотехнологіях конструювання нанонутрицевтиків [111 – 113, 151, 152].

На сьогодні дефіцит мікроелементів у харчуванні населення визнано проблемою світового рівня, від Африки і Азії до Європи й Америки [153 – 156]. Зокрема, нестачу Феруму (Fe) відчуває більш 1 млрд. населення Землі, Хрому (Cr) – до 3 млрд., Купруму (Cu) – до 3,8 млрд., Цинку (Zn) – до 4,5 млрд. відповідно. За даними експертів Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), дефіцит мікроелементів стане головною кризою в харчуванні населення Землі у XXI столітті [156].

Не менш гостро стоїть проблема дисбалансу мікроелементів стосовно сільськогосподарських тварин, без яких неможливо забезпечення людей повноцінною їжею. Збагачення екологічно чистими, біодоступними мікроелементами продуктів харчування людей і кормів для тварин [157] є актуальним питанням через використання металів саме у тій формі, в якій вони присутні та функціонують в організмі, та при потраплянні в клітину, безпосередньо беруть участь в метаболізмі.

Так, у складі нанонутрицевтиків NPZn та NPMn [75], а також інші NPMe розглядаються як субстанції для виготовлення та як складові кормів і засобів, які можуть широко застосовуватися у лікуванні, діагностиці та профілактиці захворювань тварин різної етіології [158 – 162]. З іншого боку, відомо, що дефіцит ряду металів, так званих есенційних, призводить до виникнення багатьох патологічних порушень. Показано, що більшість захворювань супроводжується значними змінами в балансі металів-мікроелементів, а введення в організм останніх призводить до отримання терапевтичних результатів.

Велику увагу дослідників як інструмент нанобіотехнологій привертають природні субстанції.

Випробування розроблених преміксів на основі наноструктурованого природного мінералу бентоніту VITAL ULTRA у «Центрі наноструктурних матеріалів і технологій» (Російська Федерація) дозволили отримати економічний ефект за рахунок збільшення зберігання, приросту маси тварин,

якості продукції та скорочення загибелі, строків вирощування і витрат корму [162].

Учені французької компанії «Олмікс» розробили технологію з використанням адсорбенту з морських водоростей роду *Ульва*, який через зміну структури глини монтмориллоніту, значно посилює її адсорбційну здатність щодо мікотоксинів. За допомогою такої модифікації створено нанопрепарат Амадеїт, площа адсорбційної поверхні якого в порівнянні з аналогом більша в 10 млн. разів [109, 110].

У птахівництві, свинарстві та скотарстві наночастинки застосовують як кормові та біодобавки, сорбенти мікотоксинів, залишків пестицидів і токсинів бактерійальної етіології [4 – 10, 62, 89 – 95], мінеральні добавки і засоби детоксикаційної терапії, виготовлені з залученням нанотехнологій («Провими», «Олмікс», «МТох», «МТох+», MFeed тощо) [109, 110, 116, 162, 163].

Нанопрепарати з ембріонально-плацентарних рідин і тканин, що позитивно впливають на імунітет, обмінні процеси, виконують відновлювальну роль при запальних процесах [110]. При внутрішньом'язовому введенні заплідненість корів підвищується на (8 – 10) %; при внутрішньочеревному введенні новонародженим телятам з диспепсією кількість видужуваних тварин збільшується на 14 % відносно контролю, а при лікуванні різаних і опікових ран одужання настає раніше, що забезпечує значні економічні ефекти.

Науковцями спільно з ЗАТ «СНС-Фарма» (Російська Федерація) розроблено препарат «Нанобетулін» (екстракт берести), який використовують в лікувальних або профілактичних цілях у вигляді аерозолів або наносуспензій у воді, володіє біологічно активними властивостями, має гепатопротекторну, гастрозахисну, жовчогінну, гіпохолестеринемічну, протизапальну, протиракову та антиоксидантну дії, підвищує емульгуючу здатність молока в емульсіях прямого типу, а також стійкість продуктів до окиснення [109].

Також ученими спільно з ЗАТ «АМФІТ-Технологія» [109, 110] створено капсульований препарат «Лиарсин», який являє собою екстракт з природних наноконпонентів у восковій капсулі та застосовується в якості кормової добавки при порушенні обміну речовин та із дезінтоксикаційною метою.

Відомий препарат «Содексин К-75» зі вмістом у своєму складі гліциризинової і оксикоричної кислот та наночастинок Аргентуму, який застосовується для підвищення імунобіологічної резистентності, лікування ран, абсцесів, диспепсії, гострих респіраторних захворювань, маститів та ендометритів, попередження безпліддя та отримання здорового молодняка великої рогатої худоби (ВРХ) [109].

Отже, дослідження щодо біологічного впливу наночастинок з властивостями, що надають їм переваг перед іншими матеріалами, передбачають їх біосумісність та спрямовану адаптогенну дію на організм [109 – 113, 116, 142, 155, 156, 162 – 168].

1.2.4 Використання наноматеріалів з метою регуляції функціональної активності клітин мікроорганізмів та при отриманні їх біомаси. Прокаріотичні клітини, завдяки унікальним структурним властивостям та своєму метаболізму здатні активно контактувати з мінеральними компонентами навколишнього середовища [169 – 171], до яких відносяться і NPMе. З іншого боку, бактерії суттєво, часто різноспрямовано, впливають на організм людини і тварин [172 – 182], а за медико-біологічними властивостями бактеріальні клітини та продукти їх життєдіяльності використовуються для отримання ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ) різного профілю [168, 183, 184].

Біотехнологія отримання пробіотичних препаратів пов'язана з деякими складнощами та проблемами, що виникають у процесі виробництва та використання пробіотиків. Найбільш суттєвими з них є такі: обмежена антагоністична активність штамів-продуцентів до численних патогенних агентів; недостатня швидкість приросту біомаси штамів-продуцентів; висока

собівартість пробіотичних препаратів внаслідок використання складного комплексу ростових субстратів для нарощування біомаси штамів-продуцентів; недотримання принципу макроекологічної адекватності при лікуванні дисбіозів різноманітного походження [174 – 183].

Позбутися більшості із зазначених проблем можна, використовуючи речовини, що здатні стимулювати метаболічну та антагоністичну активність клітин штамів-пробіонтів [184 – 186]. Тому пошук нових речовин, що дозволяють активувати метаболічно-захисні реакції штамів-пробіонтів, має високе практичне значення.

Як результат фундаментальних досліджень, сформульоване наукове підґрунтя отримання комплексних пробіотичних препаратів, що містять у своєму складі NРМе [187 – 190]. Це дозволяє вирішити дві проблеми: по-перше, уникнути токсичної дії металу, як це спостерігається у випадку іонформи, при цьому забезпечивши підвищений рівень відповідних металів-мікроелементів у організмі без значного перевищення їх фізіологічних концентрацій; по-друге поєднати стимулюючий ефект металів у наноформі на біологічну компоненту пробіотика та їх цінні біологічні властивості як мікроелементів, що призведе до підвищення ефективності пробіотичного препарату в цілому [191 – 193].

У такому контексті NРМе можна розглядати як субстанції при виготовленні ВІЗ [156 – 158, 194]. На сьогодні вже відомі напрацювання учених у цьому напрямку. Так, завдяки регуляції кишкової мікрофлори препарат «Гидрогемол», який являє собою кислотний гідролізат крові тварин, що містить замінні і незамінні амінокислоти, наноформи мікроелементів, молочну та янтарну кислоти і відноситься до групи пребіотичних препаратів. Застосування препарату сприяє зниженню захворюваності на 30–50 %, смертності – в 5–8 разів, підвищенню приросту живої маси – в 1,3–1,6 разу [109].

Російськими ученими та виробниками створений протифузобактеріальний терапевтичний нанопрепарат «Фузобаквелт»

(наноструктурована композиція субстанції Велтон), який проявляє високу біоцидну активність щодо *Fusobacterium necrophorum* як *in vivo*, так і *in vitro*. Терапевтична ефективність застосування препарату при лікуванні корів, хворих некробактеріозом, склала 90 % [109, 110].

Розроблено біоцидні препарати на основі металів у формі ультрадисперсних нанопорошків. Такі засоби від патогенної мікрофлори цілеспрямовано посилюють продуктивність с.-г. тварин за рахунок підвищення засвоюваності рослинних кормів [109].

Визначення особливостей модуляції NPMe біохімічних процесів біологічних систем різного рівня організації відкриває нові перспективи у фундаментальному розумінні їх впливу на стан та функціональну активність клітин [57, 58, 76, 194 – 197].

Так, встановлені ефективні розмірні та концентраційні діапазони деяких NPMe, в яких спостерігається або виражена стимуляція усіх показників життєдіяльності клітини мікроорганізму, або є наявним значне пригнічення функціональної активності із вираженим бактерицидним ефектом [82, 198 – 201]. Характер впливу наночастинок на інтенсивність приросту біомаси клітин штамів мікроорганізмів залежать від їх виду, концентрації, часу дії на культуру бактеріальних клітин [202 – 204, 209].

При дослідженні впливу NPMe на функціональний стан бактеріальних клітин доведено можливість контролювання та управління інтенсивністю їх фізіолого-біохімічних реакцій [187 – 189, 204 – 211].

Фізико-хімічні механізми контактної взаємодії дисперсних форм металів із бактеріальними клітинами вивчені в основному на моделі колоїдного Ауруму [208 – 214].

Існує гіпотеза [210 – 214, 218 – 224] щодо механізмів селективної взаємодії інтактною бактеріальною клітиною з наночастинокими, яка базується на фізико-хімічній моделі подвійного електричного шару клітини.

Дана гіпотеза стала підґрунтям для проведення циклу досліджень [206, 213, 221 – 223], спрямованих на вивчення особливостей взаємодії NPMe з клітинами бактерій.

Отже, регламенти застосування NPMe можуть бути використані у клініко-діагностичній медицині як *компоненти імунобіологічних засобів* із використанням носіїв і кон'югатів на основі наноструктур та *діагностичних засобів*; як *субстанції* при створенні *безпечних нанонутрицевтиків адаптогенної дії* нового покоління; як *вектори та носії лікарських речовин* при їх «адресному» постачанні до певних «клітин-мішеней»; як *стимулятори фізіолого-біохімічних реакцій і протектори біологічних властивостей* за підтримання і тривалого зберігання *клітин мікроорганізмів*; як *антимікробні, дезінфікуючі та противірусні засоби*.

1.3 Характеристика, способи отримання та фармакологічні властивості деяких наночастинок металів

На сьогодні для потреб біотехнологій та клінічної практики найперспективнішими вважають NPMe таких як Ферум, Цинк, Силіцій, Аурум, Купрум, Аргентум, Титан та їх оксидів контрольованого розміру в нанодіапазоні (від 5 нм до 60 нм) [34 – 38, 42 – 45, 59 – 73, 78, 86, 104, 105, 165 – 167, 201– 203, 205, 224]. Значно менше досліджень присвячено вивченню властивостей наночастинок Магнію, Мангану, Кобальту, Вісмуту тощо.

Розроблені декілька методів отримання частинок нанометалів. Фізичні – подрібнення масивної речовини до частинок відповідних розмірів. Хімічні методи ґрунтуються на відновленні іонів металів до атомів у розчині [225, 226].

Речовина у нанодисперсному стані надзвичайно реакційно активна, оскільки має велику питому поверхневу енергію, тому швидко агрегує одна з одною, взаємодіючи з речовинами в навколишньому середовищі, руйнується, окиснюється тощо. Існують різні варіанти хімічного синтезу, що

розрізняються за типом відновника та способом стабілізації NPMe [52, 227 – 229]. Так, метод біохімічного синтезу NPMe включає відновлення іонів металів у розчині з подальшою агрегацією атомів та іонів з утворенням наночастинок у внутрішньому середовищі зворотної міцели, яка являє собою дуже маленьку бульбашку, оболонка якої утворена молекулами поверхнево-активної речовини, а всередині (у водному ядрі) знаходяться вода та іони металу [46, 230 – 232].

За розмірами NPMe знаходяться між молекулами фосфоліпідів, що входять до складу клітинних мембран і клітин. Цікаво відзначити, що є очевидна подібність між просторовою будовою наночастинок і деяких вірусів: багато фагів, віруси ракових пухлин, деякі аденовіруси, віруси герпеса, вітряної віспи [27, 43, 49, 50, 54].

Відомо, що NPMe складаються з ядра й оболонки, яка завжди містить легкі атоми (O, C, B, S і ін.). Підраховано [56], що NPMe діаметром 10 нм містять 103–104 атоми металу; у діапазоні 1–30 нм – на поверхні окремо взятої частинки завжди є продукти взаємодії із середовищем, що виявляють істотний вплив на властивості таких [16, 52].

Більш за все привертають увагу дослідників та клініцистів есенційні метали. Оскільки їх іонформа характеризується незначним рівнем засвоєння, токсичністю та внаслідок цього низьким порогом допустимої концентрації, актуальним стає питання щодо форми їх надходження у клітину [46, 233 – 241], тому метали у нанодисперсному стані розглядаються як перспективні новітні матеріали.

1.3.1 Наночастинок Аргентуму. Аргентум (Ag) – найдефіцитніший для організму мікроелемент, необхідний для нормального функціонування залоз внутрішньої секреції, мозку, печінки та інших органів; найкраще серед металів проводить тепло та електричний струм. Однак Аргентум відносять до важких металів, що чинять негативну дію на організм, а при тривалому застосуванні – накопичується в організмі з розвитком токсичних реакцій [166, 242].

Наночастинки Аргентуму (NPAg) є своєрідною депонованою формою іонів металу, які постійно генерують і елімуються з поверхні по мірі їх зв'язування з біологічними субстратами [42 – 44, 243, 244]. При цьому локально (поблизу поверхні частинок) створюються великі концентрації іонів, згубні для мікробів, але нешкідливі для макроорганізму в цілому. Це забезпечує більш м'яку, пролонговану дію препаратів кластерного і колоїдного Аргентуму.

Розроблена технологія отримання NPAg з розчинів міцел – водних розчинів, в яких наночастинки не втрачають своїх властивостей і продовжують залишатися стабільними у середньому близько півроку [225, 245, 246].

Значний науково-практичний інтерес мають дослідження препаратів із вмістом NPAg [28, 165, 166, 193, 194]. Біологічна дія NPAg визначена їх каталітичними властивостями, а метал у нанопрепаратах може працювати і як реагент (переважно у вигляді іонів і комплексів), і як каталізатор (у вигляді NP). Перш за все, препарати Аргентуму мають широкий спектр антибактеріальної дії [200, 248 – 250], отже теоретично і практично існує потенційна небезпека їх бактерицидного впливу на нормальну мікрофлору організму людини і тварин.

Наночастинки Аргентуму надзвичайно активні і викликають загибель бактерій, вірусів, грибків, завдяки розвинутій питомій поверхні, яка зумовлює взаємодію електростатичних сил мікробної клітини, що має негативний заряд, і позитивно заряджених іонів металу, що підвищує бактерицидні властивості останнього [171, 226, 251 – 257]. Під час розгляду еволюції Аргентуму від іонів до наночастинок та дослідженні дії різних препаратів металу на віруси, бактерії та клітини, встановлено, що біоцидний ефект NPAg у тисячі разів перебільшує дію його іонформи в цих же концентраціях.

Прямими експериментами *in vitro* доведено інгібіцію NPAg у діапазоні розмірів 1–10 нм вірусу імунодефіцита людини (ВІЛ). При просторовому

розміщенні NPMe відбувається їх взаємодія з ВІЛ шляхом прикріплення до gp120 глікопротеїдним наростам, внаслідок чого уповільнюється контакт вірусу з клітинами хазяїна [152].

Низкою авторів доведено [42, 202, 257, 258], що дія NPAg специфічна не до інфекції (як у антибіотиків), а по відношенню до клітинної структури. Будь-яка клітина без хімічно стійкої стінки (таку клітинну будову мають бактерії та інші організми без клітинної стінки, наприклад, позаклітинні віруси) схильна до дії Аргентуму. Оскільки клітини ссавців мають мембрану абсолютно іншого типу, яка не містить пептидаміногліканів, тому метал на них не діє.

Окрім традиційних механізмів інгібіції патогенних мікроорганізмів низкою авторів відмічено специфічні явища, пов'язані з фізичними особливостями саме металу. При інактивації вірусів встановлено синергічний ефект між Аргентумом та УФ-випромінюванням [260]. Показано синергізм антимікробної дії металу та електромагнітного поля [261, 262], що зумовлює загибель деяких видів бактерій і вірусів.

У останні роки NPAg використовують для покращення флуоресценції в імунодіагностиці [263].

Наводяться приклади успішного застосування NPAg при лікуванні хворих на остеомієліт, гнійні рани, в комплексному лікуванні бактеріального вагіноза, опікових ран, ЛОР-захворювань у дітей, хронічних запальних захворювань органів малого тазу, а також у хірургії, травматології, ветеринарії та ін. [28, 165, 166, 226, 253, 255, 264, 265]. Таким чином, застосування NPAg дозволяє значно знизити концентрацію металу в лікарських формах зі збереженням бактерицидної активності.

Наночастинки Аргентуму активні проти мікроорганізмів, стійких до антибіотиків. Показано, що Аргентум у вигляді колоїдних і кластерних препаратів по відношенню до нормальній кишечної мікрофлори є безпечним, а у рекомендованих концентраціях і дозах, на відміну від антибіотиків, не

викликає дисбактеріоз, а навпаки, навіть сприяє нормалізації мікробіоценозу в організмі [266, 267].

Сьогодні вже активно застосовують ветеринарний препарат «Арговит», призначений для профілактики і лікування кишкових інфекцій як бактеріальної, так і вірусної етіології у всіх видів тварин і птиці, причому без будь-яких обмежень на продукцію, що отримана від цих тварин [268].

Розроблена антибактеріальна композиція на основі дисперсії NPAg, яка активна відносно широкого спектру грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів і введена під торговою маркою «Мірамістин®». Стабілізовані у «Мірамістині» NPAg мають діаметр 9–10 нм, взаємодіючи з клітинною мембраною, зменшують її стабільність і збільшують проникність, проявляють високу ефективність при лікуванні інфікованих ран з осередками некрозу в тварин [269].

Автори розроблених нанопрепаратів, в яких присутні метали у формі ультрадисперсних нанопорошків, доводять, що вони мають поряд з високими біоцидними властивостями істотно меншу токсичність [267, 268].

Останнім часом широке розповсюдження отримали перев'язочні матеріали, що містять колоїдні NPAg [270]. Доведені їх високі антимікробні та ранозагоювальні властивості, однак різниця у способах виготовлення, концентраціях, розмірах частинок, природі матеріалу-носія та ін. ускладнюють коректне порівняння продуктів. Подібні перев'язочні матеріали пройшли успішні випробування у Німеччині, Франції, Італії [104, 105, 259, 271, 272] та виявили поряд з бактерицидним ефектом здатність до прискорення загоєння рани шляхом зв'язування в зоні обробки продуктів метаболізму бактерій (ендотоксинів, що утворені під час загибелі клітин).

З іншого боку, під час застосування колоїдного Аргентуму визначено зв'язок між антимікробною дією та напруженістю імунітету, тобто його терапевтичний ефект досягається в результаті стимуляції ретикуло-ендотеліальної системи та обміну речовин [258, 261, 262, 273].

Високодисперсний металевий Аргентум має імуномодулюючі властивості порівняно зі стероїдними гормонами. Так, встановлено посилення макрофагальної активності, стимуляцію стовбурових клітин і гуморальних імунних реакцій на фоні зникнення молодих форм нейтрофілів, збільшення кількості лімфоцитів і моноцитів, еритроцитів і загального гемоглобіну, уповільнення швидкості осідання еритроцитів, що свідчить про специфічний захист організму особливо на фоні вираженої низької імунної резистентності [273, 274]. Зареєстровано стимулюючу дію іонів Аргентуму на кровотвірні органи з посиленням окиснювальних процесів у головному мозку в 2 рази, що покращує його функції та утворення імуноглобулінів класів А, М і G і абсолютної кількості Т-лімфоцитів.

Відомо, що NPAg беруть участь в синтезі ряду ферментів, гормонів і вітамінів [28, 194], залежно від концентрації катіони металу можуть як стимулювати, так і пригнічувати активність деяких ферментів.

Під впливом Аргентуму вдвічі зростає інтенсивність окиснювального фосфорилування в мітохондріях головного мозку та вміст нуклеїнових кислот, а при підвищенні його концентрації до 0,01 мкг знижується ступінь поглинання кисню (O_2) клітинами тканин. За умов інкубації різних тканин у розчині вмістом 0,001 мкг Ag зростає поглинання O_2 мозковою тканиною на 24 %, міокардом – на 20 %, печінкою – на 36 %, нирками – на 25 % відповідно, що вказує про участь металу в енергетичних процесах [166, 242, 275].

Слід зауважити, що на сьогодні розроблені технології отримання NPAg та методи їх застосування у клінічній практиці. Крім того, доведені механізми дії металу в різних хімічних формах на мікроорганізми, але остаточно не з'ясовані біологічні, у тому числі й токсичні, ефекти його нанодисперсної форми, отже, продовження досліджень сприятиме більш глибокому розумінню механізмів цих ефектів.

1.3.2 Наночастинки Купруму. Купрум (Cu) відноситься до тієї ж підгрупи періодичної системи лужних металів, що й Аргентум і Цинк, властивості наночастинок яких інтенсивно вивчаються [276 – 278].

Купрум проявляє до кисню незначну активність, але у вологому повітрі поступово окиснюється і покривається плівкою зеленуватого кольору, в сухому повітрі окиснення відбувається повільно, на поверхні металу утворюється дуже тонкий шар його оксиду, також окиснюється при нагріванні.

Купрум у присутності O_2 повільно може взаємодіяти з водою, за відсутності – не взаємодіє. Знаходячись в ряді напруг після Гідрогену, Купрум не витісняє його з кислот, тому соляна і розведена сірчана кислоти на нього не діють. З присутності кисню Купрум розчиняється в цих кислотах з утворенням відповідних солей [242].

Метал добре реагує з галогенами та є сильним дегалогенуючим агентом. Відома властивість наночастинок Купруму (NPCu) каталізувати реакції з участю ВР, тому саме реакції галогенвуглеводнів обрані як модельні процеси для вивчення каталітичних властивостей стабільних NPMe в міцелярних середовищах [202].

Основна проблема під час отримання NPCu – це їх нестабільність та швидке розкладання на атоми металу та окиснений відновлювач. Для синтезу NPCu використовують сульфат міді, деіонізовану воду, а для отримання зворотніх міцел – ПАВ (натрієву сіль біс-(2-етилгексил) сульфосукцинату), як розчинники – октан, ізооктан, як відновлювач – кверцетин [279, 280], проводячи адсорбцію наночастинок за зміною спектрів оптичного поглинання міцелярного розчину після занурення адсорбенту.

Відомий спосіб отримання NPCu методом біохімічного синтезу в зворотніх міцелях шляхом хімічного відновлення іонів металів із їх солей [281], які є стабільними в присутності O_2 повітря до року і більше.

Установлені біоцидні та консервуючі властивості NPCu та препаратів на їх основі. У якості активної основи-субстрату використовують

суперконцентрати дисперсій NPCu, що були отримані методом рідиннофазного відновлення та проявляли високу бактерицидну активність до різних видів мікроорганізмів [202, 282].

Встановлено, що солі металічного Cu, NPCu, як і NPAg, мають антибактеріальні та протигрибкові властивості [104, 273, 282], а також сприяють регенерації тканин, беруть участь у ряді синтетичних процесів, зокрема у синтезі мієліну, колагену, еластину та поліпшують засвоєння деяких вітамінів, тощо [18, 28, 242, 283]. Тому Купрум завдяки бактеріостатичній дії застосовують для прискорення процесу загоєння ран.

Купрум – важливий життєвонеобхідний елемент, що приймає участь в багатьох фізіологічних процесах: синтезі гемоглобіну, утворенні кісткової тканини, функціонуванні системи кровотворення і центральної нервової системи, входить до складу ферментів тирозинази і цитохромоксидази [242]. Виводиться Купрум із організму переважно через ШКТ, в меншій мірі – через нирки. При застосуванні препаратів Купруму *per os* біометал швидко всмоктується і реєструється у крові вже через 30–40 хв.

Біосумісність Купруму полягає у регулюванні в організмі рівня холестерину, цукру і сечової кислоти в крові, підтриманні балансу мікрофлори кишечника через гальмування росту дріжджових мікроорганізмів [242, 282].

Купрум також підвищує стійкість організму до гіпоксії, сприяє регенерації тканин (наприклад, запобігає виникненню виразки шлунку, яка виникає на фоні приймання великих доз аспірину), підсилює дію антибіотиків. Існують повідомлення щодо здатності даного металу стимулювати імунітет, впливаючи на первинні та вторинні імунні реакції, виявляти гіпоглікемічний ефект, підсилюючи дію інсуліну, зменшувати швидкість розпаду глікогену в печінці тощо [283].

Таким чином, NPCu характеризуються значною біологічною активністю та є активними проти антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, менш токсичними ніж макродисперсна форма металу [77,

104, 279], тобто, подальше розроблення лікарських засобів на основі NPCu потребують методів оцінювання їх біодоступності та біосумісності.

1.3.3 Наночастинки Ауруму. У теперішній час спостерігається тенденція збільшення уваги щодо ауротерапії, насамперед у нетрадиційній та гомеопатичній клінічній практиці. З одного боку – у традиційній медицині Аурум (Au) характеризують як інертний метал, а препарати, що його містять (зокрема колоїдна форма Ауруму), широко рекламують та продають як біологічно активні добавки. З іншого боку, ряд авторів все ж таки стверджують про суттєву біоактивність Ауруму та його препаратів [35 – 37, 57 – 60, 62, 65 – 73].

Сучасне використання препаратів із вмістом Аурум у макродисперсній формі стосується в основному лікування ревматоїдного артриту, але, враховуючи протизапальні властивості металу, в останні роки спостерігається тенденція щодо створення протиракових і антибактеріальних засобів [57 – 73, 106, 121, 217]. Такі терапевтичні засоби дозволяють значною мірою впливати на морфологію ракових клітин і пригнічувати їх фізіологічну активність [57 – 73, 121]. У цьому відношенні спостерігається синергічний ефект дії протиракового препарату і металу.

Механізм лікувальної дії ауротерапії до теперішнього часу остаточно не з'ясований. Так, на експериментальних моделях та за клінічних умов доведено [71, 284, 285], що механізми дії препаратів Ауруму полягають у спроможності сполуками металу гальмувати функціональну здатність макрофагів, зупиняючи розвиток подальших імунних реакцій у процесі взаємодії антиген-презентуючих клітин (макрофагів) і лімфоцитів.

У експериментах на щурах визначено, що солі Ауруму сприяють подоланню запального процесу та уповільненню фагоцитозу, а також ефектам щодо периферійного моноцитозу крові та інвазії макрофагу до запальної ділянки, що підтверджується здатністю металу інгібувати міграцію макрофага у відповідь на відомі хемотаксичні фактори [286].

Препарати Ауруму інгібують різні ферменти, зокрема лізосомальні ензими. Так, відомо, що Аурум накопичується у лізосомах, і його солі модулюють деякі макрофагальні функції імунної системи [287].

У роботі G.R. Burmester і H.R. Barthel [288] доведено, що Аурум чинить терапевтичну дію також за рахунок впливу на імунну систему: змінює утворення антигенів та зменшує виділення цитокінів макрофагів, а також зменшує адгезію молекул, синтез антитіл та інгібує протеолітичні ферменти.

На сьогодні потребує наукового розв'язання питання щодо ролі Ауруму як життєво необхідного мікроелементу. Біологічна активність даного металу залежить від його розміру та концентрації, від корисних фізіологічних ефектів як мікроелементу, або фармакологічних – у терапевтичних дозах до токсичних – у великих дозах відповідно [63, 290].

Досягнення новітніх напрямків досліджень, пов'язаних з використанням NPMe, набувають розвитку в традиційній медицині при діагностиці та терапії захворювань [55 – 69, 95, 121]. Медико-біологічне застосування наночастинок Ауруму (NPAu) було розпочато Faulk і Taylor [55, 57] у 1971 р., які застосували їх для фарбування у імунологічній реакції. З того часу маркування молекул NPAu, особливо протеїнів, призвело до революції у візуалізації компонентів клітин та тканин методом електронної мікроскопії [290].

На сьогодні NPAu класифікують за формою та розміром: сферичні або колоїдні частинки (золі) [130, 219], паличкоподібні [291, 292], каркасоподібні [293], шестикутні тощо [294]. Завдяки своїм унікальним фізичним властивостям інтенсивно досліджуються комбіновані NPAu, в яких Аурум використовують для синтезу ядра [55, 57] або для покриття поверхні інших наночастинок – оболонкові структури [17, 295].

Сучасні технології дозволяють отримувати NPAu розміру від 1,0–2,0 нм (використовуються у якості рентгено-контрастних агентів) до оболонкових структур розміру 50–250 нм [107].

Усі відомі на сьогоднішній день методи синтезу NPAu можна умовно поділити на дві групи: дисперсійні та конденсаційні (колоїдні) [130]. Дисперсійні методи отримання NPAu засновані на руйнуванні кристалічної решітки металевого Ауруму під дією постійного електричного струму високої напруги, але за розміром такі наночастинки є неоднорідними. Тому ці методи постійно удосконалюються [130, 296].

Більш поширеними, порівняно з дисперсійними, є конденсаційні методи. Їх розділяють на фізичні та хімічні [130, 296, 297].

Найчастіше NPAu отримують відновленням галогенідів Ауруму із використанням хімічних відновлювачів або УЗ-, УФ-випромінювання, імпульсного та лазерного радіолізу. Методи хімічної конденсації дозволяють отримувати достатньо стійкі до агрегації NPAu [130, 296, 297].

Найбільш широке застосування у біології та медицині знаходять на даний момент сферичні NPAu у розмірному діапазоні 2–100 нм, найпоширенішим методом отримання яких є хімічне відновлення водного розчину галогеніду Au цитратом натрію за методом, запропонованим Turkevich та Frens [55].

Унікальні фізико-хімічні властивості, такі як інертність, стабільність, біосумісність, низький рівень цитотоксичності та інше, обумовлюють значний медико-біологічний потенціал цього типу наночастинок і визначають перспективність їх використання як векторів для цільової доставки протипухлинних, протизапальних та протимікробних засобів, для створення біосенсорів детектування токсинів, а також як контрастних агентів [55 – 69].

У більшості випадків форма колоїдного Ауруму – золь (суспензія або дисперсія у рідкій фазі), завдяки інертності та високій електронній щільності, який застосовують у мікроскопічних дослідженнях, що дозволяє візуалізувати саме кон'югати у біологічних середовищах (зразках тканин, клітин, їх органел тощо) [36, 134, 149, 290]. Перевага дослідників віддається

ультра колоїдним системам, де Аурум дисперговано у вигляді наночастинок розміром до 30 нм.

Оптичні властивості, міцність, висока площа поверхні NPAu дозволяють їх використовувати з діагностичною метою як рентгенконтрастуючу та флуоресціюючу мітки [59, 60, 121].

Приєднання олігонуклеотидних послідовностей, комплементарних молекулі ДНК-мішені, до поверхні NPAu з метою колориметричної детекції ДНК є відносно новим діагностичним засобом, який представляє альтернативу флуоресцентним і радіоімунним методам. Описані наносенсиори на основі NPAu також застосовують для детекції мікобактерій туберкульозу в біологічних середовищах [95] і визначення ДНК онкогену p53 [152].

Наночастинки Ауруму застосовують для посилення сигналу при проведенні ІФА за рахунок їх зв'язування з антитілами. Tanaka R. et al. [114] застосовували NPMe для підвищення чутливості імунохроматографічних діагностичних смужок.

У майбутньому очікується подальше вдосконалення діагностичних підходів, у основі яких є використання NPAu з високою біокаталітичною активністю. Зокрема, приділяється увага великому потенціалу методів функціоналізації поверхні таких наночастинок органічними речовинами та збільшення чутливості із «профілізацією» їх діагностичних можливостей [64].

Окремі NPAu або у вигляді кон'югатів з органічними молекулами мають величезний потенціал застосування в наноімунології і нанобіотехнології [299, 300], у тому числі онкологічної нанобіотехнології самостійно [69, 300].

Доведено [134] залежність розміру NPAu на властивість кон'югувати речовини органічної природи та визначено, що лімітуючою стадією процесу є закріплення білка на поверхні (адсорбція) – процес насичення. Імунореактивність подібних кон'югатів максимальна при певному співвідношенні білок:NP та визначається розміром NPAu. Так, NPAu

розміром 20 нм використовували в імунологічних дослідженнях для маркування специфічних антигенних детермінант або рецепторів ліганда [129].

Опосередкована поліетиленіміном та його додецил-похідними кон'югація плазмідної ДНК з NPAu значно підвищує ефективність трансфекції, тобто може бути застосована як вектори цільової доставки генів, що відкриває широкі можливості для генної терапії [95, 131, 317]. Також описані результати застосування кон'югатів колоїдного Ауруму та ДНК-вакцини з метою генетичної імунізації [130, 132].

Кон'югати NPAu з макромолекулами типу антиген транспортуються до місць, де ці макромолекули проявляють свою активність, зберігаючи склад прикріплених до нього молекул, а Аурум презентує імунним клітинам макромолекулу в нативному вигляді [303].

Біохімічні механізми дії NPAu на прикладі комплексу з хітозаном полягають у антиоксидантному ефекті, посиленні протективних ефектів антиокислювачів у дезактивації ВР та активації переносу електронів у окисно-відновних реакціях [304]. Встановлено, що NPAu розміром 15 нм інактивують нітроксильні ВР шляхом окиснення до карбоксильних похідних [305]. Такі системи у вихідному стані є практично нетоксичними, більш того, вони певним чином стимулюють імунну систему організму.

Препарати Ауруму дуже перспективні як протипухлинні агенти [67 – 73, 106]. За умов *in vivo* NPAu розміру 30 нм успішно застосовуються для доставки фактору некрозу пухлин (TNF- α) до карциноми товстої кишки. При цьому виявляється значне зниження рівня загального токсичного впливу комплексу TNF- α , кон'югованого з NPAu, на організм тварин, порівняно з вільним препаратом TNF- α [306].

Встановлено, що серед протизапальних препаратів ауротіомалат та ауранофін проявляють антибактеріальну та антимікотичну дію [217, 307], значну бактерицидну дію щодо *Helicobacter Pylori* та *Candida Utilis* [214].

Щодо токсичності NPAu – існують суперечливі дані. Так, в роботі [308] з визначення токсичності NPAu у діапазоні концентрацій 0,38–3,00 мкМ по відношенню до двох видів еукаріотичних та одного виду прокаріотичних клітин зазначається виражена цитотоксичність катіонних NPMe , однак в інших роботах [267, 309 – 311] навпаки, повідомляється про відсутність їх токсичного впливу.

1.3.4 Наночастинки Феруму. Ферум (Fe) – невід’ємний елемент живого організму, який входить до складу багатьох залізовмісних білків і ферментів, таких як цитохром, пероксидаза, оксидаза, каталаза, гемоглобін, міоглобін тощо [142, 242, 312]. Чим більше макроскопічний Fe подрібнений, тим більшою стає площа його поверхні і тим більше він схильний до окиснення з утворенням оксидів (NPOFe), які виступають у ролі наночастинок Феруму (NPFe) [38, 313 – 315].

Наночастинки Феруму, як і наночастинки оксиду феруму (NPOFe), належать до магнітних наночастинок, але при розробці біомедичних застосувань завдяки здатності до біодеградації вони викликають більший інтерес порівняно з іншими магнітними NPMe , наприклад, такими як наночастинки Кобальту (NPCo) та ін. [315 – 317].

У структурному складі багатьох макроорганізмів містяться NPOFe [318, 319], а у деяких бактерій вони є продуктами синтезу [318, 320].

Наночастинкам Феруму притаманні такі властивості: контрастне посилення при магнітно-резонансній томографії, магнітно-рідинна гіпертермія, адресна доставка лікарських засобів, клітинна сепарація, відновлення тканин, детоксикація біологічних рідин тощо [34, 322, 323], які відрізняють мікродисперсну форму металу від його макроскопічної.

По-перше, NPFe мають підвищену каталітичну реактивність, яка залежить від кількості атомів металу в кластері [52, 314]. По-друге, як NPFe , так і NPOFe , розміру 10–14 нм притаманні суперпарамагнітні властивості. Ферум за фізичною природою належить до феромагнетиків, які завдяки внутрішнім взаємодіям можуть набувати певної впорядкованої просторової

організації та внаслідок цього проявляють спонтанну намагніченість. Оксиди Феруму магнетит і магнеміт належать до феримагнетиків та не відрізняються за магнітними властивостями від феромагнетиків [100, 315, 324].

Магнітні властивості NPFe і NPOFe розміром меншим за 10 нм дозволяють використовувати їх як контрастуючі речовини (КР) для МРТ [34, 100, 325, 326].

Покриття на поверхні NPFe і NPOFe забезпечують стабільність і розчинність, зменшують токсичність, імуногенність та їх фагоцитоз, а також приєднання лігандів, лікарських засобів, захоплення клітинами-мішенями [34, 327]. Покриття NPOFe відіграють значну роль у перешкоджанні захопленню наночастинок фагоцитами ретикуло-ендотеліальної системи.

Час захоплення та напіввиведення NPMe із плазми крові залежить від їх поверхневої функціоналізації і гідрофільності, а також їх розмірів та варіює від кількох хвилин [328] до годин [329]. Різні білки, наприклад, антитіла, зв'язуються з поверхнями антигенів, прискорюючи їх захоплення. Так, для уникнення опсонізації, як біосумісне покриття, застосовують декстран – полісахаридний полімер [140, 330, 331].

Покриття впливає на токсикологічні властивості засобів із вмістом NPFe і NPOFe. Так, NPMe з полімерним покриттям в основному справляють несуттєвий вплив на життєздатність і функції клітин [332]. Іншими авторами доведено [333], що покриті декстраном NPOFe не впливають на життєдіяльність клітин, тоді як гепарином – виявляють токсичні ефекти. Властивість NPOFe, покритих декстрином, захоплюватись клітинами-мішенями, н., злоякісними клітинами, призводить до посилення нагромадження наночастинок у клітинах HeLa [333].

Фізичні, біологічні, відповідно й фармакологічні властивості NPFe і NPOFe залежать від їх розміру: частинки більшого розміру краще захоплюються макрофагами [334 – 336], проте менші, як правило, довше циркулюють у кровоносному руслі, добре проникають через капілярну стінку [337, 338]. Наночастинки металу та його оксидів за розміром розподіляють на

три типи: надмалі суперпарамагнітні NPOFe розміру 10–50 нм, малі або стандартні суперпарамагнітні NPOFe – 60–150 нм, пероральні (великі) частинки NPOFe – від 300 нм до 3,5 мкм відповідно [34, 326].

У теперішній час більшість терапевтичних засобів із вмістом NPOFe знайшло застосування в якості КР при МРТ і в гематології для лікування залізодефіцитної анемії. Так, у якості КР для діагностики уражень печінки і селезінки застосовують такі засоби, як Ferumoxides або АМІ-25, які складаються із кристалів магнетиту розміру 4,3 – 4,8 нм та мають гранично допустимі рівні (ГДР) у межах 120–180 нм [328, 332], і Ferucarbotran або SHU555A із ГДР ~62 нм [339, 340]. До препаратів на основі NPOFe належать Ferumoxtran-10 та АМІ-227 із ГДР до 50 нм [341 – 343], SHU555C із ГДР 21 нм та Feruglose або NC100150 із ГДР у межах 15–20 нм [344].

До пероральних КР на основі NPOFe, які використовують при МРТ шлунково-кишкового тракту (ШКТ), належать Ferumoxsil або АМІ-121 і Ferristene [326].

У порівнянні з іншими NPMe фармакологічні ефекти більш широко вивчені за умов застосування лікарських засобів із вмістом NPFe [71, 329, 338, 343, 345, 346] та їх значна перевага у здатності до біодеградації [317, 328].

Фармакодинаміка NPOFe зумовлена магнітними властивостями, підвищеною реакційною здатністю та наявністю у їх складі саме Fe. Ефект перетворення енергії на тепло активно застосовують також при лікуванні злоякісних пухлин методом «магнітного таргетингу» [100 – 102, 347 – 349]. За подібним механізмом будується гіпертермічне лікування новоутворень із застосуванням наноскорин Ауруму [295].

Фізико-хімічні властивості NPOFe свідчать про потенційні можливості їх застосування при детоксикації біологічних рідин, у антимікробній терапії, тканинній регенерації, тощо [347], але їх якісно нові властивості зумовлюють значну біодеградацію Феруму з вивільненням його іонів. Отже, біологічна

активність або токсична дія цих наночастинок залежить від їх розміру та фізико-хімічного стану, що потребує подальшого вивчення.

1.4 Біохімічні механізми впливу наночастинок металів на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів

1.4.1 Структурно-метаболична теорія виникнення стресу в клітин прокаріотичних організмів. Як відомо, навколишнє середовище впливає на живі організми опосередковано, через подразники: нормальні та надзвичайні – екстремальні [28, 59, 350]. Нормальні або фізіологічні подразники – така дія середовища, до якої організм пристосовується в ході свого філогенетичного розвитку. Такі подразники можуть змінюватися, набуваючи характер екстремальних, викликаючи в організмі надзвичайне напруження адаптаційних механізмів, тобто розвиваються ознаки стресу. Поняття «надзвичайного подразника» (стресору) є відносним, а один і той самий подразник може бути надзвичайним для одних організмів і звичайним – фізіологічним для інших, що визначається потужністю (дозою) дії, генетичною детермінованістю та фенотипічними особливостями організму, на який діє стрес-фактор.

Поняття «стрес» виявляє загальний комплекс неспецифічних компенсаторно-адаптаційних процесів, що за думкою Г.Г. Сельє розвиваються в організмі у відповідь на дію надзвичайних подразників – стресорів [350].

У мікробіології під поняттям «стрес» вважають зміну параметрів культивування, які викликають відповідні реакції з боку мікроорганізму [351, 352]. В останні роки зростає кількість публікацій, у яких наведено результати вивчення реакцій мікроорганізмів під дією різних стресорних факторів [353, 354]. Однак більшу частину досліджень присвячено вивченню лімітуючої дії різних факторів споживання на рівень бактеріального синтезу цільових продуктів.

Накопичені дані і стосовно подразників іншої природи, дія яких індукує розвиток стресу в бактеріальних клітин, серед них дослідниками найчастіше використовуються як критичні подразники фізичні або біотехнологічні, фізико-хімічні та біологічні.

Як правило, популяції мікроорганізмів складаються із мікробних клітин, які діляться асинхронно, тобто знаходяться на різних етапах або стадіях розвитку. З метою вивчення ефектів, які відбуваються при розвитку мікроорганізмів, важливо мати таку їх популяцію, яка синхронно розмножується [355].

За умов періодичного культивування в різних фазах росту на мікроорганізми можуть діяти різні види стресорів. Так, у період лаг-фази (початкова стадія адаптації з уповільненою швидкістю приросту біомаси клітин) мікроорганізми знаходяться під впливом дії метаболічного стресору в результаті їх пересіву із виснаженого середовища до збагаченого (поживного).

У експоненційній фазі (стадія геометричного приросту чисельності популяції клітин), за відсутності ліміту або інгібіції приросту біомаси [352], мікроорганізми не піддаються стресорній дії, знаходячись у фізіологічно активному стані.

У фазі гальмування швидкості приросту біомаси мікроорганізмів (зниження чисельності популяції клітин) через зниження відсотка насичення середовища O_2 , дефіцит поживних речовин, зміни рН відбувається виснаження живильного середовища, накопичуються метаболіти, клітини знову знаходяться під впливом стресорів, таких як нестача субстрату, надлишок продуктів метаболізму, лімітуючих зміни фізико-хімічних факторів рН, pO_2 , pCO_2 , тощо.

У період максимальної стаціонарної фази розвитку популяції мікроорганізмів (фаза рівноваги між розмноженням та гибеллю клітин), коли ріст зупиняється, дія згаданих вище видів стресорів на клітини посилюється.

У фазі відмирання відбувається загибель клітин мікроорганізмів.

У мікроорганізмів розрізняють дві основні фази розвитку періодичної культури: фазу росту – тропофазу і фазу спеціалізації клітин – ідіофазу. Протягом останньої фази розвиваються характерні для даного виду хімічні і морфологічні особливості, у тому числі і вторинний обмін. Метаболізм тропофазних клітин мікроорганізмів добре збалансований і забезпечує максимальну швидкість синтезу метаболітів, необхідних для розмноження. Динаміка утворення вмісту будь-якого вторинного метаболіту в клітинах мікроорганізму залежить не лише від концентрації додатково внесеного до середовища культивування стресору, але і від характеристик метаболічної активності системи на момент впливу [355].

Актуальність дослідження відповідних реакцій на дію екзо- і ендогенних факторів зумовлена тим, що без знань цих механізмів неможливі дослідження таких фундаментальних явищ, як онтогенез, розвиток патології та інші.

На думку І.Л. Работной [352], стрес виражається, насамперед, у гальмуванні розвитку популяції, а синтез полімерів клітинної стінки при цьому навіть посилюється. На сьогодні вже проведені дослідження щодо вивчення ліпідного складу мембран, синтезу протективних для мікроорганізму сполук (вуглеводів, амінокислот тощо), сполук, що пригнічують швидкість розмноження та інших спеціальних білків [356]. Автори [357] звертають увагу на те, що дія несприятливих факторів на мікробну клітину веде до синтезу більшої кількості перелічених вище сполук.

Накопичено дані про біохімічну адаптацію грибів до температурного стресу та про синтез у них стресорних білків під дією несприятливих факторів [356, 358]. Так, у період переходу від експоненціальної до стаціонарної фази росту клітин (7-ма доба росту) при внесенні 0,3 % етанолу до середовища реєструється незначний ефект щодо накопичення ергостерину та змін інтенсивності дихання клітин культури *S. cerevisiae*. Однак на 10-ту добу, коли культура знаходиться в стаціонарній фазі росту, внесення етанолу

не впливало на накопичення стеринів клітиною. Таким чином, можна говорити про те, що на ранніх етапах синтезу доступність біосистем для ефективного регуляторного впливу з боку екзогенних факторів є значно вищою, ніж на більш пізніх етапах росту культури (у стаціонарній фазі).

Ріст на середовищах різного складу може приводити до змін у вторинному метаболізмі і, як наслідок, може виявлятися в різній стійкості культур до стресорних впливів. При порівнянні стійкості культур, що вирости на середовищах з вмістом пивного сусла 25–100 % відповідно і 1% глюкозою, до теплового й осмотичного шоку було виявлено тенденцію до підвищення загибелі клітин *S. cerevisiae*, що росли на 75 і 100% пивному суслі [358].

У сучасній літературі визначено властивість ентеропатогенних бактерій адаптуватися та виживати за умов дії кислотного стресору, що вважається основою їхньої патогенності, у боротьбі з такими агресорами бактеріям властиві як конститутивні, так і індуковані механізми захисту [350].

У прикладному аспекті, з точки зору одержання сировини для виготовлення вакцинних та діагностичних препаратів, також є важливим врахування дії стрес-факторів на рівень метаболізму популяції мікроорганізмів.

Частіше для одержання бактеріальних антигенів застосовують метод періодичного культивування й одержання цільового продукту (біомаси бактерій і продуктів їхньої життєдіяльності) при досягненні певної фази розвитку популяції [359]. Після завершення фази експоненціального росту популяція мікроорганізмів починає відчувати недостатню кількість поживних речовин і зазнає пригнічення продуктами метаболізму, що веде до порушення фізіологічного стану клітин.

Переконливо показано, що здатність до виживання бактерій, раніше віднесених до групи так званих умовно-патогенних, у різних екологічних нішах (тканинах) організму хазяїна корелює з наявністю у них маркерів персистенції, а саме – антилізоцимної, рибонуклеазної та антикомплементарної активності,

здатності до інактивації бактерицидного компонента інтерферону, антибіотикорезистентності [360].

Здатність мікроорганізму виживати в макрофагах є потенційним засобом захисту від хазяїна [361 – 363]. Так, коли *S. typhimurium* проникають у макрофаг, вони потрапляють до спеціальних фаголізосом [364] та піддаються впливу оксидативного стресору [365].

Один із механізмів внутрішньоклітинного виживання є відсутність розмноження, тому такі клітини можуть бути стійкими до різних стресорів середовища. Але бактеріальні клітини, що ростуть *in vitro* більш швидко, є більш вірулентними, ніж ті, що ростуть повільно [366]. Під час пригнічення розмноження сальмонел факторами захисту організму хазяїна у фаголізосомі, індукується механізм підвищення рівня виживання бактерій шляхом експресії білків, які активують швидкість їх росту [367, 368].

Отже, однією з центральних проблем сучасної біохімії і біотехнології є дослідження молекулярних механізмів адаптації, які спрямовані на перебудову системи метаболізму в популяціях мікроорганізмів відповідно до вимог несприятливих факторів середовища, що призводять до стану стресу [380 – 383]. Культури в такому стані характеризуються змінами енергетичного та конструктивного метаболізму, метаболічних коефіцієнтів, а також синтезом речовин, що виконують роль протекторів [350, 354].

Оксидативний стрес. Вивчення ефективності регуляторної дії однакових факторів під час їхнього впливу на різні етапи онтогенезу є загально біологічною задачею. Оскільки, усі процеси регулюються в живій клітині станом її мембран, будь-який стресорний фактор буде впливати на перебіг репараційних процесів генетичних структур [369]. У геномі клітини виникають так звані «приховані ураження», які в постстресорний період можуть або зникнути (репарувати), або трансформуватися у видимі ураження. Доля «прихованих уражень» залежить від напруги O_2 , активності репаруючих ферментних систем, притоку метаболітів та макроергів, тощо.

Аеробні та факультативно-аеробні бактерії використовують молекулярний O_2 як кінцевий акцептор електронів. Внаслідок переходу електронів від кисню до води утворюється супероксид аніон (O_2^-) та перекис водню (H_2O_2) [370].

Оксидативні порушення ДНК, РНК, білків та клітинних мембран мають місце в таких випадках, коли концентрація АМК перевищує здатність клітин їх еліминувати. Аеробним прокариотам і еукаріотам властиво підключати набір захисних систем, що знижують ушкоджуючий ефект АМК [371]. АМК утягується в оксидативні клітинні порушення у фізіологічних і патологічних процесах, наприклад, при старінні та апоптозі тощо.

Тобто, мікроорганізми є моделлю для вивчення взаємовідносин між клітиною і АМК як стресорів середовищ. Так, відомі летальні рівні АМК як стресорів середовищ можуть індукувати у *S.typhimurium* синтез продуктів деяких генів, а саме бактерії витримують низкі концентрації H_2O_2 (60 мкМ), та при цьому індукується синтез білків, які дозволяють виживати за умов високих концентрацій H_2O_2 (15 мМ) [372].

Адаптивна резистентність до оксидативного стресору *S.typhimurium* і *E.coli* складається з двох регулонів – один для H_2O_2 , інший – для O_2^- , кожен з яких, індукований відповідно до сублетальних доз оксидативного агенту, забезпечує синтез від 30 до 40 білків, частка з яких – загальна для обох регулонів. Функції індукованого білка ОхуR – це транскрипційний активатор генів ферментів: каталази, глутатіон-редуктази і NADpH-залежної алкіл-гідропероксидази. *S.typhimurium* і *E.coli* мають 2 ізомери каталази: KatE і KatG, які перетворюють H_2O_2 до O_2 і H_2O [373]. Вважають, що глутатіон-редуктаза захищає від оксидативного стресору еукаріоти, грамнегативні та грампозитивні бактерії шляхом підтримання пулу відновленого глутатіону, який в свою чергу утримує в редукованому стані клітинні білки [373].

Відомо, що H_2O_2 у присутності Fe сприяє зростанню утворення активного гідроксил радикалу ($OH\cdot$) в клітинах *E.coli* [372]. Як сенсор

внутрішньоклітинного Fe Fug-білок приймає участь у підтримці балансу між концентрацією металу, супероксиду та утворенням H_2O_2 .

Фаза експоненційного росту *E.coli* за аеробних умов пов'язана з ризиком виникнення ендogenous оксидативного стресу в зв'язку з можливим 10-кратним зростанням швидкості утворення H_2O_2 . Визначено регуляцію внутрішньоклітинної концентрації H_2O_2 в *E.coli* [374].

Отримані дані щодо дії оксидативних агентів на ріст та індукцію стресорних білків у *E.coli* K-12 [375]. Клітини *E.coli* в експоненційній фазі росту були більш стійкими до високих концентрацій оксидативних агентів, ніж такі в лаг-фазі, тобто їх дія залежить від фази росту, при якій було індуковано стрес.

Для виживання в макрофагах у патогенних мікобактерій спрацьовують механізми захисту від стресорної дії токсичного O_2 [376]. ОхуR-білок грамнегативних бактерій – необхідний компонент відповіді на оксидативний стресор, одночасно являється сенсором АМК і транскрипційним активатором, що змінює активність детоксикаційних ферментів, таких як каталаза, гідропероксидаза і алкіл-гідропероксидаза.

Авторами [369, 377] зроблено припущення, що природа модифікацій, які визначають тимчасове прискорення росту мікобактерій під впливом стимулюючих доз іонізуючої радіації, пов'язана з функціональними зрушеннями у мікробній клітині, зокрема, на рівні клітинних мембран та їх ліпідних компонентів, які впливають на здатність мікобактерій до росту. Встановлено, що кожному виду мікобактерій властивий характерний для нього рівень антиокиснювальної активності (АОА), яка забезпечується ферментними системами супероксиддисмутази (СОД) та каталази.

За умов опромінення γ -випромінюванням у дозах 0,00645–0,0645 Кл/кг (25–250 Р) рівень активності СОД вірогідно зменшується в ліпідних фракціях *M. bovis* та *M. fortuitum* відповідно, а каталазної активності – лише в *M. scrofulaceum*, але при цьому значно перевищує цей показник в інших видів мікобактерій.

Рівень АОА та вміст гідроперекисів ліпідів після γ -опромінення вірогідно підвищується в *M. bovis*, але у *M. scrofulaceum* та *M. fortuitum* – знижується.

Результати досліджень процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у ліпідних фракціях опромінених мікобактерій корелюють із результатами бактеріологічних досліджень. У *M. bovis* спостерігається вірогідне прискорення росту, у *M. scrofulaceum* та *M. fortuitum* – прискорення росту виражено менш суттєво, проте *M. scrofulaceum* є найбільш стійкими до радіаційного впливу [377].

Доведено, що різні анаероби мають різну чутливість до O_2 – від високої чутливості до високої толерантності (життєдіяльність клітин у присутності O_2 протягом тривалого часу). Відсутність механізму захисту від АМК у багатьох анаеробних бактерій пояснює їх чутливість до O_2 . Але для деяких анаеробних бактерій, наприклад, *B. fragilis*, присутність СОД і каталази відіграє роль у детоксикації АМК [370, 378].

Відомо, що додаткове внесення O_2 протягом стаціонарної фази росту культури дріжджів призводило до ряду змін у метаболізмі, в тому числі й до збільшення накопичення вторинних продуктів обміну – стеринів [356]. При додаванні у середовище культивування *S. cerevisiae* $CaCl_2$ у концентрації 0,5 мг/мл вміст ергостерину зростає і перевищує контроль, при цьому вміст продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду (МДА) та кількість загиблих клітин залишалися на контрольному рівні, в концентрації 1,0 мг/мл – вміст ергостерину та інтенсивність дихання клітин дріжджів знижувались, а кількість загиблих клітин зростала відносно контролю на фоні відсутності утворення продуктів ПОЛ [356].

Отже, дані, які наведені в літературі, свідчать про вплив на бактерії одного із видів дії середовища – оксидативних стресорів, та наявність ефективних механізмів захисту мікроорганізмів від оксидативних порушень на рівні геному, що включають синтез додаткових білків – антиоксидантних ензимів.

Біотехнологічний стрес. На сьогодні недостатньо експериментальних досліджень щодо вивчення механізмів розвитку стресу в мікроорганізмів промислово значущих штамів, або вони розрізнені та поодинокі. За умов тривалого зберігання у ліофілізованому стані як при підтриманні колекційних зразків таких культур у депозитаріях, так і у процесах промислового виробництва імунобіологічних засобів на синтетичних поживних середовищах у біореакторах, клітини мікроорганізмів зазнають структурно-функціональних змін.

Ліофілізація відноситься до одного з найбільш ефективних методів довготривалого збереження клітин бактерій. Згідно з ISO 13408–3 [379], ефективність ліофілізації/регідратації значною мірою залежить не тільки від умов проведення процесу. Однак, екстремальний вплив багатьох негативних факторів, якого зазнає клітина у процесі ліофілізації, у більшості випадків призводить до запуску фізико-хімічних процесів, які мають спільні риси із процесами старіння та можуть виявитися летальними для клітини [380, 381].

Важливу роль при цьому відіграє вихідний стан структурних компонентів мембран, а також функціональний статус клітини в цілому. Відомо, що цитоплазматична мембрана ушкоджується у першу чергу, так як вона є однією з основних мішеней екстремальної дії [171, 382]. За умов втрати вільної та частини зв'язаної води біомембрана зазнає ушкоджень, від яких змінюються її основні функції – бар'єрна, транспортна та енергогенеруюча [383 – 386].

Бекером М.Е. та спів. [383, 387] запропоновано модель дільниці дегідратованої мембрани, в якій у результаті послаблення гідрофобної дії змінюється орієнтація молекул фосфоліпідів на фоні виключення окремих молекул мембранних білків із єдиної системи, що призводить до функціональних зрушень активності цих білків.

Процес переходу до анабіозу характеризується зниженням інтенсивності біохімічних реакцій, при цьому знижується інтенсивність дихання клітини. Під час зневоднення мікроорганізми зазнають дії високих

температур, зміни осмотичного тиску, голодування, тобто метаболізм клітини перебудовується, у неї відбуваються адаптаційні процеси [383, 388]. Такі процеси потребують затрати енергії, яка за відсутності позаклітинних поживних речовин генерується за рахунок власних ресурсів. АТР-аза, наприклад, є одним із ключових ферментів енергетичного метаболізму бактеріальної клітини, завдяки якому відбувається формування різниці електрхімічних потенціалів на мембрані, тому вона може виступати ефективним індикатором загального фізіологічного стану клітин мікроорганізмів [220, 222, 223].

Зневоднення бактеріальних клітин під час ліофілізації до залишкової вологи 1–10 % у багатьох випадках призводить до ушкодження різноманітних структур та макромолекул клітин [383, 388 – 390]. Результатом локальних та тотальних незворотних ушкоджень на популяційному рівні є зниження чисельності життєздатних клітин у межах від 09 до 99 %, на клітинному – зміни їх структурних складових на поверхні клітини, в ядрі та в мембранах, а на молекулярному – зміни молекул біополімерів та їх функцій [391, 392].

У процесі відновлення бактеріальних клітин з ліофілізованого стану Харчук І.О. виділяє три стадії [388]: регідратацію, ліквідацію ушкоджень клітинних структур (реактивація) та відновлення на первинному рівні чисельності популяції шляхом розмноження тих клітин, що залишилися життєздатними.

Середній час регідратації, фізіологічного процесу насичення клітин водою, становить від декількох секунд (для добре диспергованих окремих висушених клітин) до декількох хвилин [390].

Вважають, що при дії низьких температур виникає кристалізація мембранних ліпідів і знижується ступінь їх гідратації, відновлення окиснювальних SH-груп не відбувається, в результаті не спостерігається й реактивація білків, а у мембранах утворюються канали [393].

Одним із характерних критеріїв ушкодження цитоплазматичної мембрани за дії будь-якого стрес-фактору є зміна її проникності та функціонально-структурний стан її компонентів – ліпідів і білків. Під час ліофілізації в клітинах мікроорганізмів виникає температурний стрес, у результаті дії протеолітичних ферментів розкладаються білки, таким чином змінюється швидкість ферментативних реакцій або зовсім зупиняється, через розривання водородних або сульфгідрильних зв'язків, що призводить до денатурації білка.

Не менш важливу роль як структурні елементи більшості клітинних мембран та джерело зберігання енергії виграють ліпіди, їм приділяють місце у процесі формування стійкості мембрани бактеріальних клітин до різних стресів, наприклад, ціанобактерій, механізм якого полягає у стабілізації подвійного фосfolіпідного шару трегалозою та участю ненасичених жирних кислот [394].

Ліпіди та білки як основні структурні елементи клітинних мембран через окиснення у першу чергу піддаються ураженню активними метаболітами O_2 , утвореними у стресованій клітині, які у великих концентраціях можуть модифікувати макромолекули та призводити до її деструктивних змін, а в низьких — властиво виконувати сигнальні функції [396]. Починається розвиток оксидативного стресу, у подальшому це призводить до порушення регуляції хімізму та проникності живої клітини, а також руйнування її мембрани, а в подальшому — до її загибелі. Важливим стартовим чинником запуску механізмів як окиснювання білків, так й ліпідів, є радикали O_2 та інші АМК, тому, навіть їх відносно невеликі кількості будуть впливати на експресію генів, репараційні, метаболічні та біосинтетичні процеси [286, 396 – 398].

Так, зміна вмісту ненасичених жирних кислот у мембрані впливає на ступінь текучості її ліпідних компонентів, отже, на інтенсивність процесів ПОЛ, у результаті чого вона в подальшому втрачає резистентність щодо низькотемпературної та іншої дії [380, 399 – 401].

Тобто, підтримання мембранної цілісності мікроорганізму є важливою відповіддю на дію будь-якого стрес-фактору, а за умов зневоднення (стресу ліофілізації), може бути адекватним і прогностичним механізмом резистентності клітин щодо температурного впливу [402, 403].

На наступному етапі за умов наявності ресурсів енергетичного та конструктивного обміну, а також комплексу оптимальних умов для кожного типу мікроорганізму, популяція переходить у лаг-фазу розвитку. За умов наявності тотального неушкодженого генетичного апарату може відбуватися біохімічне відновлення ферментів, структурних компонентів, а також репарація частково uszkodженого генетичного матеріалу – реактивація. Термін реактивації суттєво залежить від характеру та ступеню ушкоджень. На думку Корогодіна В.І. [404], під час реактивації можуть відбуватись наступні процеси: біосинтез нових молекул (в тому числі) замість ушкоджених; компенсація функцій ушкоджених структур резервними механізмами, руйнування та ізоляція частково ушкоджених структур, репарація ушкоджених структур.

Подібні процеси відбуваються при зневодненні – регідратації, що поряд із попереднім висушуванням призводить до обернених та незворотніх змін навіть всіх біополімерів, в ядрі та інших мембранних структурах [390].

Передусім, у регідратованих клітинах мікроорганізмів виникає низка складних біохімічних процесів, завдяки яким відбувається відновлення початкового фізіологічного стану особин популяції. Вищезазначене дозволяє розглядати процеси ПОЛ і ОМБ у мембранах бактеріальних клітин як відносно стабільні показники оксидативного стресу під час біотехнологічних регламентів та припустити визначальну як регуляторну, так й прогностичну роль АОС в захисті їх мембран [405, 406], що має величезне значення для дослідницької практики.

Вивчення таких явищ має бути комплексним та включати дослідження на клітинному рівні механізмів функціонально-структурних змін, відновлення (репарації) та реактивації перебудов і ушкоджень у клітинах, та

на популяційному – відношення окремих видів мікроорганізмів до факторів стресу, їх резистентність, що дозволить у майбутньому визначити збереження даного виду за екстремальних умов.

Таким чином, основним напрямком у технології одержання відновлених форм популяцій мікроорганізмів є оптимізація та модифікація умов їх культивування шляхом уведення речовин, які впливають на показники біологічної активності клітин на стадії їх промислового отримання та за тривалого зберігання. Отже, пошук речовин, які здатні приймати участь у спрямованому управлінні фізіолого-біохімічними реакціями за умов біотехнологічного стресу та які, скоріше за все, повинні мати нанорозмірні величини, з метою одержання цільових продуктів мікробного синтезу з заданими характеристиками, є актуальним завданням.

1.4.2 Метаболізм-залежні механізми взаємодії наночастинок металів з клітинами прокаріотичних організмів. Прокаріотичні клітини, завдяки унікальним структурним властивостям та обміну речовин, здатні активно контактувати з металами в іонному або дисперсійному стані, до яких, зокрема, відносяться і NPMe. Така взаємодія не завжди корисна для мікроорганізмів, але постійні зміни у навколишньому середовищі призводять до розвитку адаптаційних механізмів, у результаті яких можуть утворюватись нові генотипи, більш вчинені та резистентні щодо авітальних агентів середовища – стресорів.

Існує гіпотеза, згідно якої при визначенні молекулярних структур, які приймають участь в процесах селективної взаємодії інтактної бактеріальної клітини з металами (сорбції, гетерокоагуляції, а також адгезії частинок на поверхні клітини), виділяють основні механізми [210 – 213, 218 – 220]:

1. колоїдно-хімічний, що обумовлений утворенням подвійного електричного шару клітини і заряду на її поверхні та який встановлює взаємозв'язок між поверхневим зарядом клітини і відповідною величиною трансмембранного потенціалу і відрізняється величиною та знаком заряду наночастинок;

2. фізіолого-біохімічні механізми, що відповідають за накопичення ультрадисперсних колоїдних частинок під час взаємодії з біомембраною клітин, та енергозалежні процеси – функціонування дихального ланцюга (активність мембранної АТР-ази та дихальна активність клітини).

Перший механізм стосується пасивної локалізації металів бактеріальною клітиною та ґрунтується на фізико-хімічному зв'язуванні металів структурними компонентами клітинної мембрани. Інший – стосується метаболізм-залежної акумуляції металів, яка притаманна лише біологічним об'єктам, і пов'язана з функціонуванням ферментних систем, що забезпечують енергію та реакції обміну речовин клітини.

Обидва механізми взаємозв'язані. Механізми контактної взаємодії дисперсних форм металів з бактеріальними клітинами вивчені в основному на моделі колоїдних дисперсій Ауруму та Аргентуму. При дослідженні впливу NPMe на функціональний стан бактеріальних клітин доведено можливість контролювання та управління інтенсивністю їх фізіолого-біохімічних реакцій [186, 207, 209].

Встановлено, що важливими факторами, які відповідають за процес акумулювання прокаріотичною клітиною на поверхні NPAu розміром (10 – 20) нм, є генератори трансмембранного потенціалу фізіологічні (дихальний ланцюг) і метаболічні (енергозалежні реакції, які перебігають у клітині та визначаються функціонуванням мембранних АТР-аз) [218 – 223].

Так, доведено, що зі збільшенням часу контакту фізична (пасивна) адгезія NPAu на поверхні клітин, яка дозволяє здійснювати ресуспендування останніх у розчин, переходить у хімічну взаємодію за участі функціональних груп на поверхні клітинної мембрани, зокрема карбоксильних COOH^- та тіолових SH^- [208, 227, 230].

У клітинних оболонках мікроорганізмів виявили високополімерні структури глікопротеїнової природи з позитивно зарядженими аміногрупами NH_2^+ , які активно флокулювали ультрадисперсні NPAu [210 – 213, 221].

Про енергозалежність процесу акумулювання NPAu клітинами *Bacillus sp.* B4253 та *Bacillus sp.* B4851 [222, 223] свідчить можливість трансмембранного переносу NPMe і молекулярні механізми, відповідальні за цей процес. У цих клітинах була ідентифікована АТР-азна активність, що складається з двох компонентів: азид-чутливої (63 %) та азид-резистентної (37 %) і вказує на важливу роль мембранних ферментів у процесі взаємодії NPAu з клітиною.

Показано [187, 204, 206, 209, 407], що NPAu розміру 30 нм підвищують рівень активності H^+ -АТР-ази мембранних фракцій штамів-пробіонтів *E. coli* та *E. faecalis* та у концентрації 1,10 мкг/мл за металом стабілізують їх клітинну оболонку.

Згідно [204, 209], вплив NPAu розміру 15–20 нм на клітини *E. coli* штаму 1257 характеризується концентраційним оптимумом: у присутності NPAu у концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл у середовищі спостерігається стимуляція приросту біомаси в середньому на 15 % відносно контролю.

Отже, механічні сили взаємодії змінюють не тільки цитологічні, але і біохімічні властивості клітин, до яких вони прикладені. Так, показані ефективні розмірні та концентраційні діапазони NPMe, в яких спостерігається або виражена стимуляція усіх показників життєдіяльності клітини, або є наявним їх значне пригнічення [206, 209 – 211, 222].

Аргентум в низьких дозах також стимулює відновлювальні процеси у клітинах мікроорганізмів через нормалізацію енергетичного обміну [161, 166, 171, 194, 248 – 253, 256 – 259]. Тобто, особливої уваги можуть привертати позитивні зміни їх біологічної активності: підвищення антагоністичної активності та показників антибіотикорезистентності.

У інших роботах доводиться, що протизапальні препарати, які містять колоїдний Аурум, проявляють антибактеріальну та антимікотичну дію [214].

Ефективність бактерицидної дії NPAg розміру 25 нм пояснюється властивістю пригнічувати активність ферментів, за допомогою яких забезпечується кисневий обмін у мікроорганізмах [248, 251, 257].

Комплекс NPAg з імідазол циклофосфаном має таку ж протимікробну активність, як 0,5 % розчин срібла нітрату по відношенню до *S. aureus*, а також *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* та *S. cerevisiae*. Показник LD₅₀ цієї сполуки при внутрішньовенному введенні щурам складає 100 мг/кг маси тіла [410].

Механізм дії NPAg на бактеріальну клітину полягає в тому, що іони металу сорбуються клітинною оболонкою. Клітина залишається життєздатною, але при цьому порушуються її функції, наприклад, ділення (бактеріостатичний ефект); внаслідок проникнення сорбованих NPMe всередину інгібуються ферменти дихального ланцюга, роз'єднуються процеси окиснення і окиснювального фосфорилування, вона гине [247, 249, 250, 273].

Слід відзначити, що серед механізмів протимікробної дії NPAg на мікроорганізми найбільш визнаним є адсорбційна теорія, згідно якої клітина втрачає життєздатність у результаті взаємодії електростатичних сил, що виникають між клітинами бактерій, що мають негативний заряд, і позитивно зарядженими іонами металу при адсорбції [249, 250]. Крім того NPAg взаємодіють з пептидогліканами мембран мікроорганізмів, блокуючи їх властивість передавати O₂ у їх протоплазму, що сприяє протимікробній дії, та пояснюється тим, що оболонка прокариотів має іншу структуру, ніж еукариотів [264, 265].

Таким чином, дані літератури свідчать, що при взаємодії прокариотів з NPAu та NPAg суттєву роль відіграє структурно-функціональний стан клітин. Завдяки здатності стимулювати активність ферментів [204, 205, 207, 213, 221 – 223] та виявляти антиоксидантні властивості [206, 284, 304] NPMe є потенційно новим класом речовин, які можуть слугувати стимуляторами фізіолого-біохімічних показників клітин мікроорганізмів за розвитку біотехнологічного стресу, наприклад, при їх ліофілізації і довготривалому зберіганні.

1.5 Біохімічні механізми цитотоксичності наноматеріалів і наночастинок металів

У спеціальній літературі останніх років велика увага приділяється розгляду питань безпечності наноматеріалів і нанотехнологій у біотехнологіях та медицині [14, 28, 40, 80, 81, 312, 409].

Питання біобезпечності наноматеріалів неоднозначне, багатогранне та вимагає комплексного науково-обґрунтованого підходу, які повинна вивчати поки ще молода наука – нанотоксикологія. «Комплексний, безпечний і відповідальний підхід» – це основа політики ЄС у галузі нанотехнологій [410].

На сьогодні ґрунтовних знань про токсикодинаміку та токсикокінетику наночастинок у організмі та їх вплив на довкілля недостатньо. Для цього, перш за все, необхідно отримати інформацію щодо взаємозв'язків між токсичністю наночастинок та їх кількістю (доза, концентрація) і фізико-хімічними властивостями (розмір, форма, склад, реакційна здатність тощо) [411, 412], вивчати молекулярні механізми їх впливу на організм, орган, тканину, клітину та механізми розвитку віддалених токсичних ефектів, а також шляхів усунення чи послаблення їх небажаного впливу [167, 168].

Дослідження потенційних ризиків використання наноматеріалів може бути адекватним за використання ключових системних характеристик біологічних систем за умов *in vivo* та *in vitro* (фізіологічних, біохімічних, імунологічних, генетичних, цитологічних тощо), чутливих до токсичної дії.

1.5.1 Ефекти токсичної дії наночастинок в експериментах *in vivo*.

Завдяки маленькому розміру, наночастинки можуть проникати безпосередньо через шкіру, органи дихання, травлення, отвори клітинних мембран або через клітинні транспортні механізми і розподілятися по всьому організму [30, 148]. У теперішній час накопичено певний експериментальний матеріал щодо токсикологічної характеристики окремих NPMe за інгаляційного та перорального шляхів при потраплянні до макроорганізму, у

меншій мірі – за внутрішньом'язового, внутрішньовенного та підшкірного введення.

Під час вивчення несприятливих ефектів інгаляційного потрапляння деяких наночастинок до організму людини встановлено, що запальні ураження тканини легень зумовлені переважно прооксидантною і генотоксичною дією таких [30, 79, 108, 412 – 414].

Більшість дуже дрібних наночастинок (1 нм) за інгаляційної дії проникає через слизову або пароксально по нервовим волокнам до тканин, всмоктуються у кров і вже через 2–4 год виявляються в печінці, нирках, головному та кістковому мозку. Внаслідок трансцитозу через епітеліальні клітини дихальної системи та сенсорні нервові закінчення наночастинок проникають у кров і лімфу [30].

Показано, що полімерні композити наночастинок Флуора, які застосовують для доставки гормонів і бронхолітиків, вже через 2–6 год циркулюють у кровоносній системі, внутрішніх органах і кістках, особливо в зоні їх росту, внаслідок тропності елемента до остеобластів, в той же час відзначено їх вплив на систему гемостазу (розвиток коагулопатій і тромбозу) [30, 415].

Описані результати вивчення інгаляційної токсичності наночастинок Аргентуму, Феруму, Кадмію, Цинку, Титану, Ванадію, Купруму, Силіцію та ін. Так, на щурах визначено токсичність NPAg розміру 19,8–64,9 нм за інгаляційного введення впродовж 28 діб у концентраціях: $1,73 \cdot 10^4$, $1,27 \cdot 10^5$ і $1,32 \cdot 10^6$ частинок/мл [56]. Встановлено вірогідне зростання активності γ -глутамілтранспептидази (ГГТП), вмісту нейтрофілів, еозинофілів і гемоглобіну в крові самок та Кальцію і загального білка у сироватці крові щурів обох статей за концентрації $1,27 \cdot 10^5$ частинок/мл. При цьому реєстрували накопичення NPAg у легенях, печінці, нирках, їх проникнення в результаті аксонального транспорту до головного мозку. Доведено високу стабільність NPAg у навколишньому середовищі щодо зберігання токсичних властивостей впродовж декількох років [56].

Відомо, що нанокристали, які містять фосфоліпідні капсули CdSe/ZnS з діаметром 3,2 нм у вигляді аерозолу водного розчину, за інгаляційного шляху потрапляння здатні проникати через гемато-енцефалічний бар'єр до кори головного мозку [30].

За інгаляційної дії NPTiO₂ розміру 80–100 нм визначено їх розподіл у легенях, стимулювання утворення ВР, збільшення числа нейтрофілів і фагоцитів у бронхоальвеолярних змивах [416 – 418], що вказує на виражений прооксидантний ефект, запалення та призводить до фіброзу легень [419, 420].

Пероральне одноразове введення мишам NPTiO₂ розміру 25 і 80 нм у дозі 5000 мг/кг маси тіла характеризувалось більшою токсичністю: інтенсивним проникненням у легені, печінку, селезінку, нирки, вираженою гепато- і нефротоксичністю у порівнянні з більш великими за розміром наночастинками (155 нм) [30, 421, 422]. Так, визначено підвищення у сироватці крові тварин активності лактатдегідрогенази (ЛДГ-ази) та α -гідроксибутіратдегідрогенази (25 нм), а також збільшення печінки та некроз гепатоцитів (80 нм). NPTiO₂ мали тривалий період напіввиведення (понад 500 діб) як за умов інгаляційного, так й за перорального потрапляння, та практично не виводились через нирки.

Вивчення у порівняльному аспекті гострої легеневої токсичності, що індукована NPTiO₂ розміру 3 і 20 нм, виявило ранні біохімічні зрушення в бронхоальвеолярній рідині мишей [140]. Уже через 3 доби після інгаляційної дії визначено збільшення вмісту загального білка та активності лужної фосфатази (ЛФ) за високих концентрацій наночастинок (40 мг/кг маси тіла), а за низьких (4 мг/кг маси тіла) – лише зростання ЛФ, що вказує на менш виражене запалення та відсутність ознак цитолізу і гострої легеневої токсичності.

Також описані ефекти впливу NPCu розміру 50–60 нм за підшкірного введення у дозі 0,05 мг/кг маси тіла білим безпородним мишам протягом 3 діб [463]. Встановлено, що на фоні відсутності статистичних змін активності аланінамінотрансферази (АлАТ) відбувалось зростання рівня активності

інших ферментів, що мають внутрішньоклітинну локалізацію, – аспартатамінотрансферази (АсАТ) і креатинфосфокінази – відносно їх контрольних значень.

У інших роботах [423, 424] описані ефекти ембріотоксичного впливу NPCu при внутрішньом'язовому введенні у дозах 0,5, 1,0 і 2,0 мг/кг маси тіла на самок щурів під час вагітності. У сироватці крові щурів усіх дослідних груп реєстрували зниження рівня загального білка, білірубіну, тригліцеридів і холестерину та підвищення активності α -амілази відносно їх контрольних значень. При цьому вираженість змін показників була прямо пропорційною дозі введених NPCu, що вказує на дозозалежність токсичного впливу останніх.

Частинки модифікованих наноалмазів (МНА) викликають різноманітні токсичні ефекти, включаючи загибель тварин [24]. За умов тривалих експериментів пероральне введення гідрозолей МНА призводить до збільшення рівня лейкоцитів у крові мишей, вираженість якого також є дозозалежним, що пов'язують з імунною відповіддю через взаємодію МНА з макрофагами.

Встановлено, що токсичність NPMe при розрахуванні максимально біосумісної дози, LD₅₀ і LD₁₀₀ залежить від їх розміру та концентрації, але за механізмом розвитку відрізняється від такої для металів у макродисперсійній формі (солі металів).

Токсичними вважають нерозчинні у воді наночастинки розміром, меншим за 20 нм [3, 79, 107, 108, 425], оскільки здатні проникати в організм інгаляційним шляхом, *per os*, через пошкоджену шкіру, а також під час ін'єкцій ліків з наноносіями [87].

У формуванні негативних ефектів атмосферних наночастинок розміром, меншим за 2,5 нм, для серцево-судинної системи показана роль запальних реакцій, а також посилення згортання крові та розвиток коагулопатій [30, 426]. Наночастинки здатні до трансцитозу через епітеліальні та ендотеліальні клітини, розповсюджуються по ходу дендритів і

аксонів нервових клітин, циркулюють у кровоносних і лімфатичних судинах, мають тропність щодо певних тканин [30, 427, 428].

У поодиноких роботах доведено [429, 430], що NPAu розміром від 0,5 до 100 нм є нетоксичними, оскільки Аурум є інертним металом у біологічних системах. У більшості випадків препаративна форма колоїдного Ауруму – золь (суспензія або дисперсія у рідкій фазі), а перевага дослідників віддається ультраколоїдним системам у вигляді наночастинок металу до 30 нм.

Існують дані щодо розміро-залежного розподілу NPAu у багатьох органах і тканинах організму, таких як печінка, селезінка, нирки, серце, легені, тимус, статеві органи, м'які тканини та навіть мозок і скелет за умов внутрішньовенного, інтратрахеального або перорального введення [431].

Незважаючи на перспективність досліджень NPAu у біомедичних цілях, їх впровадження у практику пов'язане із низкою труднощів. У першу чергу постає проблема відтворюваності NPAu [432], необхідності підведення їх виробництва під вимоги GMP [433]. Одним із найменш вивчених питань є токсикологічний аспект впровадження NPAu до клінічної практики. Бракує досліджень *in vivo*, не встановлений остаточно механізм проникнення NPMe всередину клітини та їх кумуляції в організмі [434, 435].

На сьогодні більш ґрунтовно вивчено вплив на організмі тварин наночастинок найпоширенішого есенційного металу – Феруму.

Проведені дослідження внутрішньом'язового і перорального введення NPFe розміром 70 нм на самцях білих мишей і білих шурів у діапазоні доз 7,4–11,0–14,8 мг/кг та у дозі 5,0 мг/кг маси тіла відповідно [436]. За перорального введення встановлено вірогідне кровонаповнення та збільшення розмірів нирок і печінки у мишей та шурів; за внутрішньом'язового – зміни у легенях і селезінці, які також мали дозозалежний характер та призводили щодо порушення кровообігу і дистрофії клітин.

Одноразове (100 мг/кг маси тіла) введення щурам суспензії NPFe₃O₄ внутрішньовенно супроводжувалось дисциркуляторними розладами і

осередковими дистрофічними та некротичними змінами паренхіми печінки, селезінки, легенів, нирок і серця, а багаторазове (від 300 мг/кг до 2 г/кг маси тіла) – змінами енергетичного і пластичного метаболізму гепатоцитів, кардіоміоцитів і нефроцитів та активацією антиоксидантних систем плазми крові тварин [437].

У роботі [479] доведено, що за підшкірного введення мишам порошку NPF_e розміру 50–60 нм виявлено їх гепатотоксичну дію та ушкодження клітин міокарду, на що вказує гіперферментемія амінотрансфераз і креатинфосфокінази.

Під час визначення R. Weissleder та спів. [328] гострої токсичності препарату AMI-25 із вмістом NPF_e встановлено, що LD₅₀ перевищує дозу 3000 мкмоль Fe/кг. Підгострий і хронічний токсичні ефекти NPF_e проявлялися гемохроматозом, якщо загальна кількість металу в організмі перевищувала 15 г. Оскільки кількість металу у дозі препарату, який використовують для діагностичної візуалізації, є значно меншою у порівнянні із його вмістом у печінці в нормі, значного впливу на загальну концентрацію Fe у печінці не спостерігали [328].

NPOFe для лікування ЗДА та у якості КА для МРТ визначені низькотоксичними для людини за винятком передозування [328, 329].

М.-Т. Zhu та спів. [439] досліджували вплив на щурів NPOFe розміру 22 і 280 нм за інгаляційного введення у дозах 0,8 і 20,0 мг/кг маси тіла. Отримані результати вказують на розвиток запальних реакцій у легенях з індукцією АМК у клітинах, а також на порушення у згортальній системі крові.

У клінічній практиці побічні ефекти застосування NPOFe, як правило, визначені як незначні і короткочасні, наприклад, внаслідок перорального введення ферумоксitolу і КА AMI-121 реєстрували гіпотензію, периферичні набряки, короткочасну водянисту діарею, препарату на основі покритих декстраном NPOFe – головний біль, біль у спині, вазодилатацію і кропив'янку, які тривали впродовж однієї доби [341]. При цьому визначене у

сироватці крові підвищення рівня Fe очевидно мало транзиторний характер, що вказує на його абсорбцію.

Інгаляційна та пероральна дія NPCu при визначенні гострої токсичності виявила виражену залежність токсичного ефекту від розміру частинок [142, 218, 441 – 443]. Встановлено, що низькі концентрації NPCu потенціюють токсичність інших елементарних речовин за дії на клітини легень людини [443]. За пероральної дії NPCu зрушують кислотно-лужний баланс крові, що призводить до розвитку метаболічного алкалозу [441, 444], дегенеративних змін у печінці, мозкової тканини та у нирках (ознаки гломерулонефриту).

Існує також думка, що суттєвий вплив на цитотоксичність чинить водорозчинність наночастинок. Відзначено, що водорозчинні NPCu є токсичними [443], викликають генетичні та морфологічні зміни, характерні для хвороби Вільсона [442].

Інші автори стверджують, що не водорозчинні наночастинки (особливо менші за 25 нм) частіше є токсичними [445].

Але відомо, що токсичність NPCu в 2,5–6,0 разів менша за токсичність солей металу [28, 446]. Наночастинки та іончастинки Купруму в суспензії гідроксиполіметілцелюлози є більш токсичні, ніж мікрочастинки. Установлені параметри токсичності для щурів за перорального введення металу в різних формах: LD₅₀ для NPCu складає 413 мг/кг; для іончастинок Cu – 110 мг/кг; для мікрочастинок Cu – 5000 мг/кг маси тіла відповідно. Біохімічні зрушення у тварин, яким вводили NPCu K4M пероральним шляхом у дозі 1080 мг/кг маси тіла, характеризувались зростанням у крові рівня сечовини, креатиніну, загальних жовчних кислот і активності ЛФ, що свідчить про ниркову та печінкову дисфункції [78].

Показано, що наночастинки здатні проникати в клітину, минаючи будь-які бар'єри (зокрема гематоенцефалічний, плацентарний), та вибірково накопичуватись у різних типах клітин і клітинних структурах [30, 78, 108, 413, 425, 447]. Існує багато експериментальних робіт щодо проникнення мікро- і нанорозмірних частинок всередину клітин. З цим явищем пов'язують

цитотоксичний вплив наночастинок на різні лінії клітин і показане для клітин ендотелію, епітелію легень, шлункового епітелію, макрофагів, нервових та ряду інших клітин [107].

Отже, визначено, що окиснювальний стрес і запальні реакції лежать в основі цитотоксичної дії NP [235, 236, 286, 328, 447 – 450], призводить до розвитку гепато- та легеневої токсичності з ознаками цитолітичних (некротичних) реакцій, до їх накопичення у печінці, легенях, селезінці і нирках і носять дозозалежний характер [30, 76, 91, 451]. Абсорбція наночастинок на поверхні клітинних мембран, втручання в їх метаболізм і подальша деградація призводять до цитотоксичної дії, тому дослідження біохімічних механізмів цих процесів є необхідною умовою оцінювання біосумісності та потенційної небезпечності наночастинок [452 – 454].

1.5.2 Прооксидантні механізми цитотоксичної дії наночастинок в експериментах *in vitro* на моделі еукаріотичних і прокаріотичних клітин. Дослідженнями за умов *in vitro* показано, що при визначенні цитотоксичної дії наноматеріалів виявлені дозозалежні прооксидантні ефекти [56, 78, 235, 236, 286, 328, 443, 447, 455, 456].

При вивченні цитотоксичності NPOZn розміру 71 нм на культурі клітин бронхоальвеолярної карциноми людини встановлено зниження життєздатності клітин, що носить дозозалежний ефект за концентрації 10–14 мкг/мл впродовж 24 год [56]. Як індикатори формування оксидативного стресу і наявності цитолізу визначено збільшення рівня МДА і активності ЛДГ-ази, а при проведенні електрофорезу ізольованих клітин в гелі зареєстровано ушкодження ДНК. Аналогічні результати отримано авторами за експозиції NPSiO₂ розміру 15 і 46 нм на культурі клітин бронхоальвеолярної карциноми людини.

Культивування клітин печінки щурів лінії BRL 3A впродовж 24 год у присутності NPAg розміру 15 і 10 нм в концентрації 5–50 мкг/мл викликало зрушення функціонального стану мітохондрій [274, 456]; у присутності NPFe₃O₄ розміру 30 і 47 нм, NPA1 – 30 і 103 нм, NPMgO₃ – 30 і 150 нм і

NP TiO_2 – 40 нм у концентрації 10–50 мкг/мл не впливало на стан клітин, а в концентрації – 10–250 мкг/мл сприяло зниженню їх життєздатності та вивільненню ЛДГ-ази в культуральне середовище. NP Ag вивкликали індукцію генерації АМК, зниження вмісту відновленого глутатіону та мембранного потенціалу мітохондрій. Автори вважають, що цитотоксичні ефекти цих NP Me опосередковані оксидативним стресом.

Виражену цитотоксичність NP Ag визначено на моделі стовбурових клітин ссавців – попередників сперматозоїдів і стовбурових клітин у волосяних фолікулах [457]. Порівняльна оцінка NP Ag, NP Mo, NP Al і NP Cd при експозиції зі стовбуровими клітинами яєчек 6-добових мишей впродовж 48 год виявила більш високу токсичність NP Ag і NP Cd щодо сперматогенезу в експериментальних тварин [82, 275, 457].

Токсичні ефекти NP Ag потребують особливої уваги дослідників, так як ці NP вже більш 10 років з бактерицидною метою застосовують у медицині в кісткових імплантатах, перев'язувальних та інших матеріалах [82].

Вважають, що токсичність саме Ag по відношенню до ссавців відносно низька, але, особливо у іонній водорозчинній формі, він є токсичним для аквакультур [255, 458]. Важливим є те, що інформація щодо мутагенної і канцерогенної активності сполук цього біметалу є обмеженою.

При вивченні цитотоксичності наночастинок діоксидів Кобальту, Нікелю, Титану і Силіцію на культурі ендотеліальних клітин людини *in vitro* встановлено дозозалежне зниження їх життєздатності у більшому ступені за дії NP Co і NP Ni, що супроводжувалось експресією прозапальних цитокінів (інтерлейкіна-8, E-селектина і ICAM-1) [459].

Культивування клітин ендотелію серцево-судинної системи у присутності наночастинок у концентрації 0,05 і 0,20 мг/л викликало посилення експресії мРНК інтерлейкіна-4 та екстаксину, яким властивий протизапальний ефект [426].

Встановлено, що наночастинок пилової бурі розміром 2,5 нм впродовж 2 год у дослідах на ізольованих альвеолярних макрофагах інгібують

активність Na, K- і Ca, Mg-АТР-аз плазматичної мембрани, впливаючи на її текучість, стимулюють вивільнення із клітин ЛДГ-ази, знижують внутрішньоклітинний вміст глутатіону та приводять до накопичення продуктів ПОЛ [443].

При взаємодії карбонових нанотрубок з макрофагами щурів і клітинами легень людини впродовж 24 год у концентрації 10–100 мкг/мл спостерігали проникнення наночастинок до цитоплазми клітин і зниження їх життєздатності при реєстрації в тетразолієвому тесті [445]. Інкубація клітин з карбоновими нанотрубками призводить до внутрішньоклітинного накопичення АМК і зниження мембранного потенціалу мітохондрій. Наявність ушкоджень ДНК, що індуковані нанотрубками в ембріональних стовбурових клітинах мишей [445], вимагає принципового підходу щодо використання цього типу наноматеріалів у біотехнологіях.

Доведено, що одностінні нанотрубки більш токсичні, ніж багатошарові трубки і фулерени [460], при цьому їх високу цитотоксичність (з порушенням морфології клітин, мітохондріальної та фагоцитарної функцій) визначено навіть у низькій концентрації (0,38 мкг/мл).

Більшість авторів пов'язують механізми токсичних ефектів карбонових та інших наночастинок із формуванням окиснювального стресу та накопиченням токсичних продуктів ПОЛ [30, 79, 462 – 463].

Значення LC_{10} і LC_{50} цитотоксичності фракції частинок Fe, Al, Ca, Na, K, Mg, Pb у нанофазі при культивуванні клітин легеневого епітелію людини лінії L₁₃₂ складає 18,8 і 75,4 мкг/мл. За дії цієї фракції відбувались залежні від концентрації та часу експозиції зміни активності ПОЛ і СОД, утворення 8-гідрокси-2-дезоксигуаніну, полі(АДР)-рибозилування, секреції фактора некрозу пухлини і NO та активації індукцйбельної NO-синтази [464].

Oberdorster G. et al. [30, 465] вважають, що механізми цито- і генотоксичності карбонових наночастинок відбуваються за патогенетичними шляхами: а) реактивна поверхня наночастинок за взаємодії з рецептором клітини викликає окиснення протеїнів і ліпідів клітинної мембрани,

накопичення токсичних продуктів ПОЛ на фоні виснаження антиоксидантів, що призводить до підвищення умісту внутрішньоклітинного Кальцію та активації гена; б) в результаті окиснювального стресу вивільнюються метали з перехідною валентністю; в) рецептори клітинної мембрани активують метали з перехідною валентністю; г) внутрішньоклітинний трансцитоз наночастинок у мітохондріях індукує внутрішньоклітинний окиснювальний стрес і експресію гена.

Якщо у низьких концентраціях наночастинок викликають помірний прооксидантний ефект на фоні активації факторів антиоксидантної системи: каталази, окисненого і відновлюваного глутатіону, СОД і активної індукції антиоксиданту — металотіонеїну [463 – 466], то у високих – оксидативний стрес і пригнічення більшості факторів АОС, при цьому рівень металотіонеїну може бути високим.

У експериментах *in vivo* та *in vitro* доведено, що цитотоксичність NPMe та інших наночастинок зумовлена гено- і мутагенною дією та формуванням оксидативного стресу з утворенням реактивних АМК у процесів пероксидного окиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків [30, 305, 463, 465 – 470].

1.6 Висновок з огляду літератури та формування основних напрямків експериментальних досліджень

Підсумовуючи результати аналізу доступної літератури, слід зупинитись на наступному.

Нанотехнологія – нова сфера науки, яка складається значною кількістю самостійних напрямків досліджень (наноелектроніка, нанофармакологія, нанобіотехнологія, нанотоксикологія тощо), що має народногосподарське значення і по кожному з яких здобуто досить багато нових знань щодо наносвіту.

Основні відкриття, які передбачаються в цій галузі, поки не зроблені. Проте, проведені дослідження вже дають практичні результати.

Слід відзначити, що необхідність всебічних досліджень наночастинок обумовлена значною кількістю експериментальних і теоретичних робіт, у яких зазначається, що їх властивості суттєво відрізняються як від властивостей аналогічних макрочастинок, так і від властивостей речовин, з яких вони були отримані; залежать від їх природи, складу, розміру, форми, заряду, структурних особливостей як поверхні самої наночастинок, так і молекул-модифікаторів поверхні (у випадку їх застосування).

Наночастинок металів посідають основне місце серед наноматеріалів. Більш за все привертають увагу дослідників та є перспективними наночастинок есенційних металів, яким через маленький розмір властивий значний рівень біодоступності. Нанобіотехнології сприятимуть здешевленню препаратів на основі NPMe, тобто, можна стверджувати, що вони мають високий комерційний потенціал з перспективами широкомасштабного застосування.

Слід зазначити, що більша частина експериментальних досліджень проведена з метою створення діагностичних і лікувальних засобів із залученням нанобіотехнологій, вивчення їх ефективності, тому висвітлюють лише окремі фрагменти цієї важливої науково-практичної проблеми.

У той же час, як показали спільні напрацювання нанотехнологів – матеріалознавців, хіміків, біологів, медиків і ветеринарів, найбільш плідним і перспективним є на цей час використання NPMe у клінічній практиці не як кінцевого продукту, а як вихідної сировини для отримання біосумісних субстанцій.

Інші властивості та біологічна дія NPMe, ніж в речовин у макророзмірному стані, остаточно на сьогодні не вивчені та привертають все більшу увагу дослідників як до новітніх матеріалів. Але, дані сучасної літератури показують, що пріоритетним напрямком дослідження залишається визначення ефектів впливу NPMe на будь-який біологічний суб'єкт, що є необхідним при конструюванні біотехнологічних продуктів із залученням нанотехнологій. Такі дослідження можуть бути адекватними лише за

послідовного використання біомаркерів – ключових системних характеристик живого організму (генетичних, фізіологічних, біохімічних, імунологічних, тощо).

Більш з'ясовано ученими та описано два основних механізми контактної взаємодії металів у різних хімічних формах на моделі клітин мікроорганізмів: пасивна локалізація металів бактеріальною клітиною, яка ґрунтується на фізико-хімічному їх зв'язуванні структурними компонентами клітинної мембрани; метаболізм-залежна кумуляція металів, яка пов'язана з функціонуванням ферментних систем клітини, що забезпечують реакції обміну речовин та енергію з навколишнім середовищем.

Прокаріотичні клітини, завдяки унікальним структурним властивостям та обміну речовин, здатні активно контактувати з металами та можуть бути модельною системою для вивчення взаємовідносин між клітиною і NPMе.

Доведені ефективні розміри і концентрації NPMе, зокрема NPAg і NPAu, в яких спостерігається вплив на клітину на структурно-функціональному рівні. Так, визначена або виражена стимуляція усіх показників життєдіяльності еукаріотів і прокаріотів, або наявне їх значне пригнічення до бактерицидної дії включно. Також NPMе залежно від розміру та концентрації в них катіонів металу можуть впливати на активність багатьох ферментів, зокрема мембранозв'язаних.

З іншого боку, окремим напрямком досліджень у сучасних біотехнологіях є вивчення розвитку стресу в мікроорганізмів, зокрема за умов їх промислового культивування та довготривалого зберігання у ліофілізованому стані. У зв'язку з цим вивчення впливу різних факторів на структурно-функціональний стан бактеріальних клітин становить інтерес для розуміння регуляції метаболізму в процесі адаптації.

Визначення критичних точок у фазах розвитку популяції мікроорганізмів, зокрема, коли відбувається максимальне накопичення цільового продукту, а також пошук речовин, які могли б спрямовано впливати на управління фізіолого-біохімічними реакціями клітин популяції, якраз і є, на нашу думку, центральним

завданням досліджень прикладної біохімії та біотехнології. Одним із можливих шляхів вирішення цих проблемних питань є використання здобутків нового інноваційного сегменту пошуку – NPMe.

При цьому взаємодія між бактеріальною клітиною та NPMe може бути неспецифічною: за наявності гальмування або посилення приросту біомаси, при цьому, очевидно, що зміни в клітині на метаболічному рівні будуть суттєвими. Тому, визначитись, чи діють NPMe на клітини мікроорганізмів та яким чином, може дозволити лише цілеспрямоване вивчення фізіолого-біохімічних реакцій клітин промислових штамів за умов отримання їх біомаси та зберігання у життєздатному вигляді.

Продовження досліджень із вивчення фізіолого-біохімічних механізмів впливу NPMe як есенційних (Fe, Cu, Zn, Co, Mn), так і рідких (Ag, Au), на клітини різного рівня організації сприятиме більш глибокому розумінню їх біосумісності або потенційної токсичної дії. Тому, одним із основних етапів на шляху застосування кожного виду NPMe як потенційних субстанцій є комплексна оцінка їх біологічної безпеки у кожному випадку окремо.

У порівнянні з іншими, фармакологічні ефекти NPMe та їх значна перевага у здатності до біодеградації більш широко вивчені за умов застосування лікарських і діагностичних засобів із їх вмістом. Фармакодинаміка NPMe зумовлена їх фізико-хімічними властивостями та наявністю у їх складі саме певних металів. Але, фармако- і токсикокінетична поведінка NPMe у будь-якій клітині, органі та організмі потребує детального дослідження, бракує даних стосовно органів-мішенів, проникнення їх через біологічні мембрани та біодоступності.

Більшість наукових робіт присвячена уявленню цито-, імуно- та інших негативних ефектів на прикладі NPAu і NPAg, їх залежності від форми, концентрації та розміру таких, але між ними існують розбіжності.

Думка дослідників полягає у тому, що опосередкована небезпечність NPMe обумовлена їх цитогенотоксичністю, здатністю викликати запалення та оксидативний стрес на клітинному рівні, але не зовсім переконливо

розмежований характер вищезазначених ефектів і біосумісності наночастинок.

Тобто дослідження біохімічних основ цих процесів є необхідною умовою оцінювання механізмів біосумісності та цитотоксичної дії NPMe для кожного їх виду, розміру, хімічного походження, геометрією окремо. Такі дослідження повинні включати визначення безпечності NPMe в системі *in vitro* з подальшим проведенням токсикологічних експериментів у системі *in vivo*, які передбачають тестування генотоксичності, мутагенності, біосумісності та біодоступності за визначенням генетичних, біохімічних і цитологічних маркерів біологічного потенціалу клітин різного рівня організації.

На жаль, у державі на сьогодні відсутня нормативна база для прогнозу таких ризиків, не має єдиної думки серед дослідників та прямих досліджень щодо механізмів дії NPMe або вони поки ще не з'ясовані, але завдяки їх широкому застосуванню в народному господарстві вже сьогодні збільшені потенційні ризики для здоров'я людей і тварин. Це і становить актуальність досліджень та виконання цієї роботи.

Тому метою дисертаційної роботи було вивчення біохімічної і токсикологічної характеристики дії колоїдних дисперсій NPMe на показники структурно-функціонального стану клітин еукаріотичних і прокаріотичних організмів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконана впродовж 2006–2017 рр. у лабораторіях клінічної біохімії та токсикологічного моніторингу відділу токсикології, безпеки та якості с.-г. продукції Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» Національної академії аграрних наук (ННЦ «ІЕКВМ», м. Харків) за загальною схемою, наведеною на рис. 2.1.

2.1 Матеріали досліджень

2.1.1 Біологічні моделі.

Культури клітин прокаріотичних організмів. Як експериментальні моделі використовували нативні концентрати періодичних культур прокаріотичних клітин виробничих і тест-штамів:

- *Escherichia coli* штамів 4; 19; 20; 24; 25 і 57;
- штами *Salmonella Enteritidis* 34 і М, *Salmonella Dublin* 12 та *Salmonella Typhimurium* 16;
- *Pasteurella multocida* штамів «Смол»; 5; 15; 396; 550; 606; 877 і 1718 відповідно;
- тест-штами *Mycoplasma orale* ATCC 23714; *Mycoplasma arginini* G 230; *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610 та *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206;
- вакцинний штам *Bacillus anthracis* Sterne 34F2.

Штами мікроорганізмів зберігаються у ліофільному вигляді у Депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.



Рис. 2.1 Постановка наукової проблеми та шляхи її з'ясування (загальна схема досліджень).

Дослідні штами культур клітин *M. orale*, *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *Ach. laidlawii* є тест-штамами та використовуються для контролювання сировини для виготовлення імунобіологічних засобів на наявність контамінації мікоплазмами.

Культури клітин ліній еукаріотичних організмів. Як експериментальні моделі еукаріотичних клітин використовували пухлинні клітини лінії – U 937 гістіоцитарної лімфоми людини і тест-клітини лінії СНО-К1 яєчника китайського хом'яка, які зберігаються і підтримуються у кріобанку Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ.

Експериментальні тварини. За умов лабораторії та віварію ННЦ «ЛЕКВМ» з метою проведення гострого і хронічного токсикологічного експериментів у системі *in vivo* використовували статевозрілих щурів-самців лінії *Vistar* (n=224).

Експериментальні дослідження на тваринах проводили з урахуванням основних принципів біоетики: утримання, догляд за тваринами та їх годівлю здійснювали згідно з нормами та раціонами, рекомендованими для даного виду лабораторних тварин; евтаназію тварин проводили шляхом інгаляційного хлороформного наркозу [472 – 474].

2.1.2 Експериментальні зразки наночастинок металів. Синтез експериментальних наночастинок металів, обчислювання їх розміру та візуалізацію за мікроскопічними дослідженнями проводили на базі Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України (м. Київ).

У роботі були використані колоїдні дисперсії наступних NPMе:

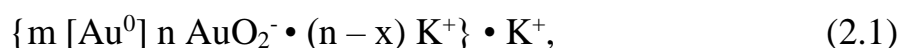
- наночастинки Ауруму (NPAu) розміру ~10, ~20, ~30 та ~45 нм з вихідною концентрацією за металом 38,6 мкг/мл та у діапазоні розведень;
- наночастинки Аргентуму (NPAg) розміру ~20 нм і ~30 нм з вихідною концентрацією за металом 86,4 мкг/мл та у діапазоні розведень;
- наночастинки Феруму (NPFe) розміру $100,0 \pm 5,1$ нм з вихідною концентрацією за металом 3174,0 мкг/мл та у діапазоні розведень;

- наночастинки гексаціаноферрату кобальту ($\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) розміру 100 ± 10 нм з вихідною концентрацією за металом 2489,0 мкг/мл та у діапазоні розведень;
- наночастинки Кобальту (NPCo) розміру 100 ± 12 нм з вихідною концентрацією за металом 1991,6 мкг/мл та у діапазоні розведень;
- наночастинки Купруму (NPCu) розміру ~ 70 нм з вихідною концентрацією за металом 2678,6 мкг/мл та у діапазоні розведень;
- наночастинки Цинку (NPZn) розміру $100,0 \pm 6,8$ нм з вихідною концентрацією за металом 2407,0 мкг/мл та у діапазоні розведень;
- наночастинки двоокису мангану (NPMnO_2) розміру 50 ± 3 нм з вихідною концентрацією за металом 2785,0 мкг/мл та у діапазоні розведень відповідно.

Синтезування NPMe. Колоїдні дисперсії наночастинок металів отримували методами хімічної конденсації шляхом відновлення відповідних солей металів у водному середовищі [475]. Метод, що був використаний для отримання наночастинок металів, дозволяє отримувати стійкі водні дисперсії наночастинок певного розміру.

Наночастинки Ауруму синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном або етанолом. Вихідною речовиною виступала золотохлористоводнева кислота ($\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\geq 99.9\%$ trace metals basis), за взаємодії якої з карбонатом калію (K_2CO_3 ; 99.995% trace metals basis у водному розчині утворюється аурат калію.

Будова міцел отриманих золей Ауруму може бути представлена формулою (2.1):



де: m – кількість молекул Au^0 ;

n – кількість надлишкових іонів AuO_2^- , що міцно адсорбовані на поверхні агрегату (як правило $m > n$), які є потенціало-утворюючими;

x – кількість іонів, що входять у дифузійний шар;

$(n - x)$ – кількість протиіонів K^+ адсорбованого шару. Кількість іонів калію $(n - x)$ – менш кількості адсорбованих іонів $AuO_2^- (n)$, внаслідок чого наночастка має заряд $(-x)$.

Використаний для отримання NP Au метод дозволяє отримувати стійкі водні дисперсії наночастинок певного розміру.

Наночастинки Аргентуму синтезували шляхом відновлення нітрату аргентуму ($AgNO_3$; >99% (titration, Sigma – Aldrich) за взаємодії з 1% розчином таніну (ACS reagent, Sigma – Aldrich) та 0,03 N розчину карбонату калію (K_2CO_3 ; 99.995% trace metals basis, Sigma-Aldrich).

Наночастинки Феруму синтезували шляхом відновлення феруму хлориду (III) ($FeCl_3$; anhydrous, powder, $\geq 99.99\%$ trace metals basis, Aldrich) за взаємодії з натрію борогідридом (~98%). Як стабілізатор використовували розчин декстрану (M_r (30 000–40 000) Да) у 0,9 % фізіологічному розчині натрію хлориду (BioXtra, $\geq 99,5\%$).

Наночастинки Кобальту синтезували шляхом відновлення кобальту хлориду ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) за взаємодії з натрію борогідридом (~98%). Як стабілізатор використовували розчин декстрану (M_r 30 000–40 000) Да у 0,9 % фізіологічному розчині натрію хлориду (BioXtra, $\geq 99,5\%$).

Наночастинки гексаціаноферату кобальту синтезували шляхом відновлення кобальту хлориду ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) за взаємодії з гексаціанофератом калію ($K_4[Fe(CN)_6]$).

Наночастинки Купруму синтезували шляхом відновлення купруму сульфату ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) за взаємодії з натрію борогідридом (~98%, Sigma). Синтез проводили за лужних умов. Як стабілізатор використовували розчин декстрану 30 000–40 000 (M_r 30 000; M_r 40 000; Sigma) у 0,9 % фізіологічному розчині NaCl (BioXtra, $\geq 99,5\%$, Sigma – Aldrich).

Наночастинки Цинку синтезували шляхом відновлення цинку хлориду ($ZnCl_2$) за взаємодії з натрію борогідридом (~98%, Sigma). Синтез проводили за лужних умов. Як стабілізатор використовували розчин декстрану (30 000–

40 000) (M_r 30 000; M_r 40 000; Sigma) у 0,9 % фізіологічному розчині NaCl (BioXtra, $\geq 99,5\%$, Sigma – Aldrich).

Наночастки двоокису мангану синтезували шляхом відновлення калію перманганату ($KMnO_4$) за взаємодії з перекисем водню (H_2O_2).

Обчислення розміру NPMe. Розмір отриманих NPMe обчислювали за використання методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС). Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 (Malvern Instruments Ltd, Велика Британія).

На рисунках 2.2 і 2.3 наведено типові зображення розподілу дослідних NPAu та NPAg певного розміру за їх гідродинамічним діаметром за методом ЛКС, а на рисунках 2.4 і 2.5 – мікроскопічні зображення NPAu, NPFe і $NPMnO_2$.

У випадку монодисперсних систем метод ЛКС дозволяє з високою точністю визначити константи швидкості дифузії частинок, а також обчислити їх гідродинамічний діаметр, виходячи з припущення щодо сферичної геометрії цих частинок [476].

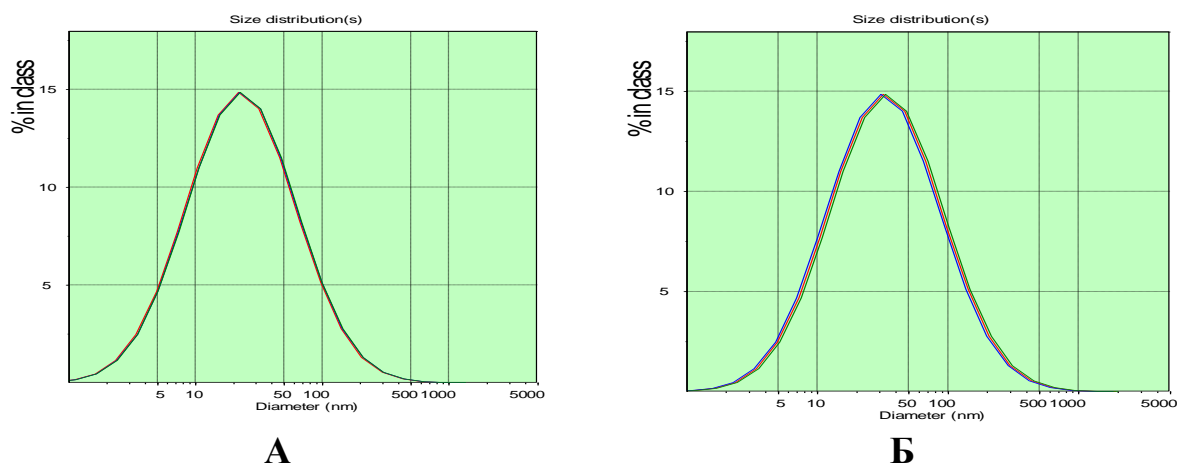


Рис. 2.2 Розподілення NPAu розміру $21,80 \pm 0,23$ нм (А) і $32,80 \pm 1,30$ нм (Б) за гідродинамічним діаметром (дані ЛКС; Malvern Instruments Ltd, Велика Британія).

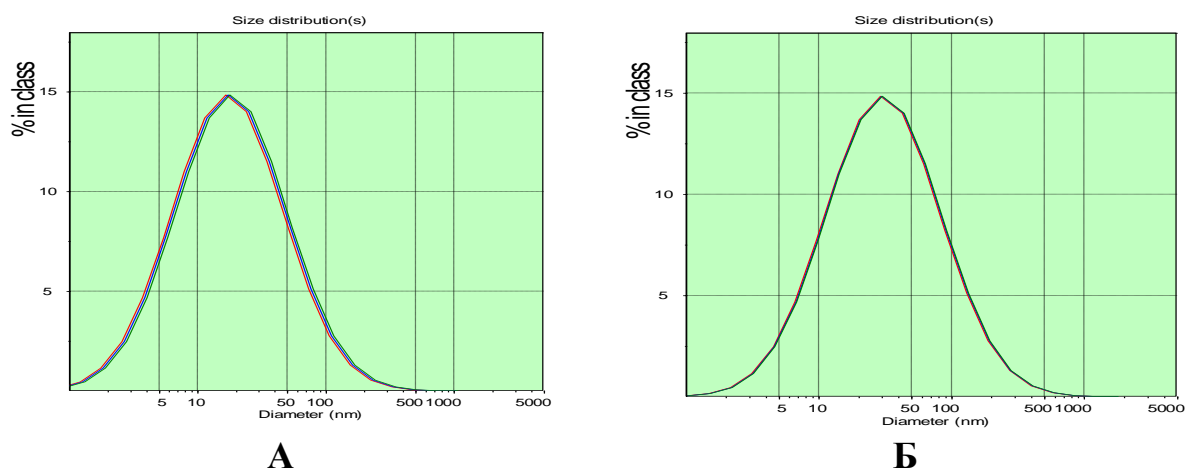


Рис. 2.3 Розподілення NPAg розміру $19,33 \pm 0,37$ нм (А) і $30,40 \pm 0,50$ нм (Б) за гідродинамічним діаметром (дані ЛКС; Malvern Instruments Ltd, Велика Британія).

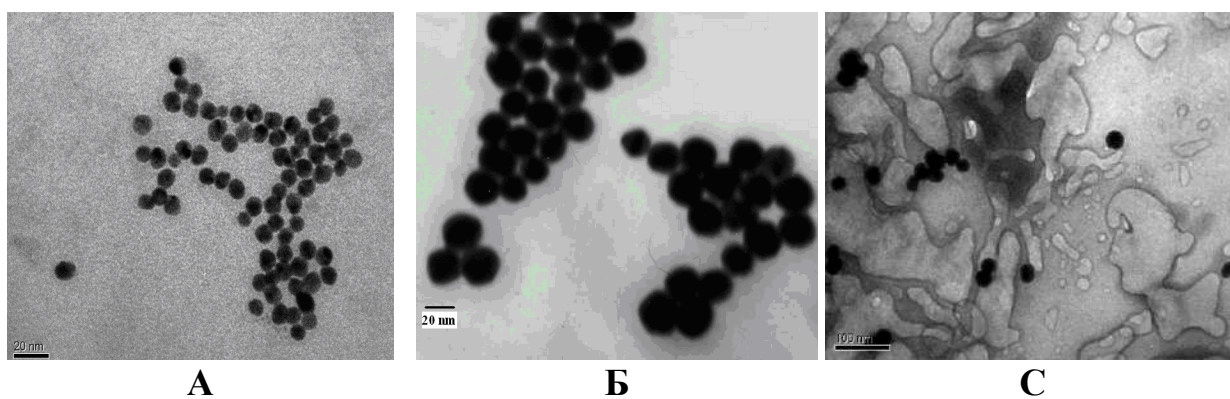


Рис. 2.4 Дослідні зразки NPAu розміру ~ 10 нм (А), ~ 30 нм (Б) та ~ 45 нм (С) (дані TEM; JEM-1230, JEOL, Японія).

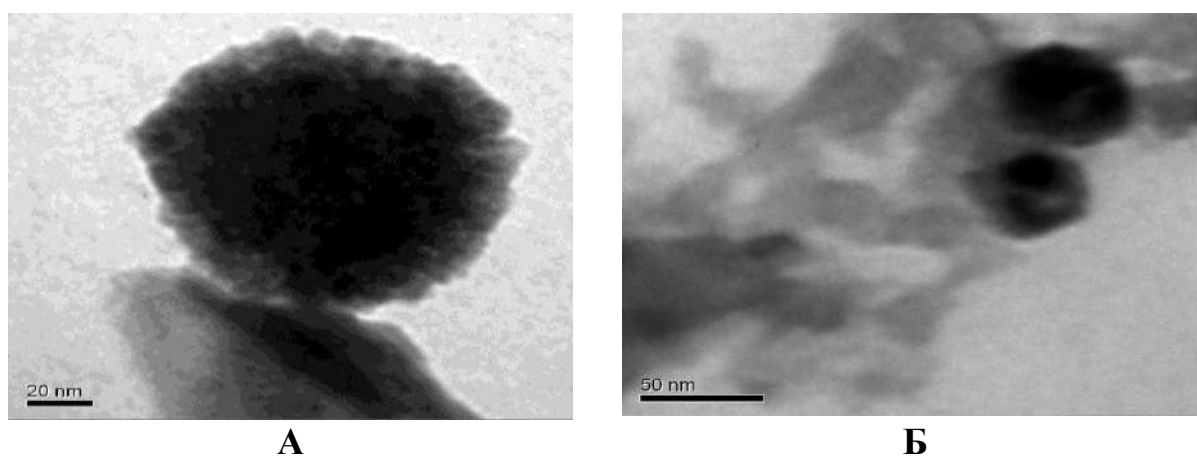


Рис. 2.5 Дослідні зразки NPFe розміру ~ 100 нм (А) і NPMnO_2 середнього розміру ~ 50 нм (Б) (дані TEM; JEM-1230, JEOL, Японія).

Розмір та геометрію отриманих препаратів NPMe також встановлювали за використання методу трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). При проведенні мікроскопічних досліджень виготовлених зразків NPMe поряд з певним розміром частинок було визначено їх сферичну геометрію.

Таким чином, використані методи ЛКС і ТЕМ дозволили надати характеристику дискретного розміру та геометричної форми дослідних зразків NPMe, які були нами використані у подальших експериментах за умов *in vitro* та *in vivo*.

2.2 Схеми проведення експериментів

2.2.1 Експерименти у системі *in vitro*.

2.2.1.1 У першій серії дослідів спочатку проводили визначення безпечності (потенційної токсичності) дослідних зразків NPMe (Au, Ag, Cu, Fe, Co[Fe(CN)₆], Co, Zn, MnO₂) на моделі ізольованих тест-клітин CHO-K1, апікальної меристеми *Allium cepa* та субклітинних фракцій еукаріотичних і прокаріотичних організмів за системними біомаркерами – генотоксичність, мутагенність та біохімічними маркерами цитотоксичності за схемою, наведеною на рис. 2.1.

2.2.1.2 У другій серії дослідів проводили визначення біохімічних характеристик дії NPAu і NPAg на прокаріотичні клітини *Esherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. та після ліофілізації/регідратації та дії NPAu – при отриманні біомаси клітин вакцинного штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 за схемою, наведеною на рис. 2.6.

2.2.2 Експерименти у системі *in vivo*.

Визначення токсичної дії та біосумісності дослідного зразка суміші NPMe на моделі лабораторних тварин у гострому та хронічному експериментах. У роботі використовували композиційну суміш NPMe, яку було складено із NPAg (вихідна концентрація – 86,4 мкг/мл, розміру $\sim 31,5 \pm 0,9$ нм), NPFe (3174,0 мкг/мл, $\sim 100 \pm 10$ нм), NPMnO₂ (2785,0 мкг/мл, $\sim 50 \pm 3$ нм), NPCu (2678,0 мкг/мл за металом, $\sim 70 \pm 4$ нм), в аліквотному

співвідношенні із кінцевим емістом металів 100 мкг/мл за металом відповідно.

2.2.2.1 Схема гострого токсикологічного експерименту на лабораторних тваринах. За лабораторних та умов віварію ННЦ «ЛЕКВМ» було проведено дослід на статевозрілих щурах-самцях лінії *Bistar* (n=144) масою 200–250 г. За принципом аналогів було сформовано 6 груп тварин по 24 щури у кожній (табл. 2.1).

Тваринам I і II дослідних груп вводили одноразово внутрішньошлунково за допомогою зонду суміші NPMе і солей відповідних металів з розрахунку 0,3 мг/кг маси тіла (біотична доза), а тваринам III, IV і V груп – суміш NPMе у дозах, що перевищували біотичну дозу в 3,3; 6,7 і 13,3 рази (1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла) відповідно.

Тваринам контрольної групи вводили одноразово внутрішньошлунково за допомогою зонду дистильовану воду в дозі 2 мл/щура.

Масу тіла щурів контрольної і дослідних груп визначали зважуванням їх перед введенням препаратів. Упродовж досліді проводили спостереження за клінічним станом та поведінкою тварин усіх груп.

Таблиця 2.1

**Схема гострого токсикологічного експерименту
на білих щурах лінії *Bistar* (n=144)**

Групи тварин		Доза, мг/кг маси тіла	Терміни дослідження, доба				
			1	3	7	14	
				Кількість евтано-зованих тварин			
Контроль (n=24)		Дистильована вода, 2 мл/щура		6	6	6	6
Дослід	I (n=24)	Суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла		6	6	6	6
	II (n=24)	Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла		6	6	6	6
	III (n=24)	Суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла		6	6	6	6
	IV (n=24)	Суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла		6	6	6	6
	V (n=24)	Суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла		6	6	6	6

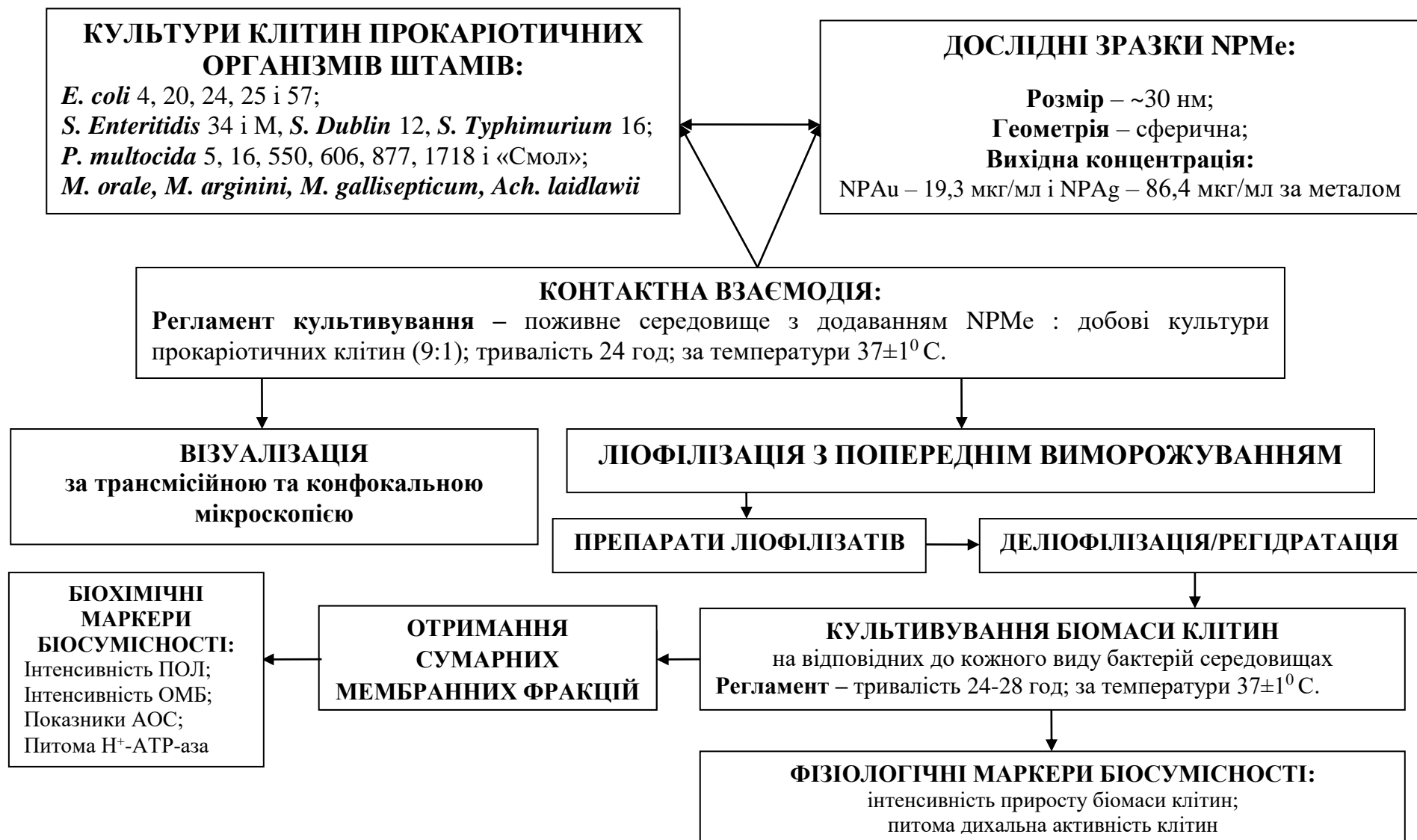


Рис. 2.6 Схема проведення досліджень.

Для визначення впливу вищезазначених доз суміші NPMe та суміші солей відповідних металів на організм експериментальних тварин, на 1-шу та через 3; 7 і 14 діб після одноразового введення, щурів (n=5) кожної групи декапітували (за умов легкого хлороформного наркозу) та відбирали від них зразки крові для проведення гематологічних і біохімічних досліджень.

Для визначення розподілення, накопичення та елімінації металів під час патологоанатомічного розтину щурів через 1; 3; 7 і 14 діб після початку досліду були відібрані зразки органів (n=5).

Відібрані зразки внутрішніх органів зважували та вираховували коефіцієнти їх маси, які порівнювали з аналогічними показниками від тварин контрольної групи.

2.2.2.2 Схема хронічного токсикологічного експерименту на лабораторних тваринах. За лабораторних та за умов віварію ННЦ «ІЕКВМ» було проведено дослід на статевозрілих щурах-самцях лінії *Vistar* (n=80) масою 120–140 г. За принципом аналогів було сформовано 4 групи щурів по 20 тварин у кожній (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

**Схема хронічного токсикологічного експерименту
на білих щурах лінії *Vistar* (n=80)**

Групи тварин		Доза, мг/кг маси тіла	Термін дослідження, доба				
			15	30	60	90	
		Кількість евтаназованих тварин					
Контроль (n=20)		Дистильована вода, 2 мл/щур	5	5	5	5	
Дослід	I (n=20)	Суміш NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла	5	5	5	5	
	II (n=20)	Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла	5	5	5	5	
	III (n=20)	Суміш NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла	5	5	5	5	

Після витримування експериментальних щурів усіх груп на стандартному раціоні впродовж 7 діб (вирівнювальний період), тваринам

дослідних груп (I; II; III групи) було задано з кормом упродовж 90 діб розчини суміші NPMe та суміші солей відповідних металів (II група).

Щурам I дослідної групи суміш NPMe задавали у дозі 0,3 мг/кг маси тіла (біотична доза суміші NPMe), II дослідної групи – розчин суміші солей відповідних металів у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, а III – суміш NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла (найбільш токсична (небезпечна) доза суміші NPMe).

Щурам контрольної групи за аналогічним регламентом задавали дистильовану воду.

Спостереження за тваринами усіх груп проводили упродовж 90 діб (основний період). На 15-, 30-, 60- і 90-ту добу після згодовування суміші NPMe і суміші солей відповідних металів від 5 тварин з кожної групи після інгаляційного хлороформного наркозу були відібрані проби крові з подальшим отриманням плазми крові, а після знекровлення – органи для біохімічних і токсикологічних досліджень.

2.3 Методи досліджень

2.3.1 Методи культивування клітин прокаріотичних організмів дослідних штамів. Періодичні культури бактеріальних клітин культивували на відповідних поживних середовищах – рідкому – м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) і бульйоні Хоттінгера та щільному – м'ясо-пептонному агарі (МПА) і агарі Хоттінгера (вміст амінного азоту 100–120 мг%, рН 7.4), оптимальних для накопичення бактеріальної маси.

З метою отримання біомаси клітин *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Pasteurella* spp. та *Bacillus* spp., нарощували в колбах на качалці за температури $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ впродовж 24 год на відповідному до цього виду бактерій рідкому збагаченому поживному середовищі за умов інтенсивної аерації, після чого клітини, що знаходились у стаціонарній фазі росту, осаджували шляхом центрифугування за 6000 об/хв впродовж 10 хв, відмивали від поживного середовища стерильним фізіологічним розчином NaCl, рН 7.0–7.2. Біомасу клітин *Mycoplasma* spp. тест-штамів культивували

за температури 56 ± 1 °C впродовж 4–5 діб на поживному середовищі з додаванням кінської сироватки інактивованої (рН 7.5).

У подальших експериментах використовували біомасу клітин *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. і *Pasteurella* spp. з концентрацією мікробних клітин у межах 20,0–30,0 млрд КУО/мл, *Mycoplasma* spp. – 50,0–55,0 млрд КУО/мл та *Bacillus* spp. – життєздатних спор у межах 11–12 млн КУО/мл відповідно.

Отриману бактеріальну масу періодичних культур клітин контролювали на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною й грибною мікрофлорою згідно з ДСТУ 4483:2005 [477].

2.3.2 Методи роботи з лініями клітин еукаріотичних організмів.

Клітини лінії U937 культивували у середовищі RPMI 1640, що містить 10 % ембріональної сироватки ВРХ, лінії СНО-К1 – у середовищі F10, що містить 5 % ембріональної сироватки ВРХ, за температури 37 ± 1 °C у CO₂-інкубаторі у атмосфері 5% CO₂ до титру $5 \cdot 10^6$ КУО/мл.

Життєздатність клітин оцінювали за допомогою фарбування з використанням 0,3 % розчину трипанового синього. Кількість живих клітин складала не менш ніж 90 %.

Клітини відмивали від поживного середовища стандартним ФСБ-буфером шляхом двократного центрифугування при 1000 об/хв впродовж 5 хв. Для подальших досліджень клітини ресуспендували у стандартному ФСБ-буфері.

2.3.3 Ліофільне (сублімаційне) висушування біомаси та деліофілізація/регідратація (відновлення життєздатності) клітин прокариотичних організмів. Ліофільне висушування біомаси клітин мікроорганізмів проводили на ліофільній установці (ALPHA 1-4 LD-2, Німеччина) з використанням захисного середовища Файдича у співвідношенні (1:1) за об'ємом, що містить 10% сахарози та 1% желатину, з попереднім виморожуванням за температури мінус 70 ± 3 °C впродовж 24 год та деліофілізацію/регідратацію – відповідно до вимог [479] та за методикою

[378, 379], після чого біомасу культивували на стандартному поживному середовищі для кожного виду мікроорганізмів з подальшим пересіванням на відповідне агаризоване середовище за аналогічних умов.

Процес ліофілізації вважали завершеним за вмісту залишкової вологи, рівень якої не повинен перевищувати 3%.

Препарати ліофілізатів бактеріальних клітин зберігали за температури мінус $20 \pm 1^\circ \text{C}$; повторного заморожування не допускали.

2.3.4 Визначення біосумісності NPMe у гострому експерименті на ізольованих сумарних мембранних фракціях клітин *E. coli* до (контроль) та після ліофілізації/регідратації. Біомасу нативних (контроль) і ліофілізованих/регідратованих клітин *E. coli* штамів 57; 25; 24; 20 і 4 накопичували на відповідному поживному середовищі впродовж 24 год із подальшим концентруванням до 20,0–30,0 млрд КУО/мл та виділенням препаратів сумарних мембранних фракцій (СМФ) відповідно.

У експериментах використовували колоїдні дисперсії NPAu розміру ~ 20 нм, ~ 30 нм і ~ 45 нм та NPAg – ~ 30 нм відповідно.

Дослідження здійснювали у реакційній суміші, що містила екстракт СМФ клітин та NPMe (2:1), за температури $37 \pm 1^\circ \text{C}$ та преінкубації впродовж 3 хв.

Кінцева концентрація NPAu у середовищі інкубації становила 1,16 мкг/мл та у розведеннях 0,0125; 0,025; 0,050; 0,100 і 0,200 мкг металу/мкг білка; NPAg – 2,59 мкг/мл та у розведеннях 0,028; 0,055; 0,110; 0,230 і 0,460 мкг металу/мкг білка відповідно.

Як контрольний зразок вважали екстракти СМФ бактеріальних клітин, до вмісту яких замість NPMe додавали 20 мМ Трис-НСІ буферу.

Визначення біосумісності NPMe, які попередньо було преінкубовано з СМФ, оцінювали за рівнем біохімічних маркерів відповідних бактеріальних клітин.

2.3.5 Визначення біохімічних параметрів структурно-функціонального стану прокариотичних клітин за контактної взаємодії з NPMe та після ліофілізації/регідратації (рис. 2.6). Біомасу нативних (контроль) і ліофілізованих/регідратованих культур клітин *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. і *Pasteurella* spp. накопичували на відповідних до певного виду мікроорганізмів поживних середовищах впродовж 24 год із подальшим концентруванням до 20,0–30,0 млрд КУО/мл, *Mycoplasma* spp. – впродовж 3–4 діб до 50,0–55,0 млрд КУО/мл відповідно.

Дослідження здійснювали у реакційній суміші, що містила відповідну суспензію бактеріальних клітин і поживне середовище з додаванням NPMe (4:1), за температури 37 ± 1 °C та преінкубації впродовж 30–40 хв. Середовище із вмістом NPMe піддавали автоклавуванню за 0,7 атм; з метою перевірки на стерильність витримували за температури 37 ± 1 °C впродовж 48 год.

У експериментах використовували колоїдні дисперсії NPAu та NPAg середнього розміру ~ 30 нм з вихідною концентрацією 19,3 мкг/мл та 86,4 мкг/мл за металами відповідно.

Визначення впливу дослідних NPMe на бактеріальні клітини за умов ліофілізації/регідратації здійснювали за схемою: після перевірки на стерильність у конічні колби з середовищем, що містить NPMe у відповідних концентраціях за металом, та з стандартним середовищем (контроль) за умов асептики засівали по 1 мл суспензії добової культури бактеріальних клітин з відомою концентрацією та інкубували за температури 37 ± 1 °C; проводили візуалізацію взаємодії NPMe з відмитими клітинами за умов преінкубації впродовж 10 хв за мікроскопічним аналізом. Після накопичення біомасу бактеріальних клітин піддавали ліофілізації проводили деліофілізацію/регідратацію з подальшим культивуванням біомаси клітин на відповідних для певного виду мікроорганізмів поживних середовищах; проводили виділення СМФ, визначення рівня біохімічних параметрів і статистичний аналіз.

У ізольованих прокаріотичних клітинах визначали рівень інтенсивності приросту біомаси, процесів пероксидного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків, активності каталази і питомої H^+ -АТФ-азної активності, загальної АОА та питомої дихальної активності.

Як контрольний зразок використовували біомасу бактеріальних клітин, які культивували на відповідних до певного виду мікроорганізмів поживних середовищах без додавання NРМе за стандартною методикою.

2.3.6 Визначення інтенсивності приросту біомаси та показників енергетичного метаболізму клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 за впливу NРAu. Вивчення контактної взаємодії клітин *B. anthracis* з колоїдними дисперсіями NРAu розміру $19,0 \pm 0,9$ нм із вихідною концентрацією 19,0 мкг/мл проводили у поживному середовищі у діапазоні розведень 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; 1:10; 1:12; 1:20, за температури 37 ± 1 °С та з NРAu – розміру $30,0 \pm 0,6$ нм з вихідною концентрацією 38,6 мкг/мл та 77,2 мкг/мл за металом відповідно.

Поживне середовище після автоклавування при 0,7 атм витримували за температури (37 ± 1) °С впродовж 48 год для перевірки на стерильність. Після цього в пробірки з середовищем засівали по 1 мл культури *B. anthracis* з концентрацією $1 \cdot 10^6$ колоній утворюючих одиниць в 1 мл (КУО/мл) та культивували за температури 37 ± 1 °С впродовж 20–24 год.

Після цього з пробірок відбирали по 1 мл поживного середовища та визначали інтенсивність накопичення біомаси клітин за рівнем показника КУО/мл методом десятичних граничних розведень від 10^{-1} до 10^{-15} . Після серійних розведень пробірки залишали для інкубації за температури 37 ± 1 °С впродовж 20–24 год. Статистично отримані результати виражали в lg.

У ізольованих клітинах *B. anthracis* визначали рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності (питома ДА).

Контрольним зразком слугувала біомаса бактеріальних клітин, отримана на відповідному поживному середовищі без додавання NРМе за стандартною методикою.

2.3.7 Методи препаративних досліджень. Методи отримання препаратів сумарних мембранних фракцій бактеріальних клітин.

Препарати ізольованих СМФ бактеріальних клітин дослідних штамів одержували шляхом оброблення суспензії клітин УЗ з подальшим диференційним центрифугування за методом [220].

Протокол одержання сумарних мембранних фракцій із концентратів культур клітин *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.* і *Pasteurella spp.* дослідних штамів. Виділення СМФ прокаріотичних тест-клітин проводили за методикою [479]. Бактеріальні клітини змивали з поверхні чашок середовищем А (0,25 М сахароза, 25 мМ Трис-НСІ, 2 мМ ЕДТА, рН 7.4), обробляли ультразвуком (УЗДН-1, 22 кГц, сила анодного струму 0,4–0,7 А, резонансні умови), проводили диференційне центрифугування при 10 000 g, збирали осад, ресуспендували у середовищі збрігання Б (10 мМ Трис-НСІ, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ дитіотрейтол, рН 7.4).

Протокол одержання сумарних мембранних фракцій із концентратів культур клітин *Mycoplasma spp.* дослідних штамів. Концентрати нативних бактеріальних клітин відмивали від культуральної рідини і ресуспендували шляхом центрифугування при 16 000 об/хв двічі впродовж 10 хв у середовищі А (10 мМ Трис-НСІ, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ феназинметілсульфонілфториду, 1 мМ дитіотрейтол, рН 7.4); суспензію (об'єм – 25,0 мл, концентрація клітин – 16–20 мг сухої маси у 1 мл) піддавали осмотичному лізису дистильованою водою впродовж 20–25 хв за умов льодяної бані. Ступінь руйнування клітин контролювали за зростання у середовищі концентрації загального білка, що звільнюється із цитоплазми при деструкції клітинних оболонок. За вказаних умов диспергування, концентрація загального білка суттєво зростала у середовищі й стабілізувалась на максимальному рівні через 20–25 хв. Одержаний таким чином лізат клітин центрифугували при 8000 об/хв впродовж 15–20 хв. Осад відкидали, а супернатант знов центрифугували при 10 000 g впродовж 1 год.

З метою відмивання осад центрифугували, ресуспендували в невеликій кількості середовища А, стабілізували додаванням мертіоляту з розрахунку 1:100 та використовували в досліді.

Протокол одержання препаратів мембранної та цитозольної фракції із ізольованих еукаріотичних клітин. Виділення субклітинних фракцій еукаріотичних клітин проводили за методикою [479]. Клітини відмивали від поживного середовища стандартним ФСБ-буфером двократним центрифугуванням при 16 000 об/хв протягом 5 хв, ресуспендували у буфері для екстракції цитозолу: 250 мМ сахароза, 70 мМ КСl, 250 мкг/мл дигитонін, 1 мМ ФМСФ, 5 мМ ЕДТА на ФСБ-буфері, рН 7.4; інкубували протягом 20 хв, за температури 4 °С за умов постійного перемішування (80–90 % клітин стають проникними для трипанового синього), осаджували суспензію центрифугуванням при 16 000 об/хв протягом 5 хв, надосад збирали як цитозольну фракцію, а осад ресуспендували у льодяному буфері наступного складу: 50 мМ Трис-НСl, 10 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ЕДТА, 1% тритон X100, 10% гліцерин, рН 7.5. Суспензію інкубували впродовж 10 хв на льоду за умов постійного перемішування, центрифугували 10 хв при 10 000 g, 4 °С. Осад – СМФ – ресуспендували у середовищі: 20 мМ Трис-НСl, 3 мМ MgCl₂, рН 7.4.

Отримані препарати клітинних фракцій еукаріотичних і прокаріотичних організмів характеризували за вмістом білку по методу Лоурі [480]. У якості стандартного білка для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA).

Препарати субклітинних фракцій зберігали за температури мінус 20±1 °С; повторного заморожування не допускали.

2.3.8 Методи аналітичних досліджень.

2.3.8.1 Визначення гентотоксичної дії NРМе за методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин («ДНК-кометний» тест). За методом «ДНК-комет» [481 – 485] визначали генотоксичну дію наступних NРМе: NРАg, NРСо, NРСо[Fe(CN)₆], NРCu,

NP_{MnO₂}, NP_{Zn} та NP_{Au}, по відношенню до генетичного апарату тест-клітин CHO-K1.

NP_{Me} використовували у діапазоні концентрацій: NP_{Ag} – 27,8 і 0,28 мкг/мл; NP_{Co} – 664,0; 124,0 і 0,12 мкг/мл; NP_{Co}[Fe(CN)₆] – 830,0; 155,0 і 0,16 мкг/мл; NP_{Cu} – 823,0; 226,0 і 0,22 мкг/мл; NP_{MnO₂} – 928,0; 433,0; 238,0 і 0,24 мкг/мл; NP_{Zn} – 802,0; 150,0 і 0,25 мкг/мл; NP_{Fe} – 1061,0; 255,0 і 0,25 мкг/мл та NP_{Au} – 11,06; 14,00; 38,60; $11,06 \cdot 10^{-5}$; $14,00 \cdot 10^{-5}$ та $38,60 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл за металом відповідно.

Протокол проведення визначення маркера генотоксичності за методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин («ДНК-кометний» тест). Дослідження проводили у наступному порядку: отримання гель-слайду, формування мікропрепарату, лізис, лужна денатурація, проведення електрофорезу, нейтралізація/фіксація, фарбування препарату, мікроскопічний аналіз [481, 482].

Визначення генотоксичності здійснювали у реакційній суміші, що містить суспензію тест-клітин і NP_{Me} (2:1) за температури 37±1 °С. Час інкубації NP_{Me} з клітинами CHO-K1 складав 18 год.

У експериментах з метаболічною активацією використовували мікосомальну фракцію S9 печінки щурів, уміст якої в інкубаційній суміші складав 5 %. Час інкубації тривав 3 год за температури 37±1 °С.

«Позитивним» контролем слугували клітини культури CHO-K1, оброблені N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1 мМ протягом 48 год. Як «негативний» контроль використовували інтактні клітини CHO-K1, які не обробляли тест-мутагеном.

Підготування ізольованих еукаріотичних клітин. Для оцінки генотоксичності препаратів NP_{Me} за умов *in vitro* методом «ДНК-комет» використовували тест-культуру клітин китайського хом'яка CHO-K1.

Тест-культуру клітин обробляють препаратом NP_{Me} (дослідна проба) протягом 3–24 год, хімічною сполукою (24 год, N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1 мМ – «позитивний» контроль) і розчинником (24 год, водою

«негативний» контроль), після чого підраховували загальну кількість клітин і визначали відсоток живих клітин.

Отримання мікропрепаратів шляхом іммобілізації ізольованих евкаріотичних клітин в агарозному гелі. Для підготовки агарозних пластинок використовували 1 % агарозний гель з універсальної агарози ($T_{пл} < 65^{\circ}C$). Гель повинен бути повністю прозорим.

У подальшому на поверхню предметного скла наносили 150 мкл отриманого гарячого агарозного гелю, розтягуючи гарячий гель на 3/4 площі скла. Не допускається утворення бульбашок. Час затвердіння агарози (1–2 год), після чого на скло з 1 % гелем наносили 60 мкл суспензії іммобілізованих у 0,5 % агарозному гелі евкаріотичних клітин (1:1), накривали покривним склом під кутом так, щоб не було бульбашок. Предметне скло клали на поверхню льоду і залишали на 10 хв для затвердіння гелю. Обережно знімали покривне скло (тягнули за край) і предметне скло поміщали у скляну кювету.

Далі всі маніпуляції проводили тільки в затемненому приміщенні при світлі жовтої або зеленої лампи.

Лізис евкаріотичних клітин, іммобілізованих в агарозі (при цьому відбувається випетлювання хроматину в пори агарози). Склад основного лізуючого розчину: 10 мМ Трис-НСl (рН 10.0), 2,5 М NaCl, 100 мМ ЕДТА- Na_2 . Розчин зберігали за температури $20^{\circ}C$ впродовж 1 міс. Безпосередньо в день експерименту готували робочий лізуючий розчин шляхом додавання до основного лізуючого розчину Тритон Х-100 і ДМСО до кінцевих концентрацій 1 % і 10 % відповідно. Робочий розчин перед використанням охолоджували до температури $4^{\circ}C$.

У кювету з предметним склом заливали попередньо охолоджений робочий лізуючий розчин, накривали кювету фольгою і за умов холодильнику проводили лізис впродовж 1–24 год. По закінченню лізису скло виймали з розчину, даючи стекти рідині під кутом.

Предметне скло із мікропрепаратом викладали на поверхню камери для горизонтального електрофорезу.

Лужна денатурація ДНК за умов $\text{pH} > 13.0$. В електрофоретичну камеру заливали розчин для електрофорезу. Скло не має змінювати положення при внесенні рідини для електрофорезу, залишаючи мікропрепарати на 20 хв при вимкненому апараті для електрофорезу.

Розподіл денатурованої ДНК гель-електрофорезом. Склад основних розчинів: 10 М NaOH і 200 мМ ЕДТА-Na₂. Розчини зберігали за температури 20 °С впродовж 2 міс. Безпосередньо в день експерименту готували робочий розчин для електрофорезу: 300 мМ NaOH, 1 мМ ЕДТА-Na₂, $\text{pH} > 13.0$. Готовий розчин охолоджували за температури 4 °С.

Електрофорез проводили впродовж 20–30 хв за напруженості поля 1 V/cm, силі струму не більше за 250 мА. Параметри електрофорезу регулювали додаванням або видаленням електрофоретичного розчину.

Після закінчення електрофорезу виймали скло пінцетом, даючи стекти рідині під кутом.

Нейтралізація/фіксація мікропрепаратів. Скло поміщали в скляну кювету і заливали 70 % розчином етилового спирту. Термін фіксації складав 15 хв.

Мікропрепарати висушували за температури 20 °С впродовж 1–2 год і зберігали до аналізу в сухому темному місці (максимальний термін зберігання препарату становив 2–4 міс.

Фарбування мікропрепаратів флуоресцентними барвниками для візуалізації ДНК. Для фарбування мікропрепаратів ДНК-комет використовували флуоресцентний барвник – акридиновий помаранчевий.

Стоковий розчин акридинового помаранчевого з концентрацією 200 мкг/мл готували на бідистильованій воді. Безпосередньо перед фарбуванням готували робочий розчин барвника: 100 мкл стокового розчину барвника змішували з 900 мкл 50 мМ ацетатного буфера, $\text{pH} 4.5$.

Мікропрепарати занурювали у склянку з ацетатним буфером на 20 сек, даючи стекти рідині під кутом, після чого робочий розчин акридинового помаранчевого об'ємом 60 мкл наносили на мікропрепарат, витримували в горизонтальному положенні в затемненому місці протягом 30 хв.

Візуалізація ДНК за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Мікропрепарати аналізували на флуоресцентному мікроскопі зі збуджуючим фільтром 490 нм, дихроїчними дзеркалами 510, відтинаючим фільтром 530 нм. Рекомендоване збільшення \times (200–400). На кожен мікропрепарат аналізували не менше 100 ДНК-комет без накладень «хвостів». У аналіз не включали апоптичні клітини, які мають вигляд слабо флуоресціюючих ДНК-комет з широким дифузним «хвостом» і практично відсутньої «головою», так звані «їжаки».

Аналіз ДНК-комет проводили візуально. ДНК-комети розподіляли на п'ять умовних типів із відповідним для кожного числовим значенням від 0 до 4 (рис. 2.7).

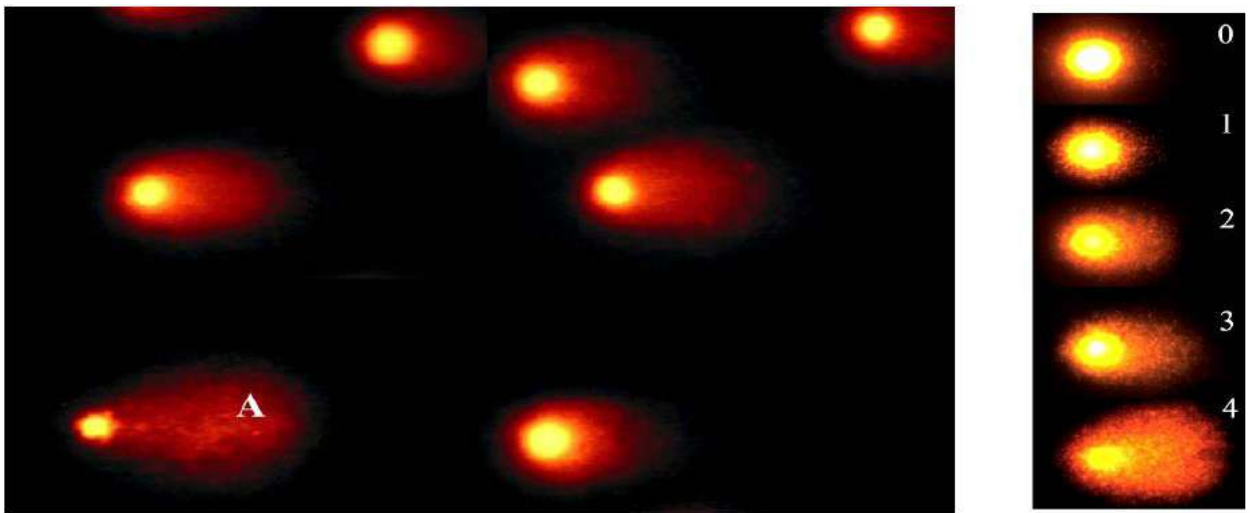


Рис. 2.7 Цифрове зображення препарату «ДНК-комет»: ліворуч – загальний вигляд препарату у полі зору мікроскопу, А – комета апоптичної клітини; праворуч – ДНК-комети із різним рівнем пошкодження ДНК (від 0 до 4).

Ступінь пошкодження ДНК за даних умов виражали як індекс ДНК-комет ($I_{\text{ДНК}}$), який обчислювали за формулою (2.2):

$$I_{\text{ДНК}} = \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{\Sigma}, \quad (2.2)$$

де: $I_{\text{ДНК}}$ – індекс ДНК-комет;

n_0-n_4 – число ДНК-комет кожного типу;

Σ – сума ДНК-комет.

Експерименти виконували в 6 повторах та у двох паралелях.

Комп'ютерну обробку отриманих цифрових зображень здійснювали за допомогою програми «СОМЕТ–CASP».

Аналіз параметрів ДНК-комет» проводили в режимі «реального часу» або зі збережених цифрових зображень. Як показники пошкодження ДНК використовували «довжину хвоста», «% ДНК в хвості» чи його твір – так званий «момент хвоста» (tail moment).

Облік результатів. Статистичну оцінку результатів проводили, порівнюючи показники пошкодження ДНК у дослідній та контрольній групах. Дані двох повторностей поєднували і визначали середній показник групи.

Критеріями «позитивного» результату були статистично вірогідні (близькі до «позитивного» контролю) показники пошкодження ДНК або статистично вірогідний відтворений ефект.

2.3.8.2 Анафазний метод підрахунку хромосомних аберацій у клітинах апікальної меристеми *Allium cepa* [487, 488]. Оцінку мутагенної дії проводять на тест-системах, які є високочутливими до небезпечної дії різних хімічних речовин та фізичних факторів. Метод «*Allium test*» не потребує знання каріотипу і є надзвичайно простим, дешевим, високоінформативним та високочутливим. «*Allium test*» рекомендований експертами ВООЗ як стандарт при цитогенетичному моніторингу навколишнього середовища та є альтернативою тестам *in vivo* [488, 489].

Протокол проведення визначення маркера мутагенності за анафазним методом підрахунку хромосомних аберацій у клітинах апікальної меристеми *Allium cepa*. У якості тест-об'єкту використовували

насінини цибулі *Allium cepa*, які зберігали за кімнатних умов один рік за сезонних коливань вологості та температури; пророщували у чашках Петрі на вологому фільтрувальному папері за температури 24 °С в термостаті до розміру корінця 1 см в довжину.

Кожна дослідна та контрольна група складалась із 5 рослин. У дослідні чашки Петрі додавали одноразово по 0,4 мл колоїдних дисперсій дослідних наночастинок металів, а в контрольні чашки – аналогічний об'єм дистильованої води. Впродовж проростання корінців здійснювали зволоження фільтрувального паперу 0,4 мл дистильованої води як в контрольних, так і в дослідних зразках.

Фіксацію корінців здійснювали у фіксаторі Кларка («оцтовий алкоголь») протягом 2 год, після чого триразово відмивали 80⁰ етиловим спиртом до зникнення запаху оцту.

Фарбування корінців здійснювали ацетокарміном протягом 20–40 хв за триразового підігріву та температури 100±1 °С; після закінчення фарбування корінці промивали 45 % оцтовою кислотою, розміщували на предметному склі в краплі 45 % розчину оцтової кислоти, накривали покривним склом і рівномірним тиском розчавлювали корінець до моношару.

Облік результатів. У подальшому аналізували препарат під світловим мікроскопом і підраховували кількість нормальних та аберантних ана-телофаз, розраховували відсоток аберантних клітин.

Встановивши загальну кількість проглянутих клітин та клітин з абераціями, кількість аберантних клітин виражали у відсотках та розраховували за формулою (2.3):

$$X = \frac{A}{B \cdot 100}, \quad (2.3)$$

де: X – кількість аберантних клітин, %;

A – кількість клітин з абераціями у ана-телофазі, %;

B – загальна кількість проглянутих клітин.

Мітотичний індекс виражали у відсотках та розраховували за формулою (2.4):

$$I_{\text{MIT}} = \frac{\text{П} + \text{М} + \text{А} + \text{Т}}{\text{І} + \text{П} + \text{М} + \text{А} + \text{Т}} \cdot 100, \quad (2.4)$$

де: I_{MIT} – мітотичний індекс, %;

І – кількість клітин у інтерфазі,

П – кількість клітин у профазі,

М – кількість клітин у метафазі,

А – кількість клітин у анафазі,

Т – кількість клітин у телофазі.

У кожному препараті підрахунку підлягало 200 клітин.

Для одержання статистично вірогідних результатів визначення зазначених параметрів проводили у 5-кратній повторності з трьома паралельними пробами зразків.

2.3.8.3 Визначення інтенсивності приросту біомаси прокариотичних клітин. Інтенсивність приросту біомаси клітин оцінювали за рівнем накопичення їх біомаси в динаміці 25 год (*Escherichia* spp., *Salmonella* spp. і *Pasteurella* spp.) та 80 год (*Mycoplasma* spp.) відповідно через певні проміжки часу за оптичною густиною суспензії мікробних клітин, яку реєстрували у відповідний термін спектрофотометричним методом (SHIMADZU UV – 1800, Японія) за довжини хвиль 590–640 нм.

Результати досліджень у подальшому виражали у КУО/мл за калібрувальними графіками.

Як холосту пробу вважали зразок відповідного до певного виду бактерій поживного середовища.

2.3.8.4 Визначення інтенсивності питомої дихальної активності прокариотичних клітин. Визначення інтенсивності дихальної активності (питома ДА) бактеріальних клітин проводили шляхом вимірювання кількості ендогенного O_2 у середовищі інкубації за допомогою O_2 -чутливого електроду типу Кларка (МО 128, Mettler Toledo, Швейцарія) у динаміці 5 хв. З метою

одержання високого рівня дихальної відповіді інкубацію бактеріальних клітин проводили у фосфатному буфері ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.8) і Трис-НСІ–буферних системах.

Умови аналізу: об'єм вимірювальної кювети – 10 мл, концентрація клітин – 0,3–1,0 г висушених кл/л, температура – 28 ± 1 °С. Середовище вимірювання: 5 мМ Трис-НСІ буфер, pH 7.8.

Вимірювальну кювету витримували в ультратермостаті («МТА 657», Німеччина) з магнітним струшувачем.

Для аналізу питомої ДА бактеріальні клітини дослідних штамів осаджували шляхом центрифугування при 5000 g впродовж 5 хв; у подальшому ресуспендували у 5 мМ Трис-НСІ буфері, pH 7.8 та повторно переосаджували за аналогічним регламентом. До осаду додавали невелику кількість Трис-НСІ буферу та визначали концентрацію клітин у суспензії спектрофотометричним методом за довжини хвилі 540 нм (SHIMADZU UV – 1800, Японія) і перераховували на суху біомасу (мг/мл) за калібрувальним графіком.

Максимальну швидкість зниження концентрації O_2 в середовищі інкубації, приведену до одиниці біомаси, вимірювали за допомогою O_2 -чутливого електроду та визначали за формулою (2.5):

$$\text{ДА} = \frac{\Delta C_{\text{O}_2}}{\Delta t \cdot m}, \quad (2.5)$$

де: ДА – питома дихальна активність, $\frac{\text{мгO}_2}{\text{дм}^3 \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}}$;

ΔC – зміна концентрації O_2 в середовищі інкубації, мг O_2 /л;

Δt – проміжок часу, хв;

m – маса використаних мікробних клітин, мг.

Як холосту пробу вважали зразок відповідного до певного виду бактерій поживного середовища.

2.3.8.5 Визначення питомої H^+ -АТР–азної активності (К.Ф. 3.6.3.6) мембранної фракції прокаріотичних клітин. Величину питомої H^+ -АТР–азної активності у дослідних та контрольних пробах реєстрували за

швидкістю накопичення неорганічного фосфату (P_i) в результаті гідролізу АТР у середовищі інкубації (10 мМ Трис-НСl, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ АТР, рН 7.5) впродовж 10 хв; за довжини хвилі 680 нм та виражали у $\frac{\text{нмоль}P_i}{\text{хв} \cdot \text{мгбілка}}$ або у відносних одиницях (A/A_0 , %), як описано в роботі [490].

2.3.8.6 Визначення Na^+ , K^+ -АТР-азної активності (К.Ф.3.6.1.3) мембранної фракції еукаріотичних клітин. Величину питомої Na^+ , K^+ -АТР-азної активності у дослідних та контрольних пробах реєстрували за швидкістю накопичення P_i в середовищі інкубації (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ АТР, рН 7.5) впродовж 10 хв; за довжини хвилі 680 нм та виражали у $\frac{\text{нмоль}P_i}{\text{хв} \cdot \text{мгбілка}}$ або у відносних одиницях (A/A_0 , %), як описано в роботі [490].

Концентрацію P_i в середовищі визначали за методом Фіске–Суббароу [491] після затримки реакції розчином ТХО. Кількість мембранного білка – 15–20 мкг. Тривалість інкубації – 10 хв. Реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти СМФ і зупиняли додаванням 1 мл 10 % розчину ТХО.

Розрахунок активності АТР-ази проводили за формулою (2.6):

$$A = \frac{D_p \cdot 4 \cdot \text{Ctg} \alpha \cdot 1000}{B \cdot t}, \quad (2.6)$$

де: A – активність АТР-ази;

B – кількість білка в пробі, мкг;

t – час інкубації, що складає 10 хв;

1000 – перерахунок мкг у мг;

D_p – оптична густина проби, яка відповідає P_i за калібрувальною кривою;

$\text{Ctg} \alpha$ – Ctg кута нахилу калібрувальної кривої, який дорівнює 1,8;

4 – коефіцієнт перерахунку (враховують кювету при побудові калібрувальної кривої (0,25–1,00 см)).

Показники питомої АТР-азної активності виражали у відсотках (%) A/A_0 , де: A_0 – величина питомої АТР-азної активності інтактних СМФ

бактеріальних клітин, A – величина питомої АТР-азної активності за впливу NРМе мембранних фракцій.

Дослідна проба містила суміш NРМе і суспензію СМФ бактеріальних клітин, яку піддавали інкубації впродовж 3 хв. Кінцева концентрація NРМе складала 0,0125–0,2000 мкг металу/мкг білка. У контрольну пробу замість NРМе додавали 10 мМ Трис-НСІ буфер.

У всіх дослідах контролем на неферментативний гідроліз АТР слугувало середовище інкубації за відсутності в ньому препаратів СМФ. Контролем на ендogenous P_i у препаратах СМФ було середовище, що містить лише СМФ у водному розчині.

Облік результатів. Токсичними вважали зразки NРМе у випадку інгібіції мембранної АТР-азної активності у дослідній пробі за взаємодії з такими не менш, ніж на 20 % у порівнянні з її рівнем у контрольній пробі.

2.3.8.7 Визначення лактатдегідрогеназної активності (К.Ф. 1.1.1.27) цитозольної фракції евкаріотичних клітин. Активність лактатдегідрогеназної активності (ЛДГ-ази) у дослідній та контрольній пробах визначали за швидкістю окиснення NADH/ H^+ спектрофотометричним методом (SHIMADZU UV – 1800, Японія) за довжини хвилі 340 нм, як описано у роботі [490]. Середовище інкубації (загальний об'єм проби – 3,15 мл) містить: 50 мМ К-фосфатний буфер, 0,3 мМ Na-пірувату та 9 мМ NADH, рН 7.5. Реакцію ініціювали внесенням до середовища інкубації 100 мкл дослідної проби цитозольної фракції. Реєстрацію показників проводили кожні 30 сек впродовж 3–5 хв, розраховуючи середнє значення зміни оптичної густини проби впродовж 1 хв.

Активність ЛДГ-ази виражали у мкмоль NADH/хв•мг білка та розраховували за формулою (2.7):

$$A = \frac{\Delta D \cdot V}{6,2 \cdot 2 \cdot a}, \quad (2.7)$$

де: ΔD – середнє значення зміни оптичної густини проби за довжини хвилі 340 нм за 1 хв;

V – кінцевий об'єм проби, що дорівнює 3,15 мл;

6,22 – коефіцієнт мікромолярної оптичної густини відновленої форми піридинових нуклеотидів за довжини хвилі 340 нм;

a – кількість білка в пробі, визначеного за методом Лоурі, мг.

Результати виражали у відносних одиницях A/A_0 , порівнюючи абсолютні величини ферментативної активності у дослідній і контрольній пробах, де: A_0 – величина ЛДГ-азної активності цитозольної фракції у контрольній пробі; A – величина ЛДГ-азної активності цитозольної фракції за взаємодії з NPMe (дослідна проба).

Дослідна проба містила суміш NPMe у кінцевій концентрації 1,0 мкг/мл за металом і суспензію цитозольної фракції тест-клітин (у кінцевій кількості цитозольного білку 150–200 мкг/мл), яку піддавали преінкубації впродовж 3 хв. У контрольну пробу замість NPMe додавали ФСБ.

Облік результатів. Токсичними вважали зразки NPMe у випадку стимуляції активності цитозольної ЛДГ-ази дослідної проби за взаємодії з такими не менш, ніж на 50 % у порівнянні з її рівнем у контрольній пробі.

2.3.8.8 Визначення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів у мембранних фракціях прокаріотичних клітин. Інтенсивність процесів ПОЛ досліджували за рівнем утворення його продуктів: первинних – дієнових кон'югатів (ДК) і кінцевих – малонового діальдегіду (МДА) у препаратах СМФ після екстракції у суміші гептан–ізопропанол (1:1) за методикою Гаврилова В. Б. і Мішкорудної М. І. [492]. Спектр поглинання кон'югованих дієнових структур і МДА реєстрували спектрофотометричним методом (SHIMADZU UV – 1800, Японія) за довжини хвиль 233 нм і 247 нм відповідно.

Дослідна проба містила суміш NPMe у кінцевій концентрації 1,0 мкг/мл за металом і суспензії СМФ тест-клітин (у кінцевій кількості мембранного білку 150–200 мкг/мл), яку піддавали преінкубації впродовж 3 хв. У контрольну пробу замість NPMe додавали 20 мМ Трис-НСІ буфер.

Облік результатів. Розрахунок рівня ДК у СМФ бактеріальних клітин проводили, приймаючи за молярний коефіцієнт рівним $2,2 \cdot 10^5$ мкмоль, та виражали у мкмоль/л. Значення рівня МДА виражали у одиницях питомого поглинання у 1,0 мл.

2.3.8.9 Визначення інтенсивності процесів окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях прокариотичних клітин. Інтенсивність процесів ОМБ визначали за рівнем утворення карбонільних альдегідо– і кетопохідних нейтрального (НХ) і основного характеру (ОХ) у СМФ за спектрофотометричним методом (SHIMADZU UV – 1800, Японія) Арчакова О.І. і Михососєва І.М. [493], який ґрунтується на здатності радикальних залишків окиснених аліфатичних амінокислот утворювати альдегідні й кетонні групи, та утворенні 2,4-динітрофенілгідразонів. Карбонільні похідні НХ і ОХ мають спектр поглинання за довжини хвилі 370 нм та 430 нм відповідно.

Дослідна проба містила суміш NРМе у кінцевій концентрації 1,0 мкг/мл за металом і суспензії СМФ тест-клітин (у кінцевій кількості мембранного білку 150–200 мкг/мл), яку піддавали преінкубації впродовж 3 хв. У контрольну пробу замість NРМе додавали 20 мМ Трис-НСІ буфер.

Облік результатів. Розрахунок інтенсивності утворення альдегідопохідних НХ і кетопохідних ОХ у СМФ бактеріальних клітин проводили, приймаючи за молярний коефіцієнт оптичної густини ДНФГідразонів рівним $2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, та виражали у ммоль/г білка за 1 год.

2.3.8.10 Визначення активності каталази (К.Ф. 1.11.1.6) у мембранних фракціях прокариотичних клітин. Активність каталази визначали спектрофотометричним методом (SHIMADZU UV – 1800, Японія) за використання H_2O_2 , який здатний утворювати з амонію молібдатом стійкий забарвлений комплекс із максимумом поглинання за довжини хвилі 410 нм, як описано в методиці [494]. Визначення активності каталази проводили у лізатах препаратів СМФ у середовищі, яке містить 0,04412 N

розчин H_2O_2 , 0,01 N розчин KH_2PO_4 , 0,1 M Трис- HCl буфер (рН 7.4), 4,5 % розчин амонію молібденовокислого. Температура – 37 ± 1 °C.

Дослідна проба містила суміш NPMe у кінцевій концентрації 1,0 мкг/мл за металом і суспензії СМФ тест-клітин (у кінцевій кількості мембранного білку 150–200 мкг/мл), яку піддавали преінкубації впродовж 3 хв. У контрольну пробу замість NPMe додавали 20 мМ Трис- HCl буфер.

Облік результатів. Розрахунок проводили, приймаючи коефіцієнт оптичної густини H_2O_2 рівним $22,2 \cdot 10^6$ та виражали у мкмоль H_2O_2 /л за 1 хв.

2.3.8.11 Визначення загальної антиокиснювальної активності (загальна АОА) у мембранних фракціях прокаріотичних клітин. Рівень загальної АОА визначали за сумарною здатністю власних антиоксидантів гальмувати накопичення ТБК-активних продуктів пероксидації за інкубації біологічного об'єкту з суспензією жовткових ліпопротеїнів (ЖЛП), як описано в роботі Клебанова Г. І. [495]. Метод передбачає експериментальне створення модельної системи – суспензію ЖЛП курячих яєць, яка є стабільною у фосфатному буфері, рН 7.45 впродовж 14 діб за температури мінус 20 ± 1 °C та піддається швидкому окиснюванню за індукції 25 мМ розчином заліза сірчаноокислого у 0,002 N розчині HCl . Спектр поглинання забарвлено внаслідок взаємодії з 2-ТБК комплексу ТБК-активних продуктів реєстрували спектрофотометричним методом (SHIMADZU UV – 1800, Японія) за довжини хвилі 535 нм.

Дослідна проба містила суміш NPMe у кінцевій концентрації 1,0 мкг/мл за металом і суспензії СМФ тест-клітин (у кінцевій кількості мембранного білку 150–200 мкг/мл), яку піддавали преінкубації впродовж 3 хв. У контрольну пробу замість NPMe додавали 20 мМ Трис- HCl буфер.

Облік результатів. Рівень загальної АОА мембранних фракцій бактеріальних клітин виражали у % інгібіції утворення ТБК-активних продуктів пероксидації.

2.3.8.12 У плазмі крові щурів визначали рівень основних метаболітів: загального білка, альбумінів, загальних глобулінів, сечовини,

креатиніну, глюкози, а також **активність індикаторних ензимів** – аспартатамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2), лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1) і гамаглумілтранспептидази (ГГТП, КФ 2.3.2.2) спектрофотометрично (SHIMADZU UV – 1800, Японія) за загальноприйнятими методами [496, 498] з використанням тест-наборів реактивів виробництва CORMAY (Польща), HUMAN (Німеччина) та НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна) згідно з Інструкції до наборів реактивів відповідно.

У плазмі крові щурів також визначали **інтенсивність процесів ПОЛ** за рівнем утворення його продуктів – ДК і МДА у гептан–ізопропанольних екстрактах за методикою Гаврилова В.Б. і Мішкорудної М.І. [492], **інтенсивність процесів ОМБ** – за рівнем утворення його похідних ОХ і НХ за Арчаковим О.І. і Михосоевим І.М. [493], **рівень загальної АОА**, як описано в роботі Клебанова Г.І. [495] та **активність каталази** (К.Ф. 1.11.1.6) з використанням H_2O_2 [494].

Концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси у плазмі крові щурів визначали за методом Гриневича Ю.А. [496] шляхом осадження білкових комплексів антиген-антитіло ПЕГ-6000, **рівень серомукоїдів (Sm)** – спектрофотометричним методом за різницею оптичної густини за довжини хвиль 260 нм та 280 нм, як описано [497].

2.3.8.13 Методи гематологічних досліджень. У периферійній крові щурів визначали **рівень загального гемоглобіну** – геміглобінціанідним методом з ацетонціангідрином, **кількість еритроцитів** – спектрофотометричним методом за інкубацією у 2,8 % розчині NaCl та **кількість лейкоцитів** – за підрахуванням клітин у лічильній камері Горяєва [498].

2.3.8.14 Клінічні методи досліджень. Спостереження за дослідними тваринами (загальний стан, апетит тощо) проводили згідно з [499].

Патологоанатомічні дослідження проводили за стандартними методиками [500]. Під час патолого-анатомічного розтину були вивчені та зафіксовані патологоанатомічні зміни, які можуть виникнути у динаміці впливу зразків сумішей металів у нано- та макродисперсних формах.

2.3.8.15 Метод рентгенофлуоресцентного аналізу. Вміст Купруму, Феруму та Мангану в органах і тканинах щурів визначали за методом рентгенофлуоресцентного аналізу, як описано у методичних рекомендаціях [242]. Метод рентгенофлуоресцентного аналізу ґрунтується на використанні рентгенівської флуоресценції елементів з подальшим аналізом спектрів на приладі Спектроскан – МАКС (Російська Федерація). За опромінення зразка рентгенівськими променями біологічний об'єкт, який заздалегідь підданий сухій мінералізації, починає випромінювати (флуоресціювати) в рентгенівському діапазоні. Спектр цієї вторинної флуоресценції адекватно відображає елементний склад аналізованого зразка.

Органи та тканини для дослідження відбирали у тварин відповідно до схем дослідів.

2.3.8.16 Мікроскопічні методи. Візуалізацію контактної взаємодії дослідних NPMe з клітинами виконували за методами трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1230, JEOL, Японія).

Для проведення мікроскопічних досліджень бактеріальні клітини добової культури осаджували центрифугуванням впродовж 5 хв при 6000 об/хв, ресуспендували у фізіологічному розчині NaCl до концентрації $10^8 - 10^9$ КУО/мл та інкубували впродовж 10–30 хв з NPAu і NPAg, кінцева концентрація яких у контактній суміші складала 6,4 мкг/мл і 28,8 мкг/мл за металом відповідно.

Для проведення трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) аліквоту отриманої суспензії наносили на підготовлені бленди, висушували за температури 23 ± 1 °C та проводили електронну мікроскопію отриманих препаратів.

2.3.8.17 Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою пакета прикладних програм Microsoft Excel 2003 (for Windows XP). Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента.

Для одержання статистично вірогідних результатів під час виконання досліджень на культурах клітин та субклітинних фракціях, визначення зазначених параметрів проводили у 5-кратній повторності з 3 паралельними пробами зразків.

2.4 Хімічні реагенти

У роботі були використані хімічні реагенти та поживні середовища виробництва «Sigma», США; «Gibco», США; «Reanal», Угорщина; «Serva», Німеччина; «ННПЦ ГИП», Росія; КНР. Інші використані в роботі реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації «ч.д.а.» та «х.ч.».

При визначенні клініко-біохімічних показників у крові дослідних тварин були використані стандартні тест-набори реактивів для визначення загального білка, альбумінів, гемоглобіну, сечовини, креатиніну, глюкози та активності АсАТ, АлАТ, ЛФ та ГГТП – виробництва фірм CORMAY (Польща), HUMAN (Німеччина) і НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Розчини для препаративних та аналітичних робіт готували на дистильованій та бідистильованій воді. Препарати наночастинок металів готували на деіонізованій воді з характеристикою 0,12 μS .

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Вивчення цитотоксичності та біосумісності наночастинок металів у розмірно-концентраційному діапазоні на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів

З метою визначення цитотоксичної дії та біосумісності наночастинок металів на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів були використані зразки колоїдних дисперсій NP_{Au}, NP_{Ag}, NP_{Cu}, NP_{Co}[Fe(CN)₆], NP_{Co}, NP_{Fe} і NP_{Zn} у вихідних концентраціях та діапазоні розведення.

Тестування дослідних зразків NP_{Me} проводили на моделі еукаріотичних організмів та їх субклітинних фракцій за системними біомаркерами – генотоксичність, мутагенність та цитотоксичність (за ензиматичною активністю субклітинних фракцій).

Тестування біохімічних параметрів токсичної дії та біосумісності NP_{Au} і NP_{Ag} проводили за їх впливу на прокаріотичні клітини *Esherichia* spp. і *Salmonella* spp. та їх мембранні фракції, суміші NP_{Me} (Ag, Fe, Cu, MnO₂) – на організм білих щурів у гострому та хронічному експериментах.

3.1.1 Цитотоксикологічна характеристика дії наночастинок металів на клітини еукаріотичних організмів.

3.1.1.1 Вивчення генотоксичної дії наночастинок металів у розмірно-концентраційному діапазоні на моделі тест-клітин еукаріотичних організмів. За останні роки розроблений значний арсенал методів, які дозволяють реєструвати пошкодження ДНК. Проте ці методи не мають достатню чутливість і специфічність, яка так необхідна для моніторингу широкого спектру первинних пошкоджень ДНК. Основна перевага методу «ДНК-комет» полягає у можливості визначення

пошкоджень на рівні одиничних ізольованих еукаріотичних клітин різного походження, а також при оцінюванні інтегральної цілісності геному.

Тестування генотоксичної дії NPMe проводили у діапазоні концентрацій: NPAg – 27,8 мкг/мл і 0,28 мкг/мл; NPCo – 664,0; 124,0 і 0,12 мкг/мл; NPCo[Fe(CN)₆] – 830,0; 155,0 і 0,16 мкг/мл; NPCu – 823,0; 226,0 і 0,22 мкг/мл; NPMnO₂ – 928,0; 433,0; 238,0 і 0,24 мкг/мл; NPZn – 802,0; 150,0 і 0,25 мкг/мл; NPFe – 1061,0; 255,0 і 0,25 мкг/мл та NPAu – 11,06; 14,00 і 38,60 мкг/мл за металом відповідно.

Результати дослідження генотоксичного впливу дослідних зразків NPMe на ізольовані клітини лінії CHO-K1 показали, що величина ДНК-руйнуючої активності за дії NPAu розміру ~10 нм у концентраціях 11,06 мкг/мл і $11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл становила у середньому 15,0 % і 11,0 % ушкодження ДНК за показником «% ДНК у хвості», що за значенням було значно більшим, ніж для «негативного» контролю (1,0 %) та наближалось до величини «позитивного» контролю (19,0 %) (рис. 3.1, а, б).

Подібну картину реєстрували й для генетичного апарату клітин CHO-K1 за взаємодії з NPAu розміру ~20 нм (рис. 3.1, в, г). Ефект прояву генотоксичної дії зберігався для NPAu в обох вивчених концентраціях (11,06 мкг/мл і $11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл), а значення показника «% ДНК в хвості» складали 15,2 % і 9,5 % відповідно.

Отримані дані свідчать про те, що NPAu розміру ~10 нм та ~20 нм у визначених концентраціях справляють генотоксичну дію по відношенню до генетичного апарату еукаріотичних клітин лінії CHO-K1.

Слід зазначити, що за зниження концентрації NPAu в середовищі інкубації під час контактної дії з клітинами CHO-K1, спостерігали тенденцію до зниження величини показника «% ДНК в хвості» (рис. 3.1, а і б, в і г).

Результати досліджень, наведені на рисунку 3.1 (д, ж, к, л), ілюструють відсутність прояву генотоксичного впливу NPAu розміру ~30 нм та ~45 нм на клітини CHO-K1, а величина показника «% ДНК в хвості» знаходилась у

межах 1,0–1,5 % відповідно, що майже наближалось до значень «негативного» контролю.

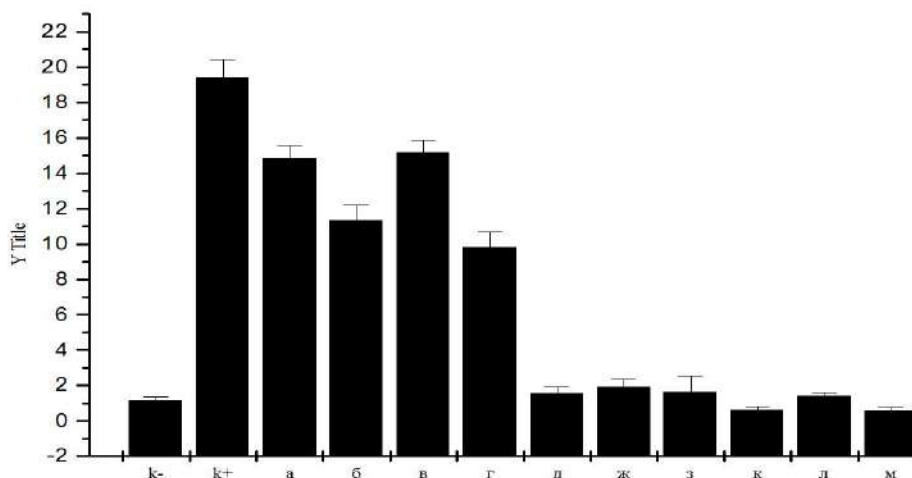


Рис. 3.1 Величина показника «% ДНК у хвості» за контактної взаємодії NPAu у розмірно-концентраційному діапазоні з ізольованими клітинами лінії CHO-K1:

K- – «негативний» контроль (клітини лінії CHO-K1, не оброблені NPAu);

K+ – «позитивний» контроль (клітини лінії CHO-K1, оброблені N-нітрозометилсечовиною);

клітини лінії CHO-K1, оброблені NPAu у розмірно-концентраційному діапазоні:

a – ~10 нм (11,06 мкг/мл); б – ~10 нм ($11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл);

в – ~20 нм (11,06 мкг/мл); г – ~20 нм ($11,06 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл);

д – ~30 нм (14,0 мкг/мл); ж – ~30 нм ($14,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); з – ~30 нм (14,0 мкг/мл) в системі S9;

к – ~45 нм (38,6 мкг/мл); л – ~45 нм ($38,6 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл); м – ~45 нм (38,6 мкг/мл) в системі S9.

Відомо [483], що метаболіти, які утворюються в живому організмі, як продукти біотрансформації потенційних генотоксикантів, можуть самі виявляти генотоксичні властивості. Тому, при відтворенні нами методу «ДНК-комет» з метою тестування генотоксичності дослідних зразків NPMe використовували систему метаболічної активації S9.

Так, встановлено (рис. 3.1, з, м), що значення показника ушкодження ДНК за дії NPAu розміру ~30 нм та ~45 нм на ізольовані клітини CHO-K1 у присутності фракції S9 знаходились майже на рівні «негативного» контролю (1,6 та 0,6 % відповідно проти 1,0 %).

Отже, отримані результати свідчать про те, що NPАu розміру ~ 30 нм і ~ 45 нм за використання системи метаболічної активації також не справляли генотоксичного впливу.

Дані рисунку 3.2 демонструють результати досліджень генотоксичних властивостей дослідних зразків NPАg середнього розміру ~ 30 нм щодо ізольованих клітин культури лінії CHO-K1.

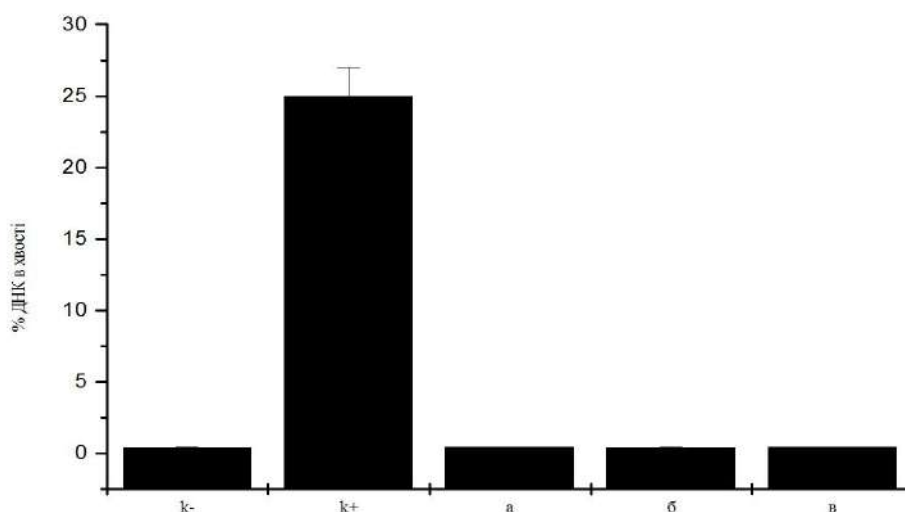


Рис. 3.2 Величина показника «% ДНК у хвості» за контактної взаємодії NPАg у розмірно-концентраційному діапазоні з ізольованими клітинами лінії CHO-K1:

К- – «негативний» контроль (клітини лінії CHO-K1, не оброблені NPАg);
 К+ – «позитивний» контроль (клітини лінії CHO-K1, оброблені N – нітрозометилсечовиною);
 клітини лінії CHO-K1, оброблені NPАg розміру ~ 30 нм у концентраційному діапазоні:
 а – $86,0$ мкг/мл; б – $(86,0 \cdot 10^{-5})$ мкг/мл; в – $86,0$ мкг/мл у системі S9.

Так, встановлено (рис. 3.2, а, б), що ДНК-руйнуюча активність NPАg у концентрації $86,0$ мкг/мл і $86,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл за показником «% ДНК в хвості» становила близько $0,4\%$ і знаходилась на рівні «негативного» контролю проти значень у «позитивному» контролі ($0,5$ проти $25,0\%$).

Тестування дослідного зразка NPАg розміру ~ 30 нм у системі метаболічної активації, у присутності фракції S9, також показало відсутність прояву генотоксичної дії дослідних наночастинок такого розміру в максимальній концентрації $86,0$ мкг/мл за металом (рис. 3.2, в).

Результати досліджень потенційної генотоксичної дії дослідних зразків NPCo та $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ свідчать про наявність такої властивості у всьому вивченому концентраційному діапазоні (664,00; 124,00; 0,12 мкг/мл та 830,00; 155,00; 0,16 мкг/мл за металом відповідно) (табл. 3.1). Значення індексу ДНК-комет, який характеризує рівень пошкоджень генетичного апарату еукаріотичних тест-клітин, були близькими до таких у «позитивному» контролі. На рисунку 3.3 (А, Б) проілюстровано утворення характерних для таких пошкоджень ДНК-комет з вираженим моментом «хвоста».

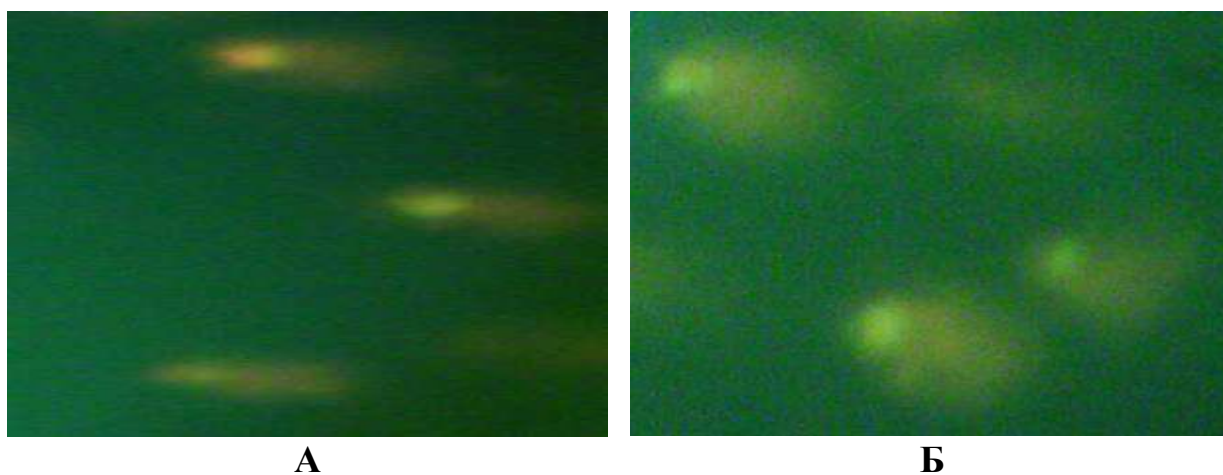


Рис. 3.3 Електрофореграма апоптичних ДНК-комет з моментом «хвоста» клітин лінії CHO-K1 за дії NPCo (А) та $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Б) (дані флуоресцентної мікроскопії; «ЛЮМАМ Р8», Росія; збуджуючий фільтр 490 нм, дихроїчне дзеркало 510, відтинаючий фільтр 530 нм, величина збільшення \times (200-400)).

За методом флуоресцентної мікроскопії при дослідженні препаратів ізольованих тест-клітин CHO-K1 , оброблених NPCo та $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, фіксували наявність первинних ДНК-пошкоджень.

Дослідження можливої генотоксичності NPCu в концентраціях 226,00 мкг/мл і 0,22 мкг/мл за металом показало її відсутність у порівнянні з «позитивним» контролем (табл. 3.1), а значення індексу ДНК-комет сягають таких у «негативному» контролі.

Рівень індексу ДНК-комет за умов впливу NPMе щодо генетичного апарату тест-клітин лінії CHO-K1 (M±m; n=5)

NPMе (робоча концентрація, мкг/мл за металом)	Індекс ДНК-комет ($I_{\text{ДНК}}$)
NPCo, вихідна концентрація 1991,6 мкг/мл за металом	
NPCo (664,00 мкг/мл)	3,80±0,20*
NPCo (124,00 мкг/мл)	3,40±0,20*
NPCo (0,12 мкг/мл)	3,10±0,20*
NPCo[Fe(CN)₆], вихідна концентрація 2489,0 мкг/мл за металом	
NPCo[Fe(CN) ₆] (830,00 мкг/мл)	3,40±0,20*
NPCo[Fe(CN) ₆] (155,00 мкг/мл)	3,00±0,20*
NPCo[Fe(CN) ₆] (0,16 мкг/мл)	3,00±0,20*
NPCu, вихідна концентрація 2678,6 мкг/мл за металом	
NPCu (823,00 мкг/мл)	0,30±0,02*
NPCu (226,00 мкг/мл)	0,10±0,02
NPCu (0,22 мкг/мл)	0,10±0,02
NPZn, вихідна концентрація 2407,0 мкг/мл за металом	
NPZn (802,00 мкг/мл)	3,90±0,20*
NPZn (150,00 мкг/мл)	3,80±0,20*
NPZn (0,25 мкг/мл)	3,10±0,20*
NPMnO₂, вихідна концентрація 2785,0 мкг/мл за металом	
NPMnO ₂ (928,00 мкг/мл)	0,03±0,01
NPMnO ₂ (433,00 мкг/мл)	0,02±0,01
NPMnO ₂ (238,00 мкг/мл)	0,02±0,01
NPMnO ₂ (0,24 мкг/мл)	0,02±0,01
NPFe, вихідна концентрація 3174,0 мкг/мл за металом	
NPFe (1061,00 мкг/мл)	0,010±0,001
NPFe (255,00 мкг/мл)	0,010±0,001
NPFe (0,25 мкг/мл)	0,010±0,001
NPAg, вихідна концентрація 86,4 мкг/мл за металом	
NPAg (27,80 мкг/мл)	0,010±0,001
NPAg (0,28 мкг/мл)	0,010±0,001
Контроль	
«Негативний» контроль (клітини CHO-K1, не оброблені NPMе)	(0,010±0,001)-(0,100±0,001)
«Позитивний» контроль (клітини CHO-K1, оброблені N – нітрозометилсечовиною)	3,90±0,10

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у «негативному» контролі.

Так, в препаратах еукаріотичних клітин лінії CHO-K1, оброблених NPCu, не реєстрували первинних ДНК-пошкоджень, що відображено на рисунку 3.4, А.

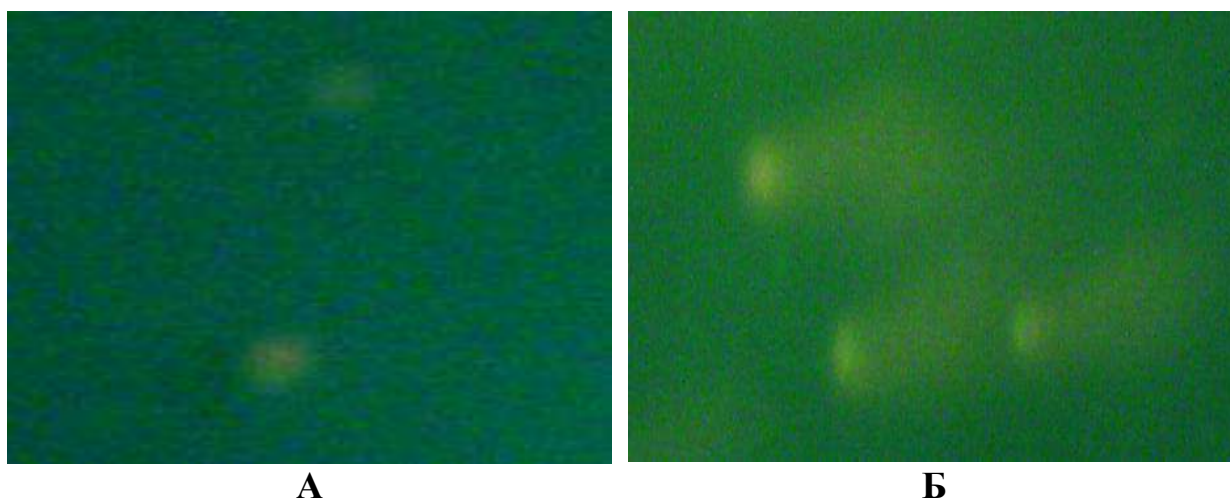


Рис. 3.4 Електрофореграма ДНК-комет клітин CHO-K1 за дії NPCu (А) у концентрації 226,00 мкг/мл за металом та апоптичних ДНК-комет з моментом «хвоста» за дії NPZn (Б) (дані флуоресцентної мікроскопії; «ЛЮМАМ Р8», Росія; збуджуючий фільтр 490 нм, дихроїчне дзеркало 510, відтинаючий фільтр 530 нм, величина збільшення \times (200-400)).

Але, за контактної взаємодії NPCu у концентрації 823,00 мкг/мл за металом, реєстрували утворення ДНК-пошкоджень тест-клітин CHO-K1, значення індексу ДНК-комет складало $0,30 \pm 0,02$ проти $0,100 \pm 0,001$ у «негативному» та $3,90 \pm 0,10$ – у «позитивному» контролі відповідно.

Дослідження генотоксичності NPZn у всьому вивченому концентраційному діапазоні показало наявність первинних ДНК-пошкоджень та утворення апоптичних ДНК-комет у препаратах тест-клітин CHO-K1, що зображено на рисунку 3.4, Б.

Значення індексу ДНК-комет за контактної взаємодії NPZn з тест-клітинами CHO-K1 знаходились у межах таких для «позитивного» контролю та дорівнювали у середньому $3,60 \pm 0,27 I_{\text{ДНК}}$ (табл. 3.1).

Дослідження можливої генотоксичної дії NPFe, NPMnO₂ та NPAg у вихідних концентраціях показало відсутність її прояву за відсутністю

утворення «хвостів» апоптичних ДНК-комет, що проілюстровано на рисунку 3.5 (А, Б, В) відповідно.

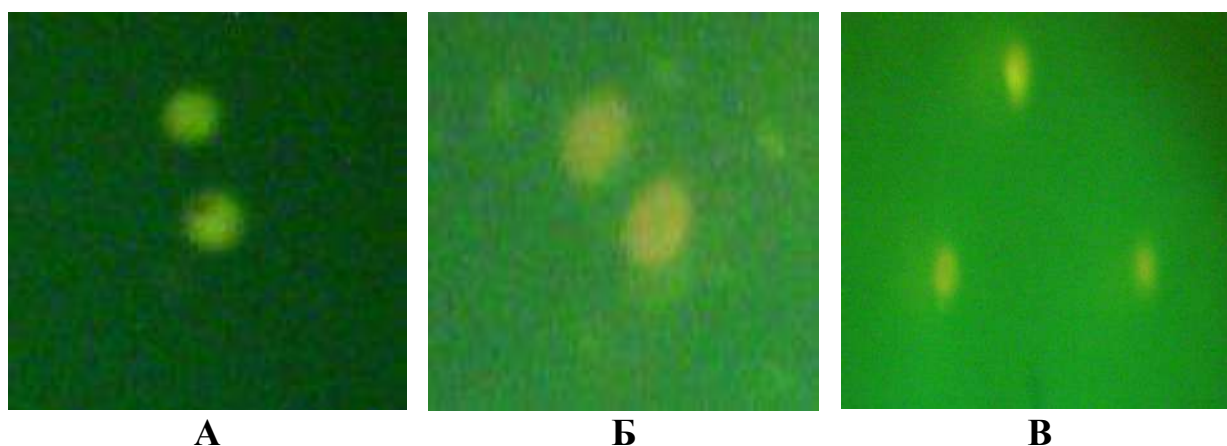


Рис. 3.5 Електрофореграма ДНК-комет клітин лінії СНО-К1 за дії **NPFe** (А), **NPMnO₂** (Б) і **NPAg** (В) (дані флуоресцентної мікроскопії; «ЛЮМАМ Р8», Росія; збуджуючий фільтр 490 нм, дихроїчне дзеркало 510, відтинаючий фільтр 530 нм, величина збільшення \times (200-400)).

Значення показника індексу ДНК-комет за контактної взаємодії **NPMnO₂**, **NPFe** та **NPAg** у діапазоні концентрацій з клітинами СНО-К1 знаходились у межах таких для «негативного» контролю ($0,01 - 0,03 I_{\text{днк}}$) (табл. 3.1).

За підсумком отриманих результатів щодо визначення прояву генотоксичних властивостей **NPMe** на моделі ізольованих клітин СНО-К1 слід зазначити, що дослідні зразки **NPAu** розміру ~ 30 нм і ~ 45 нм, **NPAg** – ~ 30 нм, **NPСu** – ~ 70 нм, **NPMnO₂** – ~ 50 нм та **NPFe** – ~ 100 нм у певному діапазоні концентрацій можна вважати безпечними щодо генетичного апарату еукаріотичних тест-клітин.

Дослідні зразки **NPCo[Fe(CN)₆]**, **NPCo** та **NPZn** проявляли генотоксичну дію щодо генетичного апарату тест-клітин СНО-К1 у діапазоні концентрацій $0,12 - 830,00$ мкг/мл за металом, тобто вони є небезпечними. Такі **NPMe** можуть бути промутагенами і впливати на генетичний апарат клітин з наступним утворенням ДНК-адуктів, алкільованої ДНК тощо.

З іншого боку, отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що метод «ДНК-комет» (лужного гель-електрофорезу), використаний у роботі, є придатним для визначення генотоксичних властивостей NPMe по відношенню до еукаріотичних клітин.

Результати впровадження методу «ДНК-комет» на моделі ізольованих еукаріотичних клітин при визначенні потенційної генотоксичності, як фактору ризику наночастинок органічної і неорганічної природи були систематизовані та увійшли до методичних рекомендацій (Додаток А) [501], які затверджено в установленому порядку.

Наукову новизну способу оцінки біобезпечності наноматеріалів за визначення їх генотоксичної дії було підтверджено і захищено патентом України на корисну модель (Додаток Б) [502].

3.1.1.2 Дослідження мутагенної дії наночастинок металів (NPCo, NPCo[Fe(CN)₆], NPZn) на моделі апікальної меристеми *Allium cepa*. До одних з найважливіших показників, які характеризують біобезпечність наноматеріалів, відноситься мутагенність. «*Allium – test*» рекомендований експертами ВООЗ як стандарт при цитогенетичному моніторингу навколишнього середовища та є альтернативним тестам *in vivo* [482 – 487], дозволяє реєструвати мутації типу делецій та транслокацій, які є свідченням потенційної цитогенетичної активності тестованих речовин.

Виходячи з одержаних результатів щодо прояву генотоксичної дії наночастинок NPCo[Fe(CN)₆], NPCo та NPZn на моделі тест-клітин СНО-К1, наступним етапом наших досліджень було вивчення можливих мутагенних властивостей таких NPMe.

Так, результати досліджень мітотичної активності клітин апікальної меристеми використаної рослинної тест-системи показали, що NPCo та NPZn значно сповільнювали мітотичні процеси в рослинній клітині.

Як свідчать дані, наведені в таблиці 3.2, при обробленні насінин дослідними зразками NPCo і NPCo[Fe(CN)₆] розміру ~100 нм у концентрації 1991,6 мкг/мл і 2489,0 мкг/мл за металом рівень показника мітотичного

індексу в клітинах *Allium cepa* становив 22,0 та 26,8 %, що у 2,9 та 2,4 разу ($P < 0,05$) є нижчим за контрольні значення цього показника.

Таблиця 3.2

**Мітотична активність клітин апікальної меристеми *Allium cepa*
за впливу дослідних зразків NPMe ($M \pm m$; $n=5$)**

Варіант досліду	Мітотичний індекс, %
Апікальна меристема інтактних клітин, які не було оброблено NPMe	
Контроль	64,0±1,0
Апікальна меристема клітин, які було оброблено NPMe	
NPCo	22,0±1,0*
NPCo[Fe(CN) ₆]	26,8±1,2*
NPZn	16,0±1,0*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника в контрольних зразках.

Зниження рівня мітотичної активності реєстрували й у випадку оброблення тест-клітин дослідним зразком NPZn розміру ~100 нм у концентрації 2407,0 мкг/мл за металом, що складало 4,6 рази ($P < 0,05$) відносно її контрольного рівня.

Як видно з таблиці 3.3, оброблення тест-клітин *Allium cepa* NPCo і NPCo[Fe(CN)₆] викликало появу аберантних клітин. Встановлено, що за дії NPCo і NPCo[Fe(CN)₆] відсоток аберантних клітин сягав 8,00±0,30 і 5,83±0,21 % відповідно, що перевищувало такі значення для контрольних зразків насінин у 5,0 та 3,9 разу ($P < 0,05$), що дає підстави стверджувати про мутагенну дію Кобальту в складі наночастинок обох видів щодо тест-клітин *Allium cepa*.

Оброблення тест-клітин *Allium cepa* NPZn викликало також появу аберантних клітин (табл. 3.3). Визначено, що за їх дії відсоток аберантних клітин складав 14,0 % і перевищував значення показника у контрольних зразків майже у 10,0 разів, що вказує на виражену мутагенну дію дослідних NPZn щодо тест-клітин *Allium cepa*.

**Кількість аберантних клітин у апікальній меристемі *Allium cepa*
за впливу дослідних зразків NPMe (M±m; n=5)**

Варіант досліджу	Загальна кількість клітин, %	Кількість клітин з мостами	Кількість клітин з фрагментами	Кількість аберантних клітин, %
Апікальна меристема інтактних клітин, які не було оброблено NPMe				
Контроль	200 (100 %)	2	1	1,50±0,01
Апікальна меристема клітин, які було оброблено NPMe				
NPCo	200 (100 %)	9	7	8,00±0,30*
NPCo[Fe(CN) ₆]	200 (100 %)	9	6	5,83±0,21*
NPZn	200 (100 %)	17	11	14,00±0,50*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника в контрольних зразках.

Таким чином, слід зробити висновок, що дослідні зразки NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] та NPZn у вихідних концентраціях справляли виражені мутагенні ефекти щодо апікальної меристеми *Allium cepa*, що узгоджується з визначеною генотоксичною дією цих NPMe.

Отримані результати за цим фрагментом досліджень з тестування безпечності колоїдних дисперсій дослідних зразків NPMe за маркерами генотоксичності та мутагенності у експериментах *in vitro*, зумовлюють відповідний підхід щодо доцільності використання NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] та NPZn у подальших експериментах *in vivo*.

3.1.1.3 Визначення рівня біохімічних маркерів цитотоксичності наночастинок металів на моделі субклітинних фракції евкаріотичних організмів. Евкаріотичні клітини мають більш високий рівень організації у порівнянні з прокаріотичними, що знаходить відображення в органельній спеціалізації метаболічних процесів [222, 353, 503].

За умов преінкубації впродовж 3 хв дослідних зразків NPMe у кінцевій концентрації 1 мкг/мл за металом з препаратами субклітинних фракцій лінії CHO-K1 і U937 за температури 37 ± 1 °C визначали величину мембранної Na⁺, K⁺-АТФ-азної та цитозольної ЛДГ-ази активності порівняно з ензиматичною активністю в інтактних клітин (контроль).

Так, результати досліджень, наведені у таблиці 3.4, свідчать, що під впливом дослідних зразків NP_{Ag}, NP_{Fe}, NP_{Cu} та NP_{MnO₂} вірогідного гальмування мембранної Na⁺, K⁺-АТР-азної активності відносно її значень у фракціях інтактних тест-клітин (контроль) відсутнє.

Таблиця 3.4

Рівень мембранної Na⁺, K⁺-АТР-азної та цитозольної ЛДГ-азної активності субклітинних фракцій СНО-К1 за умов впливу NPMe (M±m; n=5)

Варіант досліджу	Na ⁺ , K ⁺ -АТР-азна активність, ум.од.	ЛДГ-азна активність, ум.од.
Субклітинні фракції інтактних тест-клітин СНО-К1		
Контроль	1,300±0,030	0,970±0,020
Субклітинні фракції тест-клітин СНО-К1 за умов інкубації з NPMe		
NP _{Ag}	1,220±0,005	0,900±0,002
NP _{Fe}	1,120±0,007	1,140±0,006
NP _{Cu}	1,250±0,008	1,250±0,015
NP _{MnO₂}	1,310±0,025	1,080±0,004
NP _{Co}	1,010±0,008*	0,950±0,010
NP _{Co} [Fe(CN) ₆]	0,960±0,006*	1,075±0,030*
NP _{Zn}	1,160±0,036	0,990±0,040

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05 відносно значень такого показника в субклітинних фракціях інтактних тест-клітин (контроль).

Але під впливом NP_{Co} і NP_{Co}[Fe(CN)₆] в ізольованих мембранних фракціях клітин СНО-К1, навпаки, реєстрували вірогідне зниження Na⁺, K⁺-АТР-азної активності на 22,3 % та 26,1 % відповідно, а під впливом NP_{Zn} – лише тенденцію до зниження цієї активності, яке складало 10,8 % відносно її значень у контрольних зразках мембранних фракцій тест-клітин.

Внаслідок преінкубації ізольованих цитозольних фракцій тест-клітин СНО-К1 з дослідними зразками усіх NPMe не реєстрували вірогідних змін активності ЛДГ-ази відносно її значень в інтактних клітин (контроль) (табл. 3.4).

Вийняток складало збільшення рівня цитозольної ЛДГ-азної активності за впливу $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в середньому на 10,8 % ($P < 0,05$) відносно її значень у контрольних зразках тест-клітин.

Результати впливу NPAu на активність мембранної Na^+ , K^+ -АТФ-ази евкаріотичних тест-клітин U937 наведені на рисунку 3.6.

Встановлено, що NPMe розміру ~ 10 нм властиво інгібувати активність ензиму в середньому на 70 %, а розміру ~ 30 нм і ~ 45 нм – індукували в межах 20–40 % ($P < 0,05$) відповідно відносно рівня її активності інтактних клітин (контроль).

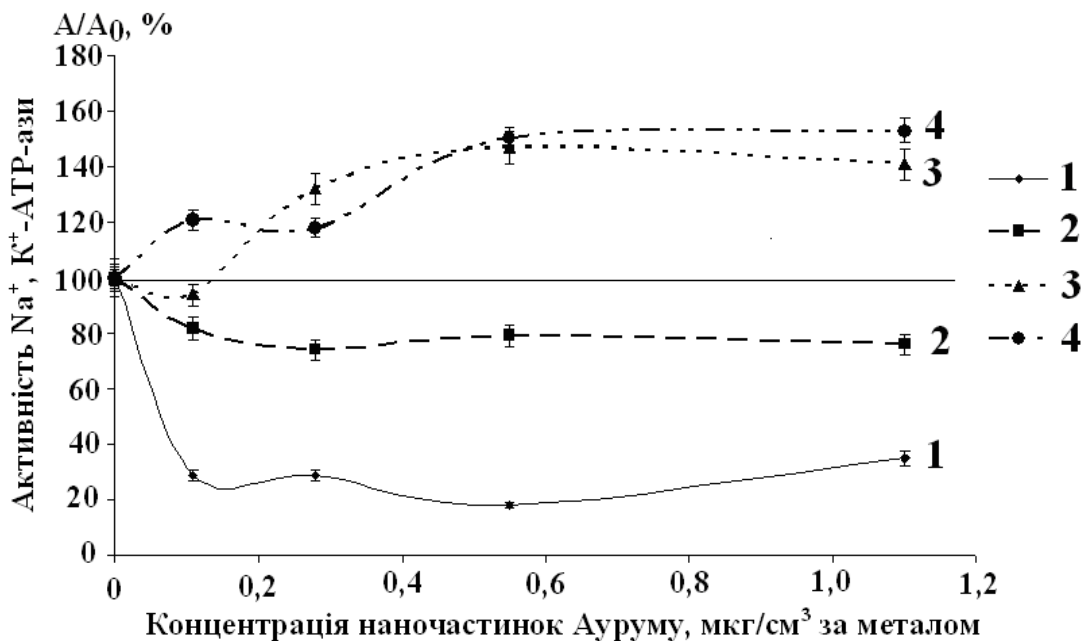


Рис. 3.6 Рівень Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності ($A/A_0, \%$) у мембранній фракції клітин лінії U937 за впливу NPAu розміру: 1 – ~ 10 нм, 2 – ~ 20 нм, 3 – ~ 30 нм, 4 – ~ 45 нм ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100 % прийнято величину Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності мембранних фракцій інтактних клітин лінії U937 (контроль, A_0) за відсутності впливу NPAu .

Виняток складало зниження ($P < 0,05$) Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності в СМФ клітин за умов впливу NPAu розміру ~ 20 нм у концентрації 0,28 $\text{мкг}/\text{мл}$ за металом.

Дослідження впливу дослідних NPAu на активність ЛДГ-ази цитозольних фракцій клітин U937 показало (рис. 3.7), що NPMe впливали індукуючим чином на її активність, що у середньому складало у діапазоні

концентрацій 0,18–1,20 мкг/мл (~10 нм) – 4,0–4,5 разу ($P < 0,05$), а у концентраціях 0,18–0,70 мкг/мл за металом (~20 і ~30 нм) – 1,5–2,0 разу ($P < 0,05$) відповідно щодо контрольного рівня цього ензиму.

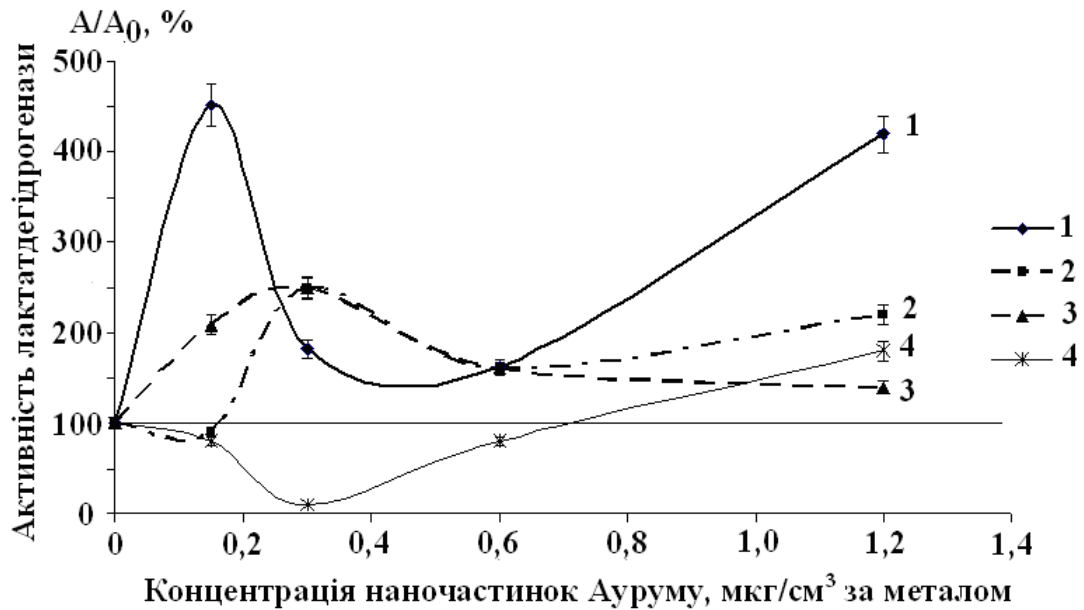


Рис. 3.7 Рівень ЛДГ-азної активності (A/A_0 , %) у цитозольній фракції клітин лінії U937 за впливу NPAu розміру: 1 – ~10 нм, 2 – ~20 нм, 3 – ~30 нм, 4 – ~45 нм ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100 % прийнято величину ЛДГ-азної активності цитозольних фракцій інтактних клітин лінії U937 (контроль, A_0) за відсутності впливу NPAu.

Наночастинки Аурому розміром ~45 нм у діапазоні концентрацій 0,20–0,60 мкг/мл за металом, навпаки, сприяли інгібіції ЛДГ-ази, що складало в середньому 5,0 разів ($P < 0,05$) відносно контрольного рівня ензиматичної активності.

Таким чином, отримані результати щодо характеру змін ензиматичної активності субклітинних фракцій еукаріотичних організмів за впливу дослідних зразків NPMe вказують, що NPAg, NPFe, NPCu та NPMnO₂ у певному розмірно-концентраційному діапазоні не є токсичними та, поряд з даними щодо відсутності їх генотоксичної та мутагенної дії, дозволяють вважати їх біосумісними та перспективними для використання у нанобіотехнологіях.

Але, через різний рівень організації, прокариотичні клітини за своїми метаболічними реакціями можуть по-різному реагувати на вплив NPMe, зокрема структурно-функціональні показники стану їх мембран та важливі мембранозв'язані ензими.

3.1.2 Біохімічні маркери цитотоксичної дії NPAu і NPAg у гострому експерименті на ізольовані мембранні фракції клітин прокариотичних організмів. На сьогодні, в першу чергу доведено фізико-хімічні аспекти взаємодії наночастинок з клітиною та її поверхнею, разом з тим існує нагальна необхідність вивчення їх впливу на метаболічні процеси, які відбуваються в клітинах, зокрема прокариотичних, тобто вивчення можливої цитотоксичності або біосумісності NPMe. Оскільки активність усіх процесів в живій клітині залежить від стану її мембрани, то стресорні фактори, що впливають на останню, будуть змінювати стаціонарність її метаболізму. Існуюча структурно-метаболічна теорія розглядає стресорні ефекти як можливу подію, що виникає в результаті змін не тільки структур макромолекул, а й метаболізму стресованої клітини. Тому, прокариотичні організми є адекватною моделлю для вивчення взаємовідносин між клітиною та стресорами середовища.

Тому наступною задачею нашої роботи було вивчення біохімічних маркерів біосумісності NPMe у певному розмірно-концентраційному діапазоні на ізольовані СМФ клітин *Escherichia* spp. виробничих штамів *E. coli* 57; 25; 24; 20 і 4 та *Salmonella* spp. – штамів *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16, *S. Enteritidis* 34 і М.

У дослідженнях використовували NPAu розміру ~20 нм, ~30 нм і ~45 нм і NPAg розміру ~30 нм з вихідною концентрацією 38,6 мкг/мл і 86,4 мкг/мл за металом відповідно.

Кінцева концентрація NPAu в середовищі інкубації СМФ клітин *E. coli* становила 1,16 мкг/мл та у розведеннях 0,58; 0,29; 0,14 і 0,07 мкг металу/мкг білку; NPAg – 2,59 мкг/мл та у розведеннях 1,30; 0,65; 0,32 і 0,16 мкг металу/мкг білка відповідно.

Кінцева концентрація NP_{Au} в середовищі інкубації СМФ клітин *Salmonella* spp. становила 1,93 мкг/мл та у розведеннях 0,97; 0,48; 0,24; 0,12; 0,06 і 0,03 мкг металу/мкг білка; NP_{Ag} – 4,32 мкг/мл та у розведеннях 2,16; 1,08; 0,54; 0,27; 0,14 і 0,07 мкг металу/мкг білка відповідно.

3.1.2.1 Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівня антиоксидантних показників їх регуляції в мембранах клітин *Escherichia* spp. за дії NP_{Au} і NP_{Ag} у розмірному діапазоні. Аналіз характеру впливу NP_{Au} і NP_{Ag} на інтенсивність процесів ПОЛ за рівнем утворення його продуктів – ДК і МДА – за преінкубації з СМФ клітин *E. coli* дозволив виявити певні дискретні значення розмірів і концентрацій дослідних зразків NP_{Me} (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Інтенсивність процесів ПОЛ у СМФ нативних клітин
E. coli дослідних штамів та за преінкубації з NP_{Au} і NP_{Ag}
у розмірному діапазоні (M±m; n=5)**

Уміст продуктів ПОЛ у СМФ клітин	Умови інкубації				
	СМФ нативних клітин (контроль)	За умов взаємодії з NP _{Me} , нм			
		NP _{Au} ~20 нм	NP _{Au} ~30 нм	NP _{Au} ~45 нм	NP _{Ag} ~30 нм
<i>E. coli</i> штаму 57					
ДК, мкмоль/л	31,00±0,50	34,2±0,9*	33,2±1,9	79,8±2,5*	61,8±4,05*
МДА, ΔD	4,80±0,20	6,4±0,3*	4,96±0,35	10,2±1,0*	9,12±0,45*
<i>E. coli</i> штаму 25					
ДК, мкмоль/л	54,40±1,45	20,8±2,0*	10,8±0,9*	13,0±1,41*	20,8±3,0*
МДА, ΔD	7,20±0,52	2,0±0,12*	0,6±0,02*	1,44±0,10*	1,66±0,25*
<i>E. coli</i> штаму 24					
ДК, мкмоль/л	23,60±2,70	24,6±1,2	26,6±2,0	24,6±0,9	26,60±2,50
МДА, ΔD	3,20±0,09	3,40±0,20	3,60±0,48	3,40±0,08	3,60±0,08
<i>E. coli</i> штаму 20					
ДК, мкмоль/л	30,80±2,05	31,2±3,0	26,4±1,2*	29,80±1,50	26,4±1,22*
МДА, ΔD	4,40±0,25	4,40±0,30	3,6±0,3*	4,00±0,32	3,80±0,06*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05 відносно значень такого показника у СМФ нативних клітин *E. coli* відповідних штамів (контроль).

Дослідження рівня інтенсивності оксидативних процесів у ізольованих СМФ клітин *E.coli* дослідних штамів свідчать, що за рівнем утворення продуктів ліпопероксидації – ДК і МДА – більш інтенсивнішою активністю ПОЛ відрізняються мембрани клітин штаму 25 (табл. 3.5), а за рівнем утворення карбоксильних похідних НХ і ОХ – більш виражені процеси ОМБ у мембранах клітин штамів 25 і 20 відповідно (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Інтенсивність процесів ОМБ у СМФ нативних клітин
E. coli дослідних штамів та за преінкубації з NP Au і NP Ag
у розмірному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)**

Уміст похідних у СМФ клітин, ммоль/г білка	Умови інкубації				
	СМФ нативних клітин (контроль)	За умов взаємодії з NP Me, нм			
		NP Au ~20 нм	NP Au ~30 нм	NP Au ~45 нм	NP Ag ~30 нм
<i>E. coli</i> штаму 57					
НХ	2,12±0,05	2,61±0,07*	1,93±0,01	2,81±0,05*	1,44±0,01*
ОХ	1,06±0,02	1,52±0,03*	0,92±0,01*	1,48±0,03*	0,98±0,01
<i>E. coli</i> штаму 25					
НХ	4,17±0,20	3,04±0,05*	4,12±0,50	4,40±0,41	1,38±0,01*
ОХ	2,98±0,12	1,94±0,11*	2,82±0,52	2,10±0,15*	0,92±0,01*
<i>E. coli</i> штаму 24					
НХ	1,30±0,18	0,86±0,04*	0,91±0,06*	0,37±0,01*	0,60±0,02*
ОХ	0,80±0,01	0,44±0,02*	0,61±0,03*	0,30±0,01*	0,36±0,01*
<i>E. coli</i> штаму 20					
НХ	3,20±0,08	3,88±0,15*	1,19±0,02*	1,06±0,04*	1,37±0,09*
ОХ	1,43±0,04	1,65±0,07*	0,55±0,01*	0,53±0,01*	0,71±0,04*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у СМФ нативних клітин *E. coli* відповідних штамів (контроль).

Аналіз характеру впливу NP Au і NP Ag на інтенсивність процесів ПОЛ за умов преінкубації з ізольованими СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів дозволив виявити певні дискретні значення розмірів дослідних зразків NP Me (табл. 3.5).

Так, зниження вмісту ДК і МДА реєстрували в СМФ клітин штаму 25 за преінкубації з наночастинками обох металів у всьому вивченому розмірному діапазоні, що складало в середньому 3,6 і 6,3 разу ($P < 0,05$) відносно значень таких показників для інтактних СМФ клітин (контроль). Зниження вмісту ДК і МДА визначали в СМФ *E. coli* штаму 20 лише за умов контактної взаємодії з NPAu та NPAg розміру ~ 30 нм, відсоток якого складав у середньому 14,3 % і 18,2 % та 14,2 % і 13,6 % відповідно ($P < 0,05$) відносно значень цих показників у контрольній пробі.

Встановлено, що за умов преінкубації зразків наночастинок металів обох видів із СМФ клітин *E. coli* штаму 24 у вивченому розмірному діапазоні не встановлювали статистичних змін рівня показників ДК і МДА відносно таких у контрольній пробі.

Результати визначення інтенсивності процесів ОМБ у ізольованих СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів за умов преінкубації з дослідними зразками NPMe в розмірному діапазоні наведені у таблиці 3.6. З отриманих даних виявляється, що рівень утворення карбоксильних похідних ОМБ залежить від дискретного розміру дослідних зразків NPMe.

Так, за преінкубації NPAu розміру ~ 20 нм та ~ 45 нм з СМФ клітин штаму 57 встановлено збільшення рівня похідних НХ і ОХ у середньому на 23,1 % і 43,4 % та на 32,6 % і 39,6 % ($P < 0,05$), а за впливу NPAu та NPAg розміру ~ 30 нм, навпаки, зниження їх рівня на 9,0 % і 13,2 % ($P < 0,05$) та на 32,1 % ($P < 0,05$) і 7,5 % відповідно відносно значень показників карбоксильних похідних у інтактних СМФ клітин цього штаму (контроль).

У СМФ клітин штамів 25; 24 і 20 за умов контактної взаємодії з NPMe обох видів у цілому визначено гальмування інтенсивності процесів ОМБ за зниженням рівня значень їх похідних. Так, за впливу NPAu і NPAg зниження вмісту похідних НХ у СМФ клітин цих штамів варіювало в межах 1,37–3,01 і 2,20 – 3,02 разів, а похідних ОХ – 1,30–2,70 і 2,01–3,24 разіву ($P < 0,05$) відповідно.

Виняток складає відсутність вірогідних змін рівня утворення карбоксильних похідних у СМФ клітин штаму 25 за взаємодії з НРАу середнього розміру ~30 нм і ~45 нм, тобто процеси ОМБ за інтенсивністю наближались до таких у інтактних СМФ клітин цього штаму (контроль).

Встановлено, що за умов контактної взаємодії НРАу розміру ~20 нм з СМФ клітин штамів 57 і 20 реєстрували підвищення вмісту похідних НХ та ОХ у середньому на 23,1 і 21,3 % та на 43,4 і 15,4 % ($P < 0,05$) відносно значень показників у контрольних пробах.

Також за умов впливу НРАу розміру ~45 нм у СМФ клітин штаму 57 реєстрували накопичення вмісту похідних НХ і ОХ, збільшення значень яких дорівнювало в середньому 32,5 і 39,6 % відповідно відносно контрольних значень показників.

У подальшому було визначено рівень показників, що характеризують стан АОС захисту мембран клітин *E. coli* дослідних штамів. Результати дослідження активності каталази і показника загальної АОА у СМФ нативних клітин *E. coli* штамів 57; 25; 24 і 20 та за умов впливу НРМе у розмірному діапазоні наведені в таблиці 3.7.

Встановлено, що у СМФ клітин штаму 25 рівень активності каталази за умов преінкубації з НРАу у всьому розмірному діапазоні вірогідно знижувався в межах 1,3–8,6 разів, а у клітин штаму 20, навпаки, підвищувався – у межах 1,3–1,9 разів відповідно щодо контрольних значень ензиму.

У СМФ штамів 57 і 24 за умов преінкубації з НРАу розмірів ~30 нм і ~45 нм активність каталази знижувалась у середньому в 1,6 і 2,9 разу ($P < 0,05$), а для клітин штаму 20 за дії таких НРМе у всьому діапазоні розмірів – збільшувалась в межах 1,3–1,9 разів ($P < 0,05$) щодо її контрольних значень.

Встановлено тенденцію щодо збільшення активності каталази на 6,7 % у СМФ клітин штаму 57 у випадку взаємодії НРАу розміру ~20 нм, що для СМФ клітин штаму 24 було вірогідним і складало в середньому 18,1 % ($P < 0,05$) щодо контрольного рівня ензиму.

Рівень активності каталази за умов преінкубації NPAg розміру ~30 нм з СМФ клітин штаму 25 суттєво знижувався за значенням у середньому в 4,9 разу ($P < 0,05$), а штамів 57; 24 і 20 – підвищувався в 1,1; 1,5 і 2,2 разу ($P < 0,05$) відповідно щодо значень ензиматичної активності у контрольній пробі.

Таблиця 3.7

Рівень активності каталази (ммоль H_2O_2 /сек мг білка) та загальної АОА (% інгібіції ТБК-активних продуктів) у СМФ нативних клітин *E. coli* дослідних штамів та за преінкубації з NPAu і NPAg у розмірному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)

Показник	Умови інкубації				
	СМФ нативних клітин (контроль)	За умов взаємодії з NPMe, нм			
		NPAu ~20 нм	NPAu ~30 нм	NPAu ~45 нм	NPAg ~30 нм
<i>E. coli</i> штаму 57					
Каталаза	17,44±2,00	18,61±1,15	8,30±0,42 *	6,32±0,45 *	19,5±1,22 *
Загальна АОА	24,40±1,25	17,7±1,6 *	36,00±2,80 *	17,7±1,3 *	67,2±4,5 *
<i>E. coli</i> штаму 25					
Каталаза	20,52±1,45	15,3±2,8 *	3,56±0,20 *	2,40±0,04 *	4,20±0,07 *
Загальна АОА	16,00±1,60	21,34±1,6 *	66,70±0,80 *	57,3±1,6 *	48,0±1,03 *
<i>E. coli</i> штаму 24					
Каталаза	6,64±0,30	7,84±0,23 *	6,08±0,28	2,56±0,08 *	10,1±1,05 *
Загальна АОА	34,40±1,60	44,3±2,4 *	67,20±4,60 *	73,8±6,0* *	67,2±4,5* *
<i>E. coli</i> штаму 20					
Каталаза	2,26±0,05	2,88±0,10 *	3,94±0,16 *	4,34±0,22 *	4,94±0,31 *
Загальна АОА	50,80±4,60	67,2±4,8 *	69,20±7,20 *	63,5±4,8 *	83,6±5,3 *

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у СМФ нативних клітин *E. coli* відповідного штаму (контроль).

Рівень показника загальної АОА у СМФ бактеріальних клітин за взаємодії з NPAu та NPAg у всьому розмірному діапазоні збільшувався для

штамів 25; 24 і 20, кратність чого складала у середньому 3,0; 1,8 і 1,3 разу та 3,0; 2,0 і 1,7 разу ($P < 0,05$) відповідно щодо контрольних значень показника.

Збільшення значень показника загальної АОА в ізольованих СМФ клітин штаму 57 реєстрували лише за впливу NPAu і NPAg середнього розміру ~ 30 нм, кратність якого дорівнювала у середньому 1,5 і 2,8 разу ($P < 0,05$) відповідно відносно рівня даного показника в контрольній пробі.

Так, виражені зміни інтенсивності процесів ліпопероксидації та процесів окисної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів за умов контактної взаємодії з NPAu і NPAg супроводжувались втручанням реакцій загальної АОС за підвищенням рівня загальної АОА та змінами активності каталази ($P < 0,05$), що, очевидно, призводило до гальмування утворення токсичних продуктів ПОЛ (штами 20 і 25) та утримання їх на рівні контрольних значень (штами 20 і 24), а також до зниження вмісту карбоксильних похідних ОМБ (штами 57, 25, 24 і 20) відповідно.

Визначений фізіологічний рівень або уповільнення інтенсивності процесів окиснення ліпідів та окисної деструкції білків у СМФ клітин *E. coli* усіх дослідних штамів за взаємодії з NPAu та з NPAg (за винятком штаму 57) розміру ~ 30 нм може вказувати на значну біосумісність таких наночастинок саме у цьому розмірі через їх антиоксидантний вплив.

Але цей феномен значною мірою залежить від дискретного розміру дослідних NPAu. Так, дійсно, у випадку контактної взаємодії NPAu середнього розміру ~ 20 і ~ 45 нм та NPAg розміру ~ 30 нм з СМФ клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NPAu розміру ~ 20 нм з клітинами штаму 20 – процесів ОМБ відповідно. У цьому випадку, отримані ефекти свідчать на прооксидантну і мембранотоксичну дію NPAu і NPAg у саме цих розмірах. Очевидно, потенціалу власних антиоксидантних ресурсів у клітинних мембранах таких штамів виявилось недостатнім, тому є беззаперечним фактом

індивідуального характеру впливу NPMe на їх структурно-функціональний стан у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів.

Отже, прооксидантний вплив NPAu меншого (~20 нм) і більшого (~45 нм) розміру ілюструє очевидну мембранотоксичну дію цих наночастинок. Слід зазначити також, що важливим аспектом з'ясування впливу NPMe на системи АОС є встановлення залежності її реакції від вихідного редокс-статусу саме клітини.

Методичні рішення, які були використані при оцінюванні біохімічних маркерів біосумісності NPMe на моделі мембранних фракцій клітин прокаріотичних організмів, увійшли до методичних рекомендацій (Додаток В) [504], які затверджено в установленому порядку.

3.1.2.2 Рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності клітин *Escherichia spp.* і *Salmonella spp.* за дії NPAu і NPAg у розмірно-концентраційному діапазоні. Оскільки мембранозв'язана H^+ -АТФ-аза є одним із ключових ензимів прокаріотичних організмів, завдяки функціонуванню якого відбувається формування різниці електрохімічних потенціалів на її мембрані [213, 220, 222, 223], та який, поряд з дихальною активністю клітини [170, 505], є інтегральними параметрами енергетичного метаболізму і клітинних функцій за дії агресивних чинників довкілля.

Результати впливу NPMe на активність питомої H^+ -АТФ-ази клітин за преінкубації з СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів наведені в таблиці 3.8.

Як виявляється із отриманих даних, NPAu і NPAg у всьому розмірно-концентраційному діапазоні в цілому здатні підвищувати питому H^+ -АТФ-азну активність СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів, а її збільшення носить розмірнозалежний характер.

Так, зростання величини активності H^+ -АТФ-ази під впливом NPAu розміру ~30 нм у СМФ клітин *E. coli* усіх штамів реєстрували у середньому на рівні 8,9–22,0 %, а розміру ~45 нм – на рівні 17,6–35,3 % ($P < 0,05$)

відповідно щодо значень ензиматичної активності нативних клітин (контроль).

Таблиця 3.8

**Рівень питомої Н⁺-АТФ-азної активності у СМФ клітин *E. coli*
дослідних штамів за преінкубації з NPAu і NPAg
у розмірно-концентраційному діапазоні (M±m; n=5)**

Кінцева концентрація NPMе, мкг/мл за металом	Активність питомої Н ⁺ -АТФ-ази у СМФ клітин, $\frac{\text{нмоль}Pi}{\text{мгб.} \cdot \text{хв}}$				
	57	25	24	20	4
СМФ нативних клітин відповідного штаму (контроль)					
Контроль	5232,0±52,8	6057,0±49,0	6057,0±91,5	4862,0±71,2	20160±131
NPAu розміру ~20 нм					
1,16	5411,0±61,0	6171,0±84,0	6857,0±57,0*	4909,0±85,0	22240±145*
0,58	5724,0±38,0*	5371,0±61,0*	6914,0±64,0*	4956,0±110,0	22080±110*
0,29	5545,0±46,0*	5486,0±53,0*	6400,0±85,0*	4956,0±66,0	22560±126*
0,14	5814,0±40,0*	6400,0±92,0*	7086,0±58,0*	5330,0±125,4	22240±95*
0,07	5545,0±64,0*	6629,0±75,0*	6857,0±61,0*	5330,0±94,0*	22720±103*
NPAu розміру ~30 нм					
1,16	5188,0±70,0	7086,0±64,0*	6971,0±97,0*	5423,0±91,0*	22720±130*
0,58	5545,0±65,0*	7314,0±44,0*	6629,0±73,0*	5143,0±110,0	22240±205*
0,29	6350,0±58,0*	7371,0±62,0*	7200,0±48,0*	5423,0±82,0*	24000±98*
0,14	6440,0±28,0*	6514,0±36,0*	6857,0±77,0*	5423,0±65,0*	22080±111*
0,07	5814,0±64,0*	6971,0±91,0*	7086,0±70,0*	5143,0±96,0	25600±78*
NPAu розміру ~45 нм					
1,16	6350,0±68,0*	7771,0±64,0*	7886,0±103,0*	5984,0±95,0*	24320±121*
0,58	6976,0±52,0*	8286,0±102,0*	8571,0±110,0*	5423,0±76,0*	25760±108*
0,29	6976,0±55,0*	7771,0±72,0*	7771,0±78,0*	6545,0±58,0*	25920±110*
0,14	6082,0±61,0*	7657,0±59,0*	7886,0±95,0*	6078,0±91,0*	26240±90*
0,07	6440,0±72,0*	6743,0±61,0*	8286,0±108,0*	6545,0±65,5*	26240±100*
NPAg розміру ~30 нм					
2,59	6529,0±61,0*	8286,0±113,0*	8229,0±123,0*	6686,0±81,0*	27200±96*
1,30	7066,0±53,0*	7371,0±91,0*	8343,0±86,0*	6078,0±58,0*	28320±81*
0,65	7424,0±61,0*	7314,0±64,0*	8571,0±91,0*	6826,0±123,0*	26240±117*
0,32	7200,0±84,0*	8286,0±91,0*	8457,0±73,0*	6826,0±69,0*	28480±158*
0,16	6484,0±61,0*	8686,0±155,0*	8514,0±95,0*	6826,0±105,0*	28640±121*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у СМФ нативних клітин *E. coli* відповідного штаму (контроль).

Визначено, що під дією NPAu розміру ~20 нм у діапазоні концентрацій 0,14–1,16 мкг/мл за металом для клітин штамів 57, 25 і 20 статистичних змін ензиматичної активності не відбувалось (табл. 3.8).

За умов преінкубації СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів з NPAg розміру ~30 нм у діапазоні концентрацій встановлювали також виражений стимулюючий ефект щодо активності мембранної H⁺-АТФ-ази.

Так, величина ензиматичної активності СМФ клітин дослідних штамів у порівнянні з її контрольним рівнем за взаємодії з NPAg збільшувалась у межах 23,9–42,1 % (P<0,05) відповідно.

У подальшому було вивчено вплив дослідних NPMe на величину питомої H⁺-АТФ-азної активності мембранних фракцій клітин *Salmonella* spp. дослідних штамів.

Результати дослідження ензиматичної активності СМФ клітин штамів *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16, *S. Enteritidis* 34 і М за умов преінкубації з NPMe середнього розміру ~30 нм наведені в таблиці 3.9.

Встановлено, що під впливом NPAu у діапазоні концентрацій 0,24–0,97 мкг металу/мкг білка реєстрували вірогідне зростання рівня H⁺-АТФ-азної активності СМФ клітин усіх штамів, що у середньому складало для *S. Dublin* – 12,0–17,3 %, *S. Typhimurium* – 16,0–13,1 %, *S. Enteritidis* 34 і М – 34,4 і 11,9 % щодо значень її активності у контрольних зразках.

Тенденцію щодо зниження ензиматичної активності відносно її контрольних значень реєстрували лише за впливу NPAu у концентраціях 0,06 і 0,12 мкг металу/мкг білка у СМФ штаму *S. Dublin* 12 у середньому на 7,6 % та у концентрації 0,12 мкг металу/мкг білка у СМФ *S. Typhimurium* 16 – на 4,7 % відповідно.

Результати дослідження рівня питомої ДА клітин *Salmonella* spp. дослідних штамів за впливу NPMe у діапазоні концентрацій наведені в таблиці 3.10.

Встановлено, що за дії NPAu у діапазоні концентрацій 0,12–0,97 мкг металу/мкг білка відбувалось підвищення значення показника питомої ДА

для цих клітин зростали в середньому на 32,6 і 14,1 % ($P < 0,05$) у клітин штамів *S. Dublin* 12 і *S. Enteritidis* 34 відносно його контрольного рівня.

Таблиця 3.9

Рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності в СМФ клітин *Salmonella* spp. дослідних штамів за преінкубації з NPAu і NPAg у концентраційному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)

Кінцева концентрація NPMе, мкг металу/ мкг білка	Питома H^+ -АТФ-азна активність, $\frac{\text{нмоль}Pi}{\text{мгб.} \cdot \text{хв}}$			
	<i>S. dublin</i> 12	<i>S. typhimurium</i> 16	<i>S. enteritidis</i> 34	<i>S. enteritidis</i> М
СМФ нативних клітин відповідного штаму (контроль)				
Контроль	234,48±7,28	43776±433	26277±13	23705±22
NPAu розміру ~30 нм				
1,93	245,71±6,19	48955±163	34198±85*	24351±113
0,97	249,82±8,90	53835±96*	38177±70*	27598±107*
0,48	263,38±5,31*	45501±46*	34305±177*	25720±89*
0,24	286,81±8,13*	49158±43*	33037±76*	26269±46*
0,12	215,47±9,63	41703±169	35743±126*	26075±66*
0,06	218,05±10,50	43058±134	46482±153*	26023±96*
NPAg розміру ~30 нм				
4,32	252,41±9,25	47161±70*	37136±119*	25384±125
2,16	251,09±7,22	48881±187*	41110±108*	26427±41*
1,08	249,16±4,48	52870±36*	38022±158*	27941±99*
0,54	267,8±5,95*	48942±89*	36736±124*	26407±80*
0,27	231,92±6,56	49487±334*	35901±79*	28104±40*
0,14	233,45±7,28	47915±127*	35708±94*	28514±78*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у СМФ нативних клітин *Salmonella* spp. відповідного штаму (контроль).

У випадку інкубації клітин штаму *S. Typhimurium* 16 з NPAu у обраному діапазоні концентрацій не реєстрували статистичних змін показника питомої ДА, а штаму *S. Enteritidis* М – лише тенденцію щодо підвищення рівня цього показника відносно такого у контролі.

Аналогічну спрямованість змін показника клітин *Salmonella* spp. реєстрували за умов їх преінкубації з NPAg у концентраційному діапазоні

(табл. 3.10). Збільшення рівня питомої ДА для клітин штамів *S. Dublin* 12 і *S. Enteritidis* 34 складало у середньому – 31,2 і 10,7 % ($P < 0,05$) відносно її контрольних значень.

Таблиця 3.10

**Рівень питомої дихальної активності клітин *Salmonella* spp.
дослідних штамів за преінкубації з NP Au і NP Ag
у концентраційному діапазоні ($M \pm m$; $n=5$)**

Кінцева концентрація NP Me, мкг металу/мкг білка	Рівень питомої ДА, $\text{мгO}_2/\text{дм}^3 \cdot \text{хв} \cdot \text{мг}$ біомаси			
	<i>S. dublin</i> 12	<i>S. typhimurium</i> 16	<i>S. enteritidis</i> 34	<i>S. enteritidis</i> M
Нативні клітини відповідного штаму (контроль)				
Контроль	14,1±0,06	6,17±0,15	6,26±0,13	5,78±0,09
NP Au розміру ~30 нм				
1,93	17,9±0,07*	5,83±0,21	6,82±0,18	5,97±0,08
0,97	18,3±0,03*	5,98±0,16	7,13±0,25*	5,93±0,12
0,48	18,9±0,01*	6,03±0,05	7,15±0,10*	5,95±0,15
0,24	18,9±0,03*	6,05±0,11	7,16±0,13*	5,88±0,11
0,12	19,1±0,06*	6,02±0,01	7,12±0,20*	5,89±0,03
0,06	16,4±0,03*	6,03±0,14	7,05±0,24	5,84±0,21
NP Ag розміру ~30 нм				
4,32	18,3±0,07*	6,16±0,23	6,89±0,11*	6,06±0,12
2,16	18,5±0,03*	5,89±0,32	6,92±0,14*	6,05±0,21
1,08	18,7±0,03*	5,94±0,22	6,97±0,08*	6,07±0,08
0,54	18,4±0,04*	5,75±0,14	6,89±0,05*	6,06±0,13
0,27	18,4±0,03*	5,78±0,18	6,86±0,15	6,04±0,10
0,14	18,6±0,03*	5,72±0,15	6,84±0,07	6,09±0,12

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника ізольованих нативних клітин *Salmonella* spp. відповідного штаму (контроль).

Але, під впливом NP Ag у концентрації 0,14–0,54 мкг металу/мкг білка реєстрували тенденцію щодо зниження рівня питомої ДА у клітин штаму *S. Typhimurium* 16 у середньому на 6,8 % відносно її контрольних значень. Можна припустити, що величина різниці електрохімічного потенціалу на

мембрані клітин цього штаму формується за рахунок H^+ -АТР-азної активності.

Отримані дані засвідчили, що у цілому за впливу NPАu і NPАg розміру ~ 30 нм в діапазоні концентрацій 0,07–0,58 і 0,16–2,59 мкг/мл за металом відбувалась стимуляція H^+ -АТР-азної активності СМФ клітин *E. coli* майже усіх дослідних штамів відносно її значень для нативних клітин.

Під впливом NPАu і NPАg розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій – 0,12–0,97 і 0,54–2,16 мкг металу/мкг білка реєстрували також посилення активності показників енергетичного метаболізму клітин *Salmonella* spp., а саме – зростання величини мембранної H^+ -АТР-ази усіх штамів поряд із рівнем питомої ДА клітин штамів *S. Dublin* 12 і *S. Enteritidis* 34 у порівнянні з контрольними значеннями цих показників.

Одержані дані в цілому вказують на можливість активації процесів енергетичного обміну бактеріальних клітин за умов їх взаємодії з відповідними NPMe. З іншого боку, встановлені ефекти свідчать про відсутність токсичного впливу дослідних NPАu і NPАg та їх виражену біосумісність щодо клітин *Esherichia* spp. і *Salmonella* spp. за рівнем фізіолого-біохімічних маркерів.

Отже, результати визначення біохімічних маркерів цитотоксичності NPMe на прокаріотичні клітини *Esherichia* spp. і *Salmonella* spp. вказують, що колоїдні дисперсії NPАu і NPАg розміру ~ 30 нм у певному діапазоні концентрацій є безпечними та біосумісними, що залежить від їх дискретного розміру та має індивідуальний характер для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізму. Поряд з цим, результати щодо дії дослідних зразків NPАu і NPАg на рівень структурно-функціональних показників клітин прокаріотичних організмів ілюструють метаболізм-залежний характер контактної взаємодії наночастинок металів, що може бути властиво лише активно метаболізуючим клітинам.

Результати підрозділу опубліковано в наукових працях (Додаток Л) [501, 502, 504, 506 – 517].

Подальша робота була спрямована на визначення біохімічних параметрів біосумісності дослідних зразків колоїдних дисперсій NPMe в організмі лабораторних тварин у токсикологічних експериментах.

3.1.3 Оцінювання біохімічних параметрів біосумісності суміші NPMe порівняно з солями відповідних металів на організм білих щурів за умов токсикологічних експериментів. На сьогодні одним з пріоритетних напрямів дослідження наноматеріалів є не лише вивчення їх потенційної токсичності, а й створення нових імунобіологічних засобів, нанонутрицевтиків (кормових добавок), наносорбентів, дезінфектантів тощо, у складі яких особлива увага приділяється NPMe як біосумісним субстанціям.

Грунтовних знань щодо впливу NPMe на організм тварин недостатньо або вони обмежуються мінімумом тестів та часто їх інтерпретація носить дискусійний характер, що ускладнює представлення дослідників щодо біохімічних і цитологічних параметрів небажаного впливу наночастинок у експериментах на тваринах.

3.1.3.1 Визначення біохімічних показників крові та окремих органів білих щурів за дії суміші NPMe порівняно з солями відповідних металів у гострому токсикологічному експерименті. На підставі одержаних результатів у експериментах на клітинах евкаріотичних і прокаріотичних організмів щодо біосумісності та мембранотропної дії дослідних зразків NPAg, NPFe, NPCu і NPMnO₂ було складено суміш NPMe у аліквотному співвідношенні з кінцевою концентрацією 100 мкг/мл за кожним металом як перспективний прототип субстанцій лікарських засобів та компонентів кормових добавок.

Проведено гострий токсикологічний експеримент по визначенню безпечності та біосумісності суміші NPMe на статевозрілих щурах-самцях лінії *Vistar* (n=144) масою 200–250 г. За принципом аналогів було сформовано шість груп тварин по 24 щури в кожній.

Тваринам I і II дослідних груп вводили одноразово внутрішньошлунково за допомогою зонду потенційно фізіологічну дозу суміші NРМе і суміші солей відповідних металів з розрахунку 0,3 мг/кг маси тіла, а тваринам III; IV і V дослідних груп – суміш NРМе у дозах, які перевищували рекомендовану фізіологічну дозу препарату в 3,3; 6,7 і 13,3 разу, а саме – 1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла відповідно. Тваринам контрольної групи вводили одноразово внутрішньошлунково за допомогою зонду 2 мл/щура дистильованої води.

Для визначення біосумісності суміші NРМе у вищезазначених дозах за рівнем гематологічних і біохімічних показників, на 1-шу добу та через 3; 7 і 14 діб після введення препаратів, у щурів (n=5) кожної групи після декапітації (за умов легкого хлороформного наркозу) відбирали зразки крові.

Для визначення біодоступності суміші NРМе (за розподіленням, накопиченням та елімінацією Феруму, Купруму та Мангану) під час патологоанатомічного розтину щурів через 1; 3; 7 і 14 діб після початку досліду відбирали зразки органів (n=5). Відібрані зразки внутрішніх органів зважували та вираховували коефіцієнти їх маси, які порівнювали з аналогічними показниками від тварин контрольної групи.

Визначення біохімічних маркерів токсичної дії та біосумісності суміші NРМе в організмі білих щурів у гострому експерименті. Клінічні спостереження за щурами протягом 14 діб показали, що загальний стан організму тварин як контрольної, так і дослідних I–V груп був задовільний: щури були рухливі, адекватно реагували на зовнішні подразники. Загибелі тварин за весь термін спостереження не зафіксовано.

Лише на 1-шу добу після введення відмічали зменшення споживання води щурами III, IV і V дослідних груп, яким вводили суміш NРМе у дозах 1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла відповідно. При цьому поїдання корму щурами в III групі не відрізнялось від такого у контрольній групі, тоді як у IV і V дослідних групах воно було приблизно на 25 % та 50 % нижчим за контроль.

На 2-гу добу після введення препаратів зміни споживання корму спостерігали лише у V дослідній групі: воно приблизно на 25 % було нижчим за контроль, також на даному терміні дослідження фіксували підвищення споживання води щурами I дослідної групи (суміш NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла). Починаючи з 3-ї доби споживання корму і води нормалізувалося і було однаковим у тварин всіх груп до завершення дослідження.

На 1-шу добу експерименту не встановлено патологоанатомічних відхилень у щурів I, II та III дослідних груп (рис. 3.8), тоді як IV дослідної групи було відмічено здуття шлунку, а в V групи – здуття товстого відділу кишечника. На 3-тю добу досліду патологічних відхилень не встановлено лише у щурів II дослідної групи (суміш солей металів, 0,3 мг/кг маси тіла), тоді як у тварин III дослідної групи визначали здуття шлунку, а I; IV та V дослідних груп – здуття товстого відділу кишечника (рис. 3.9). Окрім того, у щурів V групи печінка була нерівномірно забарвлена (з «мармуровим» відтінком).

На 7-му добу досліду у щурів I та II дослідних груп встановлювали незначне здуття товстого відділу кишечника, тоді як у тварин III; IV та V дослідних груп товстий кишечник був значно здутий (рис. 3.10).

На 14-ту добу патологічних змін не встановлювали у щурів II дослідної групи (рис. 3.11), тоді як в інших – відмічали порушення з боку ШКТ: здуття шлунку (IV група) та товстого відділу кишечника (I; III та V групи).

Незважаючи на вищенаведене, слід зазначити, що ми не спостерігали запальних явищ у ШКТ за усією його довжиною (гастритів, ентеритів, колітів виявлено не було на всіх термінах дослідження) у тварин всіх дослідних груп, хоча здуття (в основному товстого кишечника) було у щурів, що отримували суміш NPMe в різних дозах (I; III; IV та V групи).

Під час дослідження коефіцієнтів маси органів щурів встановлені наступні зміни. На 1-шу добу після введення наноконструкції та суміші солей металів зміни коефіцієнтів маси органів відмічали лише у I та IV дослідних групах (Додаток Д, табл. Д.1).



Контроль

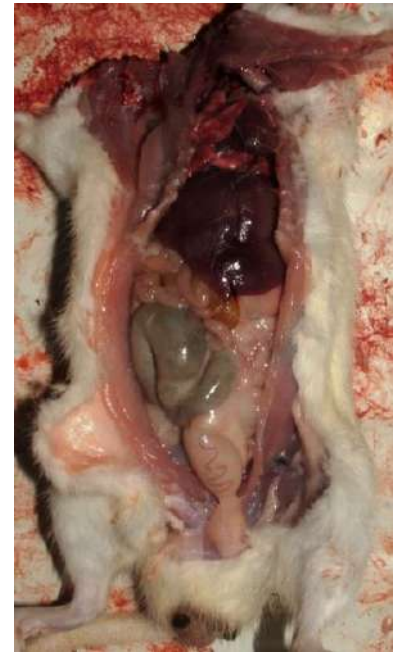
I дослід
(NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)II дослід
(солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла)III дослід
(NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)IV дослід
(NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)V дослід
(NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)

Рис. 3.8 Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 1-шу добу експерименту.

Примітка. Ножицями вказано на здуття шлунку в щурів IV дослідної групи та товстого кишечника – у щурів V дослідної групи.



Контроль

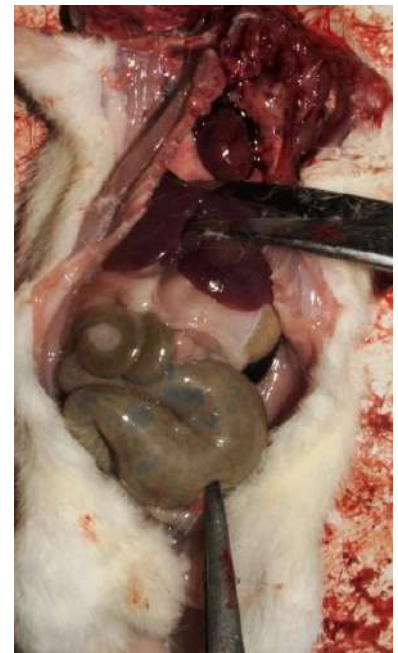
I дослід
(NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)II дослід
(солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла)III дослід
(NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)IV дослід
(NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)V дослід
(NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)

Рис. 3.9 Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 3-тю добу експерименту.

Примітка. Ножицями вказано на здуття шлунка у щурів III дослідної групи, здуття товстого відділу кишечника – у щурів I; IV та V дослідних груп та нерівномірне забарвлення печінки – у щурів V дослідної групи.



Контроль

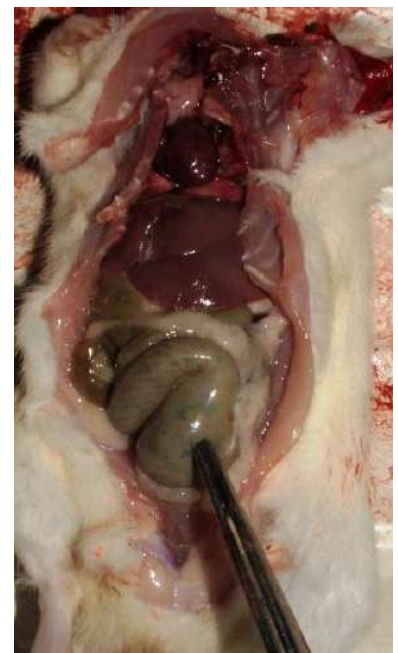
I дослід
(NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)II дослід
(солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла)III дослід
(NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)IV дослід
(NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)V дослід
(NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)

Рис. 3.10 Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 7-му добу експерименту.

Примітка. Ножицями вказано на здуття товстого відділу кишечника у щурів IV та V дослідних груп.



Контроль

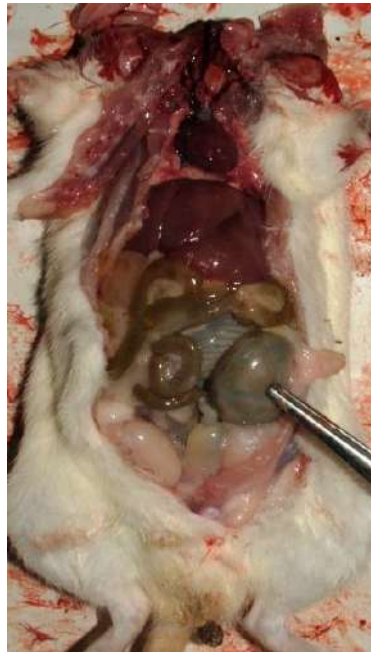
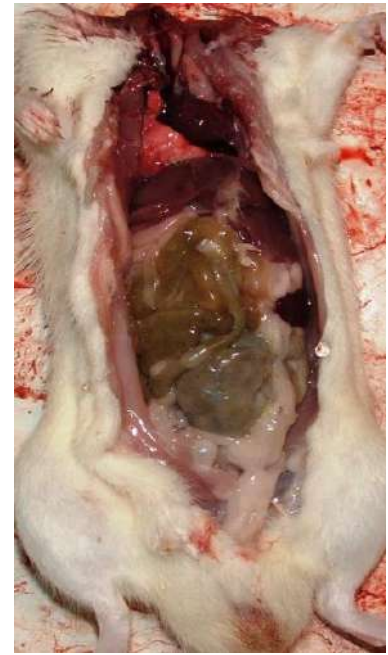
I дослід
(NPMc, 0,3 мг/кг маси тіла)II дослід
(солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла)III дослід
(NPMc, 1,0 мг/кг маси тіла)IV дослід
(NPMc, 2,0 мг/кг маси тіла)V дослід
(NPMc, 4,0 мг/кг маси тіла)

Рис. 3.11 Патологоанатомічна картина внутрішніх органів щурів на 14-ту добу експерименту.

Примітка. Ножицями вказано на здуття шлунку та товстого відділу кишечника у щурів I; III; IV та V дослідних груп.

У I дослідній групі, щури якої отримали суміш NPMe в дозі 0,3 мг/кг маси тіла, коефіцієнт маси нирок був вірогідно вищим за контроль майже на 8,0 %, а у IV дослідній групі (2,0 мг/кг маси тіла) вірогідно вищим за контроль на 12,6 % ($p \leq 0,05$) був коефіцієнт маси печінки.

На 3-тю добу досліду в тварин I та II груп не було встановлено змін показника (Додаток Д, табл. Д.1), тоді як III і IV групи вищими за контрольні були його значення для селезінки у середньому на 17,0 і 24,4 % та та нирок на 11,7 %, а V – селезінки, печінки та нирок на 24,4; 10,4 та 9,1 % ($P < 0,05$).

На 7-му добу експерименту визначено підвищення значень коефіцієнтів маси селезінки в усіх дослідних групах: I групи – на 43,6 %, II – на 25,6 %, III та IV – на 28,2 % і V – на 35,9 % ($P < 0,05$) відповідно відносно контролю (Додаток Д, табл. Д.2). Окрім цього, відмічено підвищення коефіцієнтів маси серця у тварин II; III та V дослідних груп на 11,0 %; 22,0 % та 11,0 % відповідно, а V – коефіцієнту маси легенів на 11,4 % ($P < 0,05$).

На 14-ту добу досліду не виявляли змін коефіцієнтів маси головного мозку, серця і селезінки, проте відмічали вірогідне підвищення коефіцієнтів маси легень у тварин усіх дослідних груп: I – на 18,6 %, II та V – на 8,0 %, III і IV груп – на 21,3 % і 22,6 % ($P < 0,05$) відносно контролю (Додаток Д, табл. Д.2). Також на даному терміні досліджень відмічали вірогідне, але незначне зниження коефіцієнтів маси печінки в тварин II дослідної групи у середньому на 5,8 % та нирок III групи на 7,4 % відносно контролю.

Результати визначення рівня гематологічних показників у експериментальних щурів у динаміці досліду наведені у таблиці 3.11.

Так, у щурів III, IV і V дослідних груп було встановлено, що одноразове введення суміші NPMe у вищих дозах, починаючи з 1-ї доби експерименту, викликало розвиток лейкоцитозу в середньому до 34,3 %, зниження кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну в їх крові в середньому на 38,2 % і 17,6 % ($P < 0,05$) відносно рівня цих показників у контролі.

На 14-ту добу досліджень у крові щурів, що одержали максимально допустиму дозу суміші NPMe (4,0 мг/кг маси тіла), кількість лейкоцитів

вірогідно зменшувалась за значенням у середньому на 18,2 % у порівнянні з цим показником у контрольній групі.

Таблиця 3.11

Рівень гематологічних показників у крові щурів за одноразового введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMе на 1- та 14-ту добу експерименту ($M \pm m$; $n=5$)

№ п/п	Група тварин	Термін дослідження, доба	
		1	14
Лейкоцити, 10^9 /л			
К	Контроль	9,52±0,56	10,96±0,88
I	NPMе – 0,3 мг/кг	11,68±0,82	11,80±0,84
II	солі Me – 0,3 мг/кг	11,04±0,56	11,12±0,88
III	NPMе – 1,0 мг/кг	12,00±0,48*	12,96±0,40*
IV	NPMе – 2,0 мг/кг	13,20±0,40*	13,56±0,28*
V	NPMе – 4,0 мг/кг	16,48±0,64*	8,96±0,40*
Еритроцити, 10^{12} /л			
К	Контроль	8,20±0,39	7,99±0,47
I	NPMе – 0,3 мг/кг	6,81±0,05	6,87±0,52
II	солі Me – 0,3 мг/кг	6,19±0,28*	6,39±0,68
III	NPMе – 1,0 мг/кг	6,73±0,23*	6,11±0,35*
IV	NPMе – 2,0 мг/кг	6,51±0,66*	7,09±0,48
V	NPMе – 4,0 мг/кг	5,77±0,29*	5,50±0,26*
Гемоглобін, г/л			
К	Контроль	135,60±2,38	124,30±5,18
I	NPMе – 0,3 мг/кг	122,10±5,40	131,10±6,50
II	солі Me – 0,3 мг/кг	127,10±3,03	112,90±11,00
III	NPMе – 1,0 мг/кг	114,10±3,13*	107,60±10,68
IV	NPMе – 2,0 мг/кг	118,80±8,80*	118,10±5,00
V	NPMе – 4,0 мг/кг	106,40±2,45*	97,20±4,75*

Примітки: 1. NPMе – розчин суміші наночастинок металів;
 2. солі Me – розчин суміші солей відповідних металів;
 3. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Встановлено, що на цей час вірогідним залишалось зниження рівня еритроцитів у щурів III і V дослідних груп, а рівня загального гемоглобіну – лише в крові тварин, що одержували максимально допустиму дозу суміші NPMе ($P < 0,05$).

Здатність організму протистояти агресивному впливу чинників біотичної і абіотичної природи (екзо- і ендотоксинам) тісно пов'язана з реактивністю організму, представляючи собою одне з основних її наслідків і виразів. У таблиці 3.12 наведені результати дослідження динаміки показників білкового профілю та стану неспецифічної резистентності у плазмі крові щурів, що одержували розчин суміші NPMе у дозовому діапазоні та суміші солей відповідних металів.

Таблиця 3.12

Динаміка рівня показників білкового профілю та неспецифічної резистентності у плазмі крові щурів за одноразового введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMе (M±m n=5)

Група тварин	Термін досліджень, доба	Загальний білок, г/л	Альбуміни, г/л	Загальні глобуліни, г/л	А/Г	ЦК, мг/мл	Серомукоїди, мг/мл
Контроль	1	68,55±1,57	40,50±0,90	28,30±2,50	1,43	0,048±0,006	0,089±0,007
	3	71,65±0,73	38,07±1,90	33,58±0,70	1,13	0,056±0,006	0,097±0,009
	7	72,78±1,75	38,87±1,50	33,91±1,70	1,15	0,066±0,006	0,102±0,005
	14	73,47±1,23	38,90±0,93	34,57±1,50	1,13	0,067±0,014	0,104±0,006
I дослідна група	1	68,67±0,65	40,40±0,68	28,27±1,00	1,43	0,056±0,006	0,091±0,008
	3	70,10±0,77	39,30±0,75	30,80±1,00	1,28	0,055±0,005	0,109±0,009
	7	72,83±2,55	37,23±1,50	35,60±1,50	1,05	0,068±0,010	0,100±0,008
	14	72,87±0,93	37,27±2,05	35,60±0,10	1,05	0,065±0,009	0,099±0,017
II дослідна група	1	65,58±0,75	38,70±1,50	26,88±1,60	1,44	0,055±0,002	0,079±0,006
	3	68,85±0,98	35,77±3,38	33,08±0,50	1,08	0,055±0,004	0,089±0,007
	7	62,43±0,73	39,33±1,75	23,10±2,20	1,70	0,070±0,007	0,110±0,012
	14	71,50±2,87	38,33±1,50	33,17±0,30	1,16	0,078±0,002*	0,110±0,004
III дослідна група	1	64,33±1,52	36,40±1,33*	27,90±0,80	1,31	0,054±0,003	0,095±0,002
	3	72,58±0,40	36,10±1,30*	36,48±0,60	0,99	0,058±0,046	0,086±0,008
	7	72,60±0,83	31,77±0,55*	40,83±0,70*	0,78	0,067±0,006	0,117±0,008*
	14	69,93±1,85	33,73±0,80*	36,20±2,50	0,93	0,100±0,007*	0,123±0,002*
IV дослідна група	1	71,40±1,38	39,10±0,95	32,30±0,50	1,21	0,058±0,004	0,106±0,008*
	3	75,43±2,77	33,27±1,20*	42,16±1,00*	0,79	0,065±0,005*	0,107±0,010
	7	70,35±3,00	31,90±0,05*	38,45±1,20*	0,83	0,081±0,005*	0,120±0,027
	14	71,78±1,22	38,80±0,75	32,98±1,20	1,18	0,104±0,014*	0,111±0,003
V дослідна група	1	72,53±2,38	36,33±0,75*	36,20±0,50	1,00	0,074±0,004*	0,141±0,023*
	3	72,00±1,00	29,10±0,63*	42,90±0,50*	0,68	0,070±0,002*	0,147±0,006*
	7	72,67±0,27	31,00±1,75*	41,67±1,06*	0,74	0,080±0,007*	0,140±0,004*
	14	73,63±1,93	33,03±1,30*	40,60±1,32*	0,81	0,122±0,019*	0,142±0,013*

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Так, одержані результати свідчать, що на фоні нормальних (фізіологічних) значень вмісту загального білка у плазмі крові усіх експериментальних щурів впродовж дослідів встановлювали зміни у кількісному співвідношенні білкових фракцій у протеїнограмі тварин, що одержали підвищені дози суміші NPMе (III–V групи).

Рівень альбумінів у крові щурів III групи почав знижуватись вже на 1-шу добу після введення суміші NPMе, а IV і V груп – починаючи з 3-ї доби, що складало у середньому 14,2; 15,3 і 17,0 % відповідно ($P < 0,05$). Уміст загальних глобулінів у крові дослідних тварин, особливо IV і V груп, відповідно був збільшеним відносно їх контрольних значень ($P < 0,05$), що знайшло відображення на значеннях показника коефіцієнту кількісного співвідношення альбумін/глобулінів ($< 1,00$).

Такий тип протеїнограми вказує на індукування імунної відповіді в організмі дослідних щурів внаслідок введення суміші NPMе у дозовому діапазоні.

З результатів таблиці 3.12 виявляється, що вірогідне підвищення рівня утворення ЦК впродовж всього експерименту реєстрували в плазмі крові щурів, що одержали надмірні дози суміші NPMе – 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла, а внаслідок потрапляння суміші NPMе у дозі 1,0 мг/кг та біотичної дози розчину суміші солей металів – лише на 14-ту добу дослідів.

Так, наприкінці експерименту (14-та доба) значення ЦК у крові щурів II; III; IV і V груп зростали у середньому на 16,4; 49,3; 55,2 і 82,1 % відносно контрольного рівня цього показника ($P < 0,05$).

Поряд з цим, було визначено рівень утворення білків підгострої фази – патологічних білків-супресорів – серомукоїдів у динаміці впливу суміші солей металів і суміші NPMе у дозовому діапазоні (табл. 3.12). Встановлено, що вміст серомукоїдів вірогідно зростав у крові щурів III групи, починаючи з 7-ї доби, та V групи впродовж всього дослідів у середньому на 16,5 та 44,5 % у порівнянні зі значенням такого у контролі.

Одержані результати поряд із динамікою гематологічних показників переконливо свідчать про розвиток імуносупресії в організмі щурів через 14 діб після введення суміші NPMe у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла, та дозозалежну тропність NPMe.

У таблиці 3.13 наведені результати визначення динаміки рівня показників інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ у плазмі крові щурів.

Таблиця 3.13

Динаміка рівня інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ у плазмі крові щурів за одноразового введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMe (M±m n=5)

Група тварин	Термін дослідження, доба	Інтенсивність ПОЛ, продукти		Інтенсивність ОМБ, похідні	
		ДК, мкмоль/л	МДА, ΔД	НХ, ммоль/г білка	ОХ, ммоль/г білка
Контроль	1	34,8±1,5	4,52±0,20	549,2±64,9	274,2±24,0
	3	31,5±0,5	3,88±0,06	647,4±34,1	308,5±18,1
	7	34,2±1,9	4,31±0,27	597,9±12,5	309,6±14,3
	14	38,2±2,2	5,40±0,67	539,3±31,9	272,2±26,9
I дослідна група	1	33,70±0,5	4,34±0,09	541,1±25,7	257,7±5,6
	3	30,8±0,1	3,80±0,02	573,8±37,4	326,7±14,3
	7	29,5±2,4	3,77±0,25	523,7±41,7	280,7±16,7
	14	28,3±0,8*	4,41±0,38	496,6±29,0	242,6±4,9
II дослідна група	1	34,1±0,2	4,46±0,07	668,7±10,1*	275,8±11,5
	3	31,7±1,0	3,41±0,22	898,7±92,4*	407,1±26,2*
	7	31,2±1,5	4,09±0,06	744,2±40,9*	447,5±16,9*
	14	37,4±2,7	4,91±0,15	481,4±22,9	241,9±13,4
III дослідна група	1	35,6±1,0	4,64±0,10	720,0±21,3*	282,5±20,0
	3	28,4±1,4	3,46±0,29	869,2±71,4*	343,8±36,7
	7	29,3±0,4	3,82±0,20	812,8±36,6*	321,3±26,7
	14	33,3±2,3	4,68±0,20	697,0±33,3*	425,2±32,1*
IV дослідна група	1	33,6±0,1	4,35±0,03	676,1±36,0*	260,6±13,1
	3	30,1±0,8	3,98±0,15	684,7±40,4*	284,4±18,5
	7	29,1±0,3	3,57±0,55	935,1±36,6*	709,7±87,0*
	14	33,5±1,7	4,56±0,82	588,6±35,6	251,0±12,2
V дослідна група	1	35,1±0,7	4,54±0,11	771,7±56,8*	288,5±17,4
	3	18,0±0,6*	2,29±0,05*	857,9±31,2*	298,4±22,5
	7	16,2±0,5*	2,14±0,12*	787,5±55,8*	398,5±25,4*
	14	28,8±3,4*	3,11±0,06*	539,3±31,9	272,2±26,9

Примітка. * – різниця значень вірогідна при P<0,05 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Дослідженнями встановлено, що одноразове введення суміші NPMe щурам лише у дозі 4,0 мг/кг маси тіла викликало вірогідні зміни інтенсивності ПОЛ.

Так, рівень МДА і ДК у плазмі крові щурів V дослідної групи знижувався, починаючи з 3-ї доби експерименту та до 14-ї доби включно.

Через 14 діб після дії суміші NPMe значення МДА і ДК у плазмі крові щурів у середньому складали 75,4 % і 57,6 % відносно їх контрольного рівня ($P < 0,05$).

У таблиці 3.14 наведені результати досліджень рівня показників, що характеризують ензиматичну ланку та потенціал ендогенної АОС у організмі експериментальних щурів у динаміці експерименту.

Таблиця 3.14

Динаміка рівня показників АОС у плазмі крові щурів за одноразового введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMe ($M \pm m$; $n=5$)

Група тварин	Термін дослідження, доба			
	1	3	7	14
Активність каталази, нмоль H_2O_2 /сек мг білка				
Контроль	123,9±7,7	112,4±5,7	103,1±6,1	111,8±4,4
I дослідна група	160,1±7,1*	127,3±3,5*	142,2±2,3*	149,3±9,5*
II дослідна група	238,7±3,7*	209,4±3,5*	167,4±0,9*	165,5±6,6*
III дослідна група	179,4±3,6*	255,8±8,4*	237,3±10,5*	242,3±8,8*
IV дослідна група	189,2±11,2*	197,4±9,5*	211,0±2,8*	226,7±4,7*
V дослідна група	200,6±18,2*	264,2±6,4*	261,1±2,3*	267,3±10,5*
Загальна АОА, % інгібіції				
Контроль	64,58±4,69	71,88±5,13	68,10±4,08	61,37±4,55
I дослідна група	64,58±4,69	62,08±3,13	62,50±3,28	60,61±2,27
II дослідна група	41,68±6,24*	42,00±3,25*	54,17±1,56*	48,48±6,82*
III дослідна група	74,20±6,13	65,11±1,21*	37,67±3,28*	42,42±2,27*
IV дослідна група	64,06±1,69	45,83±4,69*	43,47±5,45*	42,43±6,81*
V дослідна група	52,08±6,25*	59,38±1,56*	57,90±1,68*	24,27±2,28*

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Встановлено, що внаслідок потрапляння розчинів суміші металів у іонній та нанорозмірній формі у всьому вивченому дозовому діапазоні відбувається в крові дослідних щурів I–V груп індукування активності

індуцибельної каталази, що носить поступовий характер у динаміці 14-добового дослідження. Причому, посилення активності цього ензиму є пропорційним величині дози суміші NPMe.

Тоді як у плазмі крові тварин, що одержали суміш NPMe у різних дозах, активність каталази з часом зростала, то в щурів, яким вводили розчин суміші солей відповідних металів, вона знижувалась, але була вірогідно більшою за контрольні значення.

Так, на 14-ту добу експерименту в крові дослідних щурів I; II; III; IV і V груп відсоток зростання активності ферменту складав у середньому 25,7; 48,0; 116,7; 102,8 і 139,1 % ($P < 0,05$) відносно її контрольних значень.

Зворотню кореляційну залежність щодо характеру змін активності каталази мав рівень загальної АОА плазми крові дослідних щурів у динаміці експерименту. Після задавання металів у іонній та нанорозмірній формі в надмірних дозах (II; III; IV і V групи) у плазмі крові щурів реєстрували поступове витрачання ресурсів власної (ендогенної) АОА (табл. 3.15).

Вірогідні зміни рівня загальної АОА у тварин з II і V груп встановлювали вже через одну добу, а III і IV груп через 3 доби після введення препаратів таким чином, що на 14-ту добу його зниження дорівнювало 21,0; 30,9; 30,9 і 60,4 % відповідно у порівнянні з таким у контролі.

На фоні відсутності надлишкового утворення продуктів ліпопероксидації в крові дослідних тварин встановлено інтенсифікацію процесів ОМБ за рівнем утворення їх карбоксильних похідних НХ і ОХ (табл. 3.13). У плазмі крові щурів, що одержали розчин суміші солей металів і NPMe у дозах 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла (II; IV і V групи), визначали посилення процесів ОМБ до 7-ї доби, а у дозі 1,0 мг/кг маси тіла – впродовж 14 діб експерименту ($P < 0,05$).

Значні перебудови у функціональному стані печінки дослідних щурів спостерігали з 1-ї доби експерименту.

Дані, наведені у таблиці 3.15, показують, що вміст глюкози у плазмі крові щурів, що одержали суміш NPMe у надмірних дозах, змінювався лише на 1- та 3-тю добу експерименту.

Таблиця 3.15

Динаміка рівня глюкози, сечовини та креатиніну в плазмі крові щурів за одноразового введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMe (M±m n=5)

Група тварин	Термін дослідження, доба			
	1	3	7	14
Глюкоза, ммоль/л				
Контроль	6,97±0,30	7,43±0,58	7,23±0,18	7,23±0,33
I дослідна група	6,67±0,15	6,63±0,08	6,27±0,40	7,50±0,38
II дослідна група	6,90±0,38	7,63±0,23	6,47±0,18	7,23±0,20
III дослідна група	6,93±0,18	8,93±0,43*	6,47±0,35	6,97±0,30
IV дослідна група	7,43±0,18	8,57±0,38*	6,27±0,13	8,17±0,73
V дослідна група	9,33±0,38*	7,47±0,50	7,17±0,45	7,43±0,30
Сечовина, ммоль/л				
Контроль	11,43±0,58	11,17±0,73	12,02±0,13	12,23±0,30
I дослідна група	13,63±0,80	13,97±0,78	11,74±0,48	12,62±0,28
II дослідна група	14,63±1,23*	14,50±0,58*	14,11±0,58*	12,81±0,10
III дослідна група	14,86±0,58*	14,33±0,35*	11,23±0,62	14,51±0,24
IV дослідна група	11,74±0,85	13,17±0,53*	14,24±0,63*	14,90±0,43*
V дослідна група	14,05±0,40*	14,66±0,76*	15,90±1,43*	15,69±0,51*
Креатинін, мкмоль/л				
Контроль	199,10±4,48	189,37±4,48	210,3±13,9	200,8±12,0
I дослідна група	189,70±4,93	198,8±13,4	192,80±5,68	212,2±7,6
II дослідна група	210,00±4,95	173,40±6,58	202,00±8,20	198,4±14,2
III дослідна група	202,20±1,88	202,2±12,8	220,7±15,75	216,0±15,4
IV дослідна група	195,60±3,17	228,0±16,2	213,2±10,35	222,2±16,8
V дослідна група	213,80±4,25	228,50±3,30	233,5±15,53	217,5±14,0

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Так, у щурів, яким вводили максимальну дозу суміші NPMe – 4,0 мг/кг маси тіла, рівень глюкози зростав на 1-шу добу досліду у середньому на 33,9 % відносно контрольного рівня ($P < 0,05$).

У крові тварин, яким вводили суміш NPMe у дозах 1,0 і 2,0 мг/кг маси тіла, вміст глюкози вірогідно зростав на 3-тю добу у середньому на 20,2 і

15,3 % відповідно. Одержані зміни вказують на розвиток гіперглікемії в організмі щурів внаслідок впливу суміші NPMe у надмірних дозах.

Разом з цим, встановлено, що введення композиційних сумішей металів у іонній та нанорозмірній формах викликало посилення сечовиноутворення в організмі дослідних тварин вже з 1-ї доби експерименту (табл. 3.15).

Максимальний вміст сечовини у плазмі крові щурів II – V груп фіксували на 3-тю добу, який зберігався вірогідно вищим за контрольні значення у тварин IV і V груп до 14-ої доби досліду включно, а підвищення значень показника на цей час складало 21,8 і 28,3 % відповідно.

Результати досліджень вказують, що одноразове введення розчинів металів у обох формах не вплинуло на рівень ще одного кінцевого продукту розкладу білків – креатиніну.

На фоні активації сечовиноутворення та помірної гіперглікемії в крові щурів усіх дослідних груп реєстрували виражене напруження активності ферментних систем природної детоксикації в їх організмі.

Дослідженнями встановлено, що починаючи з 1-ї та до 14-ї доби експерименту включно, реєстрували зниження активності АлАТ та посилення активності АсАТ у плазмі крові тих тварин, що одержали суміш NPMe у дозах 1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла, відносно рівня цих активностей у контрольних тварин ($P < 0,05$) (табл. 3.16).

Активність ще одного ферменту із «золотого стандарту» індикаторів детоксикаційної функції печінки – активність гамаглутамілтранспептидази (ГГТП) – також зростала впродовж 7 діб досліду відносно контрольної в крові щурів, що одержали суміш NPMe лише у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла, в середньому на 62,4 і 43,5 % відповідно ($P < 0,05$).

На 14-ту добу експерименту рівні цієї активності нормалізувались до контрольних.

Якщо підвищення активності амінотрансфераз є раннім і важливим тестом порушення структурно-функціонального стану гепатоцитів, то

визначення активності лужної фосфатази (ЛФ) можна використовувати як додатковий показник для вивчення функціонування печінки.

Таблиця 3.16

Динаміка активності гепатоспецифічних ферментів у плазмі крові щурів за одноразового введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMe (M±m n=5)

Група тварин	Термін досліджень, доба	АлАТ, мкмоль/год мл	АсАТ, мкмоль/год мл	ГГТП, ммоль/год л	ЛФ, нмоль/сек л
Контроль	1	1,49±0,24	1,18±0,06	2,68±0,12	2114,2±150,0
	3	1,41±0,05	1,33±0,04	2,70±0,14	2415,3±108,2
	7	1,38±0,01	1,21±0,05	2,55±0,11	2157,7±26,2
	14	1,37±0,05	1,23±0,05	2,37±0,08	2163,5±154,2
I дослідна група	1	1,83±0,34	1,21±0,08	2,50±0,29	1956,4±131,2
	3	1,69±0,06	1,45±0,06	3,05±0,11	2165,1±45,0
	7	1,77±0,01	1,37±0,06	3,11±0,17	2047,0±32,1
	14	1,55±0,05	1,39±0,08	2,35±0,18	2037,2±173,4
II дослідна група	1	1,43±0,04	1,39±0,18	2,90±0,31	2627,4±193,2
	3	1,47±0,07	1,61±0,08	3,18±0,12	2294,7±32,1
	7	1,34±0,03	1,58±0,02	2,91±0,18	3253,2±83,5*
	14	1,27±0,04	1,58±0,04	2,44±0,08	2997,3±89,9*
III дослідна група	1	1,17±0,03*	1,67±0,10*	3,43±0,18*	2415,3±218,9
	3	1,13±0,05*	1,68±0,04*	3,28±0,12*	2825,0±70,7*
	7	1,22±0,01*	1,58±0,04*	4,14±0,09*	2772,1±18,2*
	14	0,96±0,05*	1,98±0,13*	2,62±0,22	2012,7±39,0
IV дослідна група	1	1,10±0,08*	1,69±0,08*	2,82±0,24	2276,6±205,5
	3	0,90±0,05*	1,83±0,15*	3,16±0,21	2328,3±115,6
	7	0,85±0,03*	2,12±0,06*	2,61±0,07	2106,3±160,6
	14	1,04±0,04*	2,06±0,07*	2,51±0,02	1960,1±77,1
V дослідна група	1	0,98±0,08*	1,81±0,08*	3,55±0,02*	2068,7±111,3
	3	1,08±0,05*	1,75±0,03*	3,68±0,10*	1960,1±39,2*
	7	1,00±0,03*	2,17±0,06*	3,66±0,09*	1583,3±84,9*
	14	0,96±0,05*	1,98±0,13*	2,62±0,22	1693,4±57,6*

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

У плазмі крові щурів II і III дослідних груп спостерігали вірогідне підвищення активності ЛФ через 7–14 діб після введення розчину суміші металів і через 3–7 діб – суміш NPMe у дозі 1,0 мг/кг маси тіла в середньому у межах 50,8–38,5 % і 17,0–28,5 % відповідно у порівнянні з контролем.

Але у плазмі крові щурів, що одержали максимальну дозу суміші NPMe (4,0 мг/кг маси тіла), з 3- по 14-ту добу досліді реєстрували гальмування

активності цього ферменту, яке на 14-ту добу складало у середньому 21,7 % від контролю ($P < 0,05$).

Таким чином, зміни показників функціонального стану печінки були більш вираженими включно до 14-ої доби дослідження в крові щурів, які одержували суміш NPMе у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла, що вказує на прояв токсичної дії та вибірково дозову тропність наночастинок і незбалансованість процесів власної детоксикації (синтетичних процесів) в організмі тварин, так як деякі клініко-біохімічні показники крові щурів цих груп приходили до фізіологічних рівнів наприкінці дослідження.

Отже, за підсумком досліджень клініко-біохімічних показників (стану гемопоєзу та природної резистентності; функціонального стану гепато-ренальної системи; інтенсивності окиснення ліпідів і білків) у «гострому» токсикологічному експерименті встановлено, що для організму білих щурів суміш NPMе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла є біосумісною (толерантною).

Механізми токсичної дії суміші NPMе за одноразового введення білим щурам у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла полягають у вивільненні індикаторних печінкових і антиоксидантних ферментів, посиленні сечовиноутворення, помірній гіперглікемії, альбумінемії, лейкоцитозі на фоні еритроцитопенії, зниженні ємності власних ресурсів АОС і надмірному утворенні токсичних похідних ОМБ, ЦК і Sm ($P < 0,05$), що вказує на зрушення цілісності мембран гепатоцитів та розвиток оксидативного стресу.

Наступною нашою задачею було вивчення біодоступності NPMе за визначення розподілення, накопичення відповідних металів по органах і тканинах щурів.

Визначення біодоступності суміші NPMе за вмістом Купруму, Феруму та Мангану в органах білих щурів у гострому токсикологічному експерименті. Результати вивчення біодоступності суміші NPMе у органах експериментальних щурів зведені в таблицях Д.3 – Д.14 Додатку Д.

Уміст Купруму в шлунку дослідних щурів на 1-шу добу (Додаток Д, табл. Д.3) після введення суміші NPMе та суміші солей металів вірогідно

збільшувався за контрольні значення у тварин I; III; IV та II груп у середньому на 220,0 %; 205,0 %; 125,0 % та 30,0 % відповідно, тоді як V групи (суміш NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла) – вірогідно не відрізнявся від його контрольного рівня.

На 3-тю добу досліду (Додаток Д, табл. Д.6) визначали дозову залежність вмісту Cu в шлунку дослідних щурів (окрім V групи): IV групи – він був вищим у середньому на 110,0 %, III – на 86,0 %, II – на 80,0 % і I – на 52,0 %, тоді як V групи – лише на 33,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (Додаток Д, табл. Д.9) вміст Cu в шлунку щурів вірогідно перевищував контрольний рівень лише у групах, які отримали суміш NPMe та суміш солей металів у дозі 0,3 мг/кг маси тіла – на 82,0 % та 69,0 % відповідно, тоді як в інших дослідних групах цей показник вірогідно не відрізнявся від контрольних значень.

На 14-ту добу експерименту (Додаток Д, табл. Д.12) вміст Cu в шлунку тварин, що отримали суміш NPMe та суміш солей металів у дозі 0,3 мг/кг маси тіла не відрізнявся від контрольного рівня, тоді як III групи – перевищував на 25,0 %, а IV і V – знижувався на 29,0 % та 35,0 % відповідно.

Іншу картину спостерігали при дослідженні вмісту Феруму (Додаток Д, табл. Д.4, Д.7, Д.10 і Д.13). На 1-шу добу експерименту (табл. Д.4) спостерігали дозозалежне підвищення вмісту Fe у шлунках дослідних щурів, максимум якого складав для тварин V групи – 357,0 %, IV – 121,0 %, I – 16,0 % відповідно.

Збільшеним також був вміст Cu в шлунку щурів, що отримали суміш солей металів, перевищення якого складало 240,0 %. У щурів, що отримали NPMe у дозі 1,0 мг/кг маси тіла, вміст Fe не відрізнявся за контрольні значення.

На 3-тю добу досліджень (табл. Д.7) перевищення вмісту Fe залишалось таким в шлунку щурів V і IV груп і складало у середньому 28,0 % і 42,0 % відповідно. У шлунку тварин I групи вміст цього металу був

нижчим на 16,0 %, II і III дослідних груп – не перевищував контрольний рівень.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) перевищення вмісту Fe відмічали лише в шлунку щурів III групи, яке становило 23,0 %, I і II груп – рівень металу не змінювався, а IV і V груп – був вірогідно нижчими у середньому на 15,0 і 13,0 % відповідно.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.13) вміст Fe в шлунку щурів I, II, IV і V груп залишався вищим за його контрольні значення на 14,0; 20,0; 32,0 і 63,0 % відповідно, а III групи – не відрізнявся від такого в контролі.

Уміст Мангану в шлунку щурів мав наступну динаміку (Додаток Д, табл. Д.5, Д.8, Д.11 і Д.14). На 1-шу добу експерименту (табл. Д.5) вміст Mn в шлунках щурів мав виражений дозозалежний ефект і вірогідно перевищував контрольний рівень у тварин груп, яким вводили суміш NPMe: I групи – на 17,0 %, III – на 213,0 %, IV – на 291,0 % і V – на 292,0 %. Значення вмісту Mn в шлунку щурів, які отримали суміш солей металів, перевищували контрольні – на 171,0 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.8) вірогідне зростання вмісту Mn зберігалось в шлунку щурів груп, що отримали суміш NPMe у всьому дозовому діапазоні: в I групі на 22,0 %, III – на 14,0 %, IV – на 19,0 % і в V – на 24,0 %, але в тварин, яким вводили суміш солей металів, вміст металу не змінювався.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.11) спостерігали подібну тенденцію до змін рівня Mn в шлунку дослідних щурів, але виключенням було відсутність статистичних відхилень значень металу в тварин IV групи.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.14) спостерігали динаміку щодо зниження вмісту Mn в шлунку щурів II; III та IV груп, а I та V груп – вірогідне зниження його рівня на 24,0 % та 22,0 % відповідно.

Наступним відділом шлунково-кишкового тракту, через який проходить корм, як відомо є тонкий відділ кишечника. Саме в ньому відбувається всмоктування більшості поживних речовин, а також металів.

Так, на 1-шу добу експерименту (табл. Д.3) вміст Купруму в тонкому відділі кишечника щурів, які отримали суміш NPMе у всьому дозовому діапазоні, вірогідно перевищував контрольні значення: I групи (суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла) – на 58,0 %, III (суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла) – на 92,0 %, IV (суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла) – на 42,0 % і у V (суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла) – на 46,0 %, тоді як II групи (суміш солей металів 0,3 мг/кг маси тіла) – був незначно нижчим за контроль.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.6) вміст Cu в тонкому відділі кишечника щурів I; III і V груп мав лише тенденцію до зниження, тоді як IV групи – вірогідно перевищував контрольний рівень на 68,0 %, а II (суміш солей металів) – був нижчим за контролю на 82,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.9) вірогідних змін вмісту Cu в тонкому кишечнику щурів не встановлено, за винятком III групи (суміш NPMе 1,0 мг/кг маси тіла) – його вміст був нижчим за контрольний на 32,0 %.

На останньому терміні досліджень (табл. Д.12) у щурів, які отримали підвищені дози суміші NPMе (III; IV та V групи), вміст Cu в тонкому кишечнику був вірогідно нижчим за контроль на 73,0; 51,0 та 61,0 % відповідно, тоді як у щурів II групи – його значення не відрізнялись від контролю, а I (біотична доза суміші NPMе) – вірогідно перевищували контрольні на 82,0 %.

Вміст Феруму в тонкому відділі кишечника щурів мав наступну динаміку (Додаток Д, табл. Д.4, Д.7, Д.10 і Д.13). На 1-шу добу експерименту (табл. Д.4) вміст металу у щурів I та III груп не відрізнявся від контрольного рівня, але у щурів II; IV та V груп спостерігали його вірогідне зростання на 88,0; 53,0 та 24,0 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.7) вірогідне підвищення вмісту Fe реєстрували в тонкому кишечнику щурів, які отримали високі дози NPMе (IV, V групи), відповідно на 133,0 та 15,0 %. У щурів, які отримали суміш

солей металів (II група), вміст цього металу знижувався на 24,0 %, а I та III груп не відрізнявся відносно контролю.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) вміст Fe в тонкому кишечнику щурів V групи значно перевищував контрольний, що складало у середньому 188,0 %. Незначне, але вірогідне підвищення вмісту Fe реєстрували в тонкому кишечнику щурів I; II та IV груп, що становило 15,0; 14,0 та 12,0 % відповідно. У тонкому кишечнику щурів III групи вміст Феруму не відрізнявся від контрольних значень.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.13) показники вмісту Феруму в тонкому відділі кишечника щурів I, II та IV груп наближались до контрольного значення, тоді як у щурів V групи (суміш NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла) він залишався вірогідно вищим на 24,0 %, а III (суміш NPMe, 1,0 мг/кг маси тіла) – нижчим на 28,0 % за контрольний рівень.

На 1-шу добу експерименту (табл. Д.5) вміст Мангану в тонкому відділі кишечника щурів I групи вірогідно знижувався на 79,0 %, тоді як II; III; IV та V груп – зростав на 14,0; 54,0; 101,0 та 70,0 % відносно контролю.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.8) вміст Mn в тонкому відділі кишечника щурів I, III та IV груп статистично не змінювався, а II групи, щури якої отримували суміш солей металів, вірогідно знижувався на 58,0 %, V (NPMe 4,0 мг/кг маси тіла) – підвищувався на 25,0 % відносно контролю.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.11) вміст Mn в тонкому кишечнику щурів усіх дослідних груп вірогідно перевищував його контрольні значення: I групи на 51,0 %, II – на 81,0 %, III – на 33,0 %, IV – на 32,0 % і V – на 113,0 % відповідно.

На останньому терміні досліджень (табл. Д.14) вміст Mn в тонкому відділі кишечника щурів лише III групи вірогідно знижувався на 63,0 %, в інших групах – статистично не змінювався.

У товстому відділі кишечника відбувається всмоктування води та металів. Так, на 1-шу добу експерименту (табл. Д.3) значних відхилень вмісту Купруму в товстому кишечнику щурів I, III та IV груп не відмічали,

тоді як II групи, що отримали суміш солей металів, його вміст вірогідно знижувався за контрольні значення на 27,0 %, а V – вірогідно перевищував на 19,0 %.

Майже аналогічну картину спостерігали і на 3-тю добу експерименту (табл. Д.6). В товстому кишечнику щурів I і II груп, що отримали суміш NРМе в біотичній дозі та суміш солей металів, вміст Cu був вірогідно нижчим за контрольні значення на 18,0 % і 49,0 % відповідно, а V – перевищував на 10,0 %.

На 7-му добу досліду (табл. Д.9) відмічено тенденцію до зниження вмісту Cu в товстому кишечнику щурів I; II та IV груп, тоді як III та V груп встановлено вірогідне підвищення цього показника на 50,0 % та 51,0 % відповідно.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.12) вміст Cu в товстому кишечнику щурів I групи вірогідно перевищував контрольні значення на 27 %, а тварин II та IV груп – реєстрували лише тенденцію до зниження, III та V груп – до підвищення відповідно.

Відомо, що виводиться Купрум із організму переважно через ШКТ, меншою мірою – через нирки.

Не однозначний результат отримано щодо динаміки вмісту Феруму в товстому відділі кишківнику щурів. Так, на 1-шу добу досліду (табл. Д.4) вміст Fe в товстому кишківнику щурів I (суміш NРМе, 0,3 мг/кг маси тіла) та V (суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла) груп не відрізнявся від контрольного рівня, тоді як у II (суміш солей металів) та III (суміш NРМе, 1,0 мг/кг маси тіла) груп вміст елементу був вірогідно нижчим за контрольний рівень на 37,0 % та 23,0 % відповідно, а IV (суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла) групи – перевищував на 10,0 %.

На 3-тю добу досліду (табл. Д.7) вміст Fe в товстому кишківнику щурів I групи був вірогідно зниженим на 19,0 %, тоді як IV і V груп – перевищував на 30,0 % і 55,0 % відповідно і II та III груп – не відрізнявся від контрольних значень.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) вміст Fe в товстому кишківнику щурів III групи вірогідно збільшувався на 35,0 %, тоді як II та IV груп – знижувався на 13,0 % та 15,0 %, а I і V груп – не відрізнявся від контрольних значень.

На 14-ту добу (табл. Д.13) після одноразового введення препаратів зберігалася тенденція до підвищення вмісту Fe в товстому відділі кишківника щурів I групи; вірогідне підвищення вмісту реєстрували у щурів III та IV груп на 41,0 % та 27,0 % відповідно, а зниження – II та V груп на 25,0 % та 23,0 % відповідно відносно контрольного рівня цього показника.

На 1-шу добу досліду (табл. Д.5) спостерігали лише тенденцію до підвищення (III; IV і V групи) та зниження (I та II групи) вмісту Мангану у товстому кишківнику дослідних щурів. Простежувався дозозалежний розподіл Мангану.

Аналогічну картину спостерігали й на 3-тю добу експерименту (табл. Д.8): тенденцію до підвищення вмісту Mn в товстому кишківнику встановлено у щурів I; III і IV груп, до зниження – II групи, лише в тварин V групи реєстрували вірогідне підвищення вмісту цього елемента на 16,0 %.

Вірогідних змін вмісту Mn в товстому кишківнику дослідних щурів не спостерігали на 7-му добу після введення препаратів (табл. Д.11).

На 14-ту добу досліду (табл. Д.14) вірогідне зниження вмісту Mn на 14 % визначали в товстому кишківнику щурів II групи, що отримали суміш солей металів; тенденцію до зниження – у тварин V групи, а до підвищення – I; III та IV груп.

Слід зазначити, що чутливість нашого методу не дозволила визначити вміст Купруму в крові, а динаміку вмісту Феруму і Мангану в крові дослідних щурів представлено на рисунках 3.12 і 3.13 відповідно.

На 1-шу добу експерименту вміст Fe в крові щурів (рис. 3.12) усіх дослідних групах був вірогідно вищим за контрольний рівень у середньому на 31,8 %. Простежувався дозозалежний розподіл Феруму.

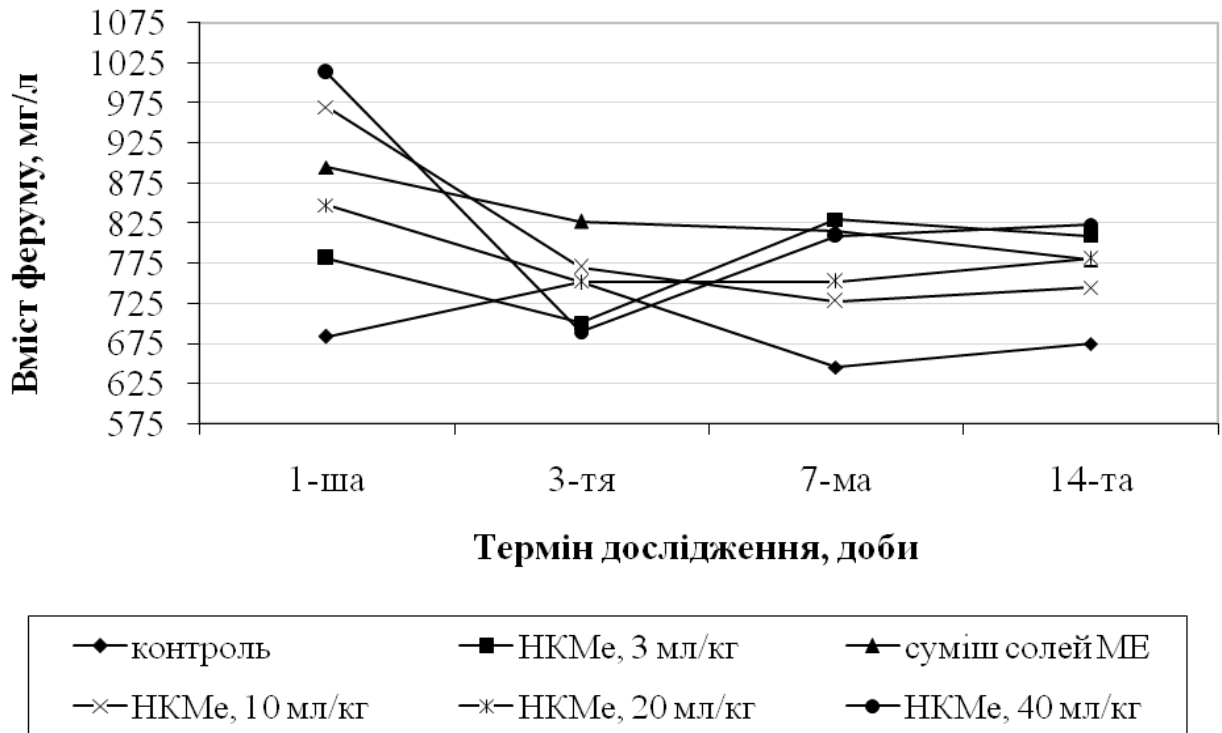


Рис. 3.12 Рівень Феруму в крові дослідних щурів у динаміці 14 діб ($M \pm m$; $n=5$).

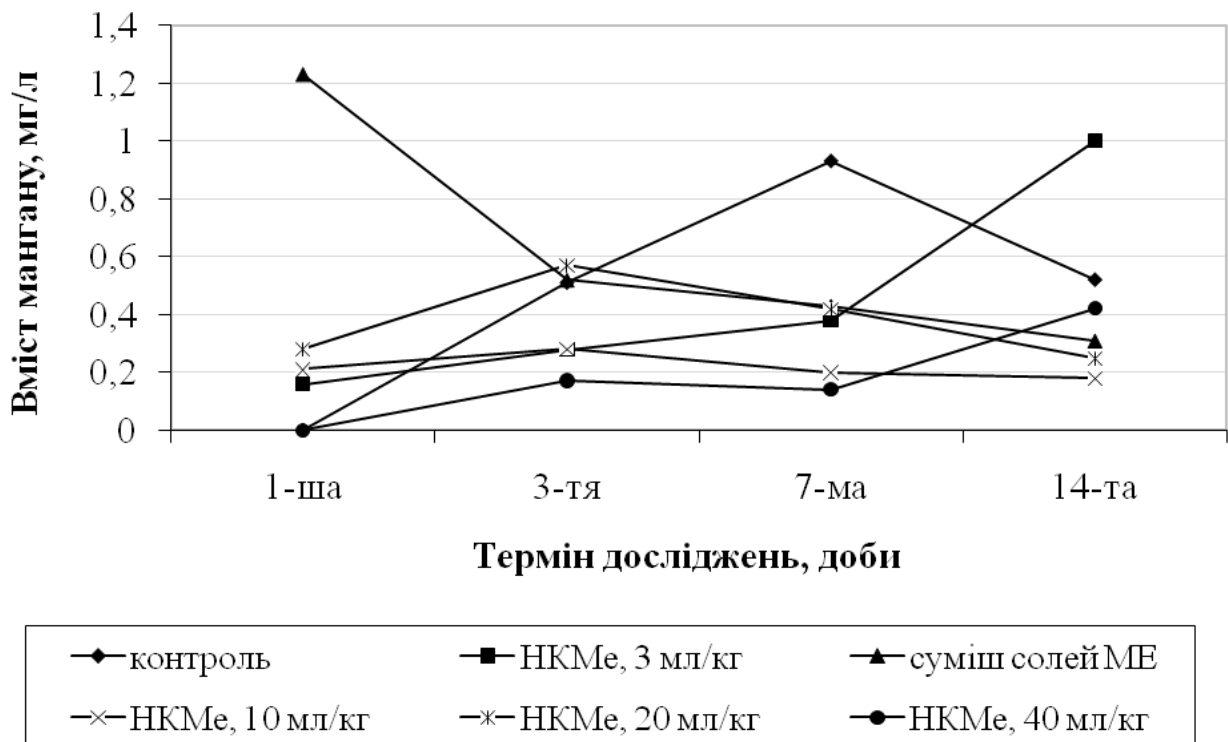


Рис. 3.13 Рівень Мангану в крові дослідних щурів у динаміці 14 діб ($M \pm m$; $n=5$).

На 3-тю добу експерименту рівень Fe в крові щурів (рис. 3.12) III та IV дослідних груп не відрізнявся від контрольного, тоді як I та V груп – був вірогідно нижчим на 7,0 % та 8,0 % відповідно, а II групи – перевищував контрольні значення на 10,0 %.

Починаючи з 7-ої доби та до кінця експерименту включно, вміст Fe в крові щурів (рис. 3.12) усіх дослідних груп вірогідно збільшувався відносно його контрольного рівня і залишався таким до кінця експерименту: відсоток перевищення елемента становив у середньому 22,0 %, а на 14-ту добу – 16,8 % відповідно.

Динаміка рівня Мангану в крові експериментальних щурів впродовж досліджень наведена на рисунку 3.13.

Так, вмісту Mn на 1-шу добу експерименту в крові щурів I та V дослідних груп встановлено не було, тоді як I, III і IV груп – цей метал визначали у концентрації 0,16–0,28 мг/л, а його максимальний вміст реєстрували у крові тварин II групи на рівні 1,23 мг/л відповідно.

На 3-тю добу експерименту вміст Mn в крові щурів (рис. 3.13) II та IV дослідних груп статистично не відрізнявся від контрольного рівня, тоді як I, III та V груп – вірогідно знижувався у середньому на 37,3 % відповідно.

На 7-му добу досліду відмічали вірогідне зниження вмісту Mn в крові щурів усіх дослідних груп: I – у середньому на 59,0 %, II – на 54,0 %, III – на 78,0 %, IV – на 55,0 % і V групи – на 85,0 % відповідно відносно контрольних значень цього показника. Подібну динаміку спостерігали й на 14-ту добу експерименту (рис. 3.13).

Встановлено, що на 1-шу добу експерименту вміст Купруму (табл. Е.3) в печінці щурів I та II груп не відрізнявся від значення контрольного показника, тоді як у щурів, які отримували підвищені дози NPMе (III; IV та V дослідні групи), вміст елемента вірогідно перевищував контрольні значення на 23 %; 49 % та 37 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.6) вірогідно вищими за контрольні значення залишався вміст Cu в печінці щурів IV та V груп на 42,0 % та

25,0 % відповідно, тоді як у тварин інших груп – статистично не відрізнявся від контролю.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.9) вміст Cu в печінці щурів I; IV та V груп був вірогідно вищим за його контрольні значення у середньому на 31,0; 19,0 % та 48,0 %, тоді як II і III груп – статистично не відрізнявся відносно контрольного рівня.

На 14-ту добу експерименту вміст Cu (табл. Д.12) в печінці щурів II та V груп значно не відрізнявся від контрольного рівня, тоді як III та IV груп – був вірогідно нижчим ніж у контролі в середньому на 27,0 % та 11,0 % і I групі – вищим на 10,0 % відповідно.

Уміст Феруму на 1-шу добу експерименту (табл. Д.4) у печінці щурів I групи був максимальний і вірогідно перевищував контроль на 69,0 %, дещо нижчий вміст елементу відмічали у щурів II та IV груп (на 27,0 % та 19,0 %) відповідно; III і V груп – статистично не відрізнявся від контрольних значень.

На 3-тю добу експерименту вміст Fe (табл. Д.7) в печінці щурів мав наступну динаміку: у II групі значення показника вірогідно не відрізнялись від контрольного рівня, I групі – вірогідно знижувались на 12,0 %, а III; IV та V груп – збільшувались на 27,0 %; 15,0 % та 11,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) вірогідне зниження вмісту Fe встановлено у щурів I та IV груп – на 8,0 % та 6,0 % відповідно відносно контрольних значень цього показника. В інших дослідних групах залишалась тенденція до підвищення вмісту елементу.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.13) зберігалась тенденція до зниження вмісту Fe в печінці щурів II та III груп, тоді як I; IV та V груп – реєстрували вірогідне зниження показника відповідно на 17,0 %; 19,0 % та 12,0 %.

На 1-шу добу експерименту вміст Мангану (табл. Д.5) в печінці щурів II; III; IV та V груп був вірогідно вищим за контрольні значення на 16,0 %; 18,0 %; 19,0 % та 43,0 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.8) значних відхилень вмісту Mn в печінці дослідних щурів I, II та III груп не встановлено, тоді як IV групи – його вміст вірогідно перевищував контрольний рівень на 15,0 %, а V групи – знижувався від такого на 9,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.11) встановлено вірогідне підвищення вмісту Mn в печінці щурів II групи на 20,0 % і зниження у тварин III групи – на 18,0 % відносно контрольного рівня. В інших групах значних змін цього показника не спостерігали.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.14) лише в печінці щурів III групи встановлено вірогідне зниження Mn на 25,0 % відповідно.

Селезінка є органом, в якому відбувається «руйнування» еритроцитів. Так, вміст Купруму в селезінці щурів визначали лише на 1- та 14-ту доби експерименту. Так, на 1-шу добу (табл. Д.4) вміст Cu в селезінці щурів I; II та IV груп був вірогідно нижчим за контрольний на 41,0 %; 33,0 % та 67,0 % відповідно, а III групи – вищим на 17,0 %. У селезінці щурів V дослідної групи Купруму визначено не було.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.12) не було визначено Cu в селезінці щурів контрольної, II та V дослідної груп, а I групи – значення показника становили 0,05 мг/л, III групи – 0,10 мг/л і IV групи – 1,10 мг/л відповідно.

На 1-шу добу експерименту (табл. Д.4) вміст Феруму в селезінці щурів усіх дослідних груп вірогідно перевищував його контрольний рівень, що у середньому складало 33,8 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.7) значних відхилень вмісту Fe в селезінці щурів I та V дослідних груп від його контрольних значень не було встановлено; вірогідне підвищення його вмісту реєстрували на цей час у тварин II і III груп – на 7,0 % і 19,0 % та зниження у тварин IV групи – на 14,0 % відносно контролю.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) вміст Fe в селезінці щурів дослідних груп, які отримували HkMe, вірогідно перевищував його контрольний рівень у середньому на 44,0 %.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.13) вміст Fe в селезінці щурів II, IV та V груп статистично не відрізнявся від контрольного, а I та III груп – був вірогідно нижчим від такого на 21,0 % та 13,0 % відповідно.

Уміст Мангану на 1-шу добу дослідження (табл. Д.5) в селезінці щурів I – V груп вірогідно перевищував його контрольні значення у середньому на 326,0 %; 357,0 %; 232,0 %; 389,0 % та 58,0 % відповідно.

На 3-тю добу дослідження (табл. Д.8) визначали лише тенденцію до зниження вмісту Mn в селезінці щурів II, III та V груп, а IV групи – його значення вірогідно знижувались за контрольний рівень на 59,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.11) вміст Mn в селезінці щурів I групи майже не відрізнявся від контролю, у тварин II – V груп – був вірогідно нижчим у середньому на 40,0 % відповідно.

А на 14-ту добу експерименту (табл. Д.14) вміст Mn в селезінці щурів усіх дослідних груп вірогідно перевищував його контрольні значення у середньому в 2,00; 4,06; 3,89; 4,28 та 3,72 рази відповідно.

На 1-шу добу експерименту (табл. Д.3) значний вміст Купруму визначали в легенях щурів IV групи (перевищення від контролю – на 120,0 %), а I, II та V груп – знижений за контрольні значення на 43,0 %, 23,0 % та 34,0 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.6) у легенях щурів I групи встановлено вірогідне підвищення вмісту Cu на 157,0 %. У даному органі щурів IV групи Купрум виявити не вдалося.

На 7-му добу експерименту Cu (табл. Д.9) виявили лише в легенях щурів II та V дослідних груп.

На 14-добу експерименту (табл. Д.12) вмісту Cu не виявлено в легенях щурів II дослідної групи. Найнижчі значення показника елемента

реєстрували в легенях щурів III групи, дещо вищими були в легенях тварин I і V груп.

Уміст Fe на 1-шу добу експерименту (табл. Д.4) в легенях щурів I групи мав лише тенденцію до підвищення, II; III; IV і V груп – до зниження.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.7) вміст Fe не відрізнявся від контрольного рівня в легенях щурів I групи, тоді як II групи (суміш солей металів) – вірогідно перевищував на 12,0 %, III групи (суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла) – на 31,0 %, IV групи (суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла) – на 21,0 % і V групи (суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла) – на 24,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) вірогідне перевищення вмісту Fe було встановлено в легенях щурів II; IV і V груп у середньому на 30,7 %, а I групи – зниження на 29,0 % відповідно.

Тенденцію до зниження вмісту Fe було встановлено на 14-ту добу експерименту (табл. Д.13) в легенях щурів I і II груп, тоді як III, IV і V груп – його значення вірогідно знижувались відносно контролю у середньому на 16,3 % відповідно.

Уміст Мангану на 1-шу добу експерименту (табл. Д.5) в легенях щурів I групи вірогідно знижувався на 73,0 %, тоді як II; III; IV і V груп – перевищував його контрольний рівень у середньому в 2,1 рази.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.8) в легенях щурів I та V груп встановлено вірогідне перевищення вмісту Mn на 69,0 % та 63,0 %; III та IV груп – зниження на 41,0 % та 31,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.11) статистичних змін від контрольних значень за вмістом Mn у легенях щурів I та IV груп не реєстрували, тоді як значення цього показника у легенях щурів II; III та V груп були вірогідно знижені на 82,0 %; 72,0 % та 74,0 % відповідно.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.14) Мангану в легенях щурів III та V груп не було визначено. В інших дослідних групах статистичних змін вмісту елемента від його контрольного рівня не було встановлено.

Динаміка вмісту Купруму у серці дослідних щурів наведена у таблицях Д.3, Д.6, Д.9 і Д.12 Додатку Е. На 1-шу добу експерименту (табл. Е.3) вміст Cu в серці щурів усіх дослідних груп був вірогідно нижчим за контрольні значення, відсоток чого коливався у межах від 12,0 % до 36,0 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.6) статистичних змін вмісту Cu в серці щурів II та V груп не було встановлено, а I та II груп – відбувалось вірогідне його зниження на 53,0 % та 15,0 % та підвищення на 27,0 % в серці тварин IV групи.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.9) Купруму не було виявлено в серці щурів IV та V груп, а I; II та III груп – фіксували його вірогідне зниження на 63,0 %; 29,0 % та 43,0 % відповідно відносно контрольних значень показника.

Подібну картину спостерігали на 14-ту добу експерименту (табл. Д.12): в серці щурів V групи не було виявлено Купруму, а I; II; III та IV груп – вмісту Cu вірогідне знижувався на 99,0 %; 13,0 %; 26,0 % та 14,0 % відповідно відносно контрольних значень показника.

На 1-шу добу експерименту (табл. Д.4) вміст Феруму в серці щурів усіх дослідних груп вірогідно перевищував його контрольний рівень: на 44,0 %; 29,0 %; 30,0 %; 79,0 % і 89,0 % – в тварин I; II; III; IV і V груп відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.7) вміст Fe в серці щурів III групи вірогідно не відрізнявся від контрольного, V групи – був нижчим за контрольний показник на 26,0 %, а I; II та IV груп – вищим на 10,0 %; 11,0 % та 29,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) вірогідне зниження вмісту Fe спостерігали в серці щурів I; II; III та IV груп, відсоток якого становив 32,0 %; 51,0 %; 38,0 % та 45,0 % відповідно. Лише в серці щурів V групи на цей час реєстрували вірогідне підвищення вмісту металу на 29,0 %.

Подібну картину спостерігали на 14-ту добу експерименту (табл. Д.12): вірогідне зниження вмісту Fe спостерігали в серці щурів I; II; III та IV груп,

відсоток якого дорівнював 23,0 %; 77,0 %; 76,0 % та 70,0 %, а V групи – реєстрували вірогідне його підвищення на 23,0 % відповідно.

Тенденцію до підвищення вмісту Мангану спостерігали в серці щурів I та II груп на 1-шу добу експерименту (табл. Д.5). В серці тварин IV групи реєстрували вірогідне зниження вмісту Mn на 36,0 %, а III та V груп – підвищення на 78,0 % та 73,0 % відповідно.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.8) вірогідне зниження вмісту Mn відмічали у серці щурів II; III та V груп на 50,0 %; 39,0 % та 76,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.11) в серці щурів I; II; III; IV та V груп встановлено вірогідне зниження вмісту металу в середньому на 19,0 %; 49,0 %; 54,0 %; 46,0 % та 34,0 % відповідно.

На останньому терміні досліджень (табл. Д.14) вірогідне підвищення вмісту Mn спостерігали в серці щурів I; IV та V груп на 94,0 %; 76,0 % та 155,0 % відповідно.

Провідну роль у виділенні металів в організмі виконують нирки. На 1-шу добу експерименту (табл. Д.3) вміст Купруму вірогідно перевищував контрольний рівень лише в нирках щурів I групи; II, III, IV та V груп – вірогідних змін показника металу не було встановлено.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.6) тенденцію до підвищення вмісту Cu спостерігали в нирках щурів II; III та IV груп, а I та V груп – вірогідне перевищення його контрольних значень на 98,0 % та 31,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.9), навпаки, у нирках щурів I та V груп спостерігали тенденцію до зниження вмісту Cu, тоді II, III та IV груп – вірогідне підвищення його вмісту на 58,0 %, 17,0 % та 37,0 % відповідно.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.12) вірогідне підвищення вмісту Cu відмічали в нирках щурів усіх дослідних груп, зокрема, в I групі щурів (суміш NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла) – на 26,0 %, II (суміш солей металів, 0,3 мг/кг маси тіла) – на 18,0 %, III (суміш NPMe, 1,0 мг/кг маси тіла) – на

10,0 %, IV (суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла) – на 18,0 % і V дослідній групах (суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла) – на 20,0 % відповідно.

Іншою була динаміка розподілення Феруму в нирках експериментальних щурів. На 1-шу добу експерименту (табл. Д.4) значне перевищення вмісту Fe було встановлено в нирках щурів I та II груп – на 33,0 % та 21,0 % відповідно, тоді як у щурів IV і V груп, що отримували підвищені дози суміші NРМе, відмічали вірогідне зниження вмісту елемента на 10,0 % і 9,0 % відповідно відносно контрольного рівня показника.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.7) вірогідне підвищення Fe встановлено в нирках щурів I і V груп на 22,0 % і 17,0 % відповідно, тоді як II та III груп – зниження відносно контрольного рівня на 13,0 % та 11,0 % відповідно.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.10) у нирках щурів I та III груп встановлено вірогідне зниження вмісту Fe на 26,0 % та 25,0 % відповідно, а II, IV і V груп – підвищення його значень на 6,0 %; 7,0 % та 15,0 % відповідно.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.13) вміст Fe в нирках щурів усіх дослідних груп залишався вірогідно вищим за контрольні значення, відсоток чого складав у середньому 21,0 %.

Уміст Мангану на 1-шу добу експерименту (табл. Д.5) вірогідно перевищував його контрольні значення в нирках щурів III групи на 33,0 %, а в інших групах значно не відрізнявся від такого.

На 3-тю добу експерименту (табл. Д.8) вірогідне перевищення вмісту Mn в нирках щурів I та IV груп складало 76,0 % та 27,0 % відповідно, III і V груп – реєстрували лише тенденцію до зниження вмісту металу.

На 7-му добу експерименту (табл. Д.11) статистичних відхилень вмісту Mn від контрольних значень в нирках I, II та V груп не встановлювали, тоді як III і IV груп – його рівень вірогідно знижувався на 24,0 % і 35,0 % відповідно.

На 14-ту добу експерименту (табл. Д.14) вміст Mn в нирках щурів III та V груп вірогідно знижувався на 33,0 % та 35,0 % відповідно, в інших групах – статистичних відхилень від контролю не визначали.

Отримані результати щодо біодоступності зразка суміші NPMe вказують, що загибель щурів протягом 14 діб спостереження була відсутня; максимально можлива введена доза NPMe – 4,0 мг/кг маси тіла; на зміни у клінічному стані у щурів, яким одноразово вводили суміші NPMe у дозах 1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла з 1- по 3-тю добу досліду (за зменшення споживання води та корму); на зміни (здуття шлунку та товстого відділу кишечника) в ШКТ щурів, що отримали суміш NPMe у всьому дозовому діапазоні при патологоанатомічному розтині на всіх термінах досліджень.

Доведено, що «органами-мішенями» біологічного впливу NPMe виявились селезінка та легені, а їх опосередковану дію спостерігали для серця, печінки та нирок за визначенням коефіцієнтів маси внутрішніх органів щурів. Ступінь всмоктування металів з суміші NPMe обернено пропорційно залежав від величини введеної дози, що значно виявилось для вмісту Cu в ШКТ щурів, які отримали суміш NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла, та NPFe – всмоктування в усіх відділах ШКТ впродовж усього терміну досліджень.

Основними «органами-концентраторами» Cu виявились нирки (4,50 мг/кг) та печінка (2,75 мг/кг), Fe – селезінка (309,81 мг/кг) та легені (121,78 мг/кг), Mn – печінка (2,40 мг/кг) відповідно; значна частина металів знаходилась у ШКТ і крові, що потрібно враховувати при дослідженні впливу наночастинок на організм ссавців.

Визначено, що метали у іонній формі всмоктувались швидше і в більшій мірі, але не тривалий час – вже на 3-тю добу їх вміст у більшості органів знижувався, тоді як метали у нанодисперсній формі розподілялись більш тривало (на 14-ту добу досліду їх вміст у більшості органів і тканин перевищував відповідні контрольні значення).

Тобто, за результатами гострого токсикологічного експерименту на білих щурах встановлено, що суміш NPMe у дозовому діапазоні має

біосумісність та високу біодоступність. Але отримані дані недостатньо відображають потенційні токсичні ефекти впливу дослідних NPMе, так як деякі клініко-біохімічні показники крові щурів приходили до фізіологічного рівня наприкінці досліду як при введенні суміші NPMе у фізіологічній дозі (0,3 мг/кг маси тіла), так і підвищеній (2,0 мг/кг маси тіла) відповідно.

Проведені дослідження лише частково можуть ілюструвати можливу токсичну дію суміші NPMе на тварин, але вони стали передумовою для проведення експерименту по визначенню ефектів тривалого (хронічного) впливу суміші NPMе на білих щурів.

3.1.3.2 Визначення біохімічних показників крові та окремих органів білих щурів за дії суміші NPMе порівняно з солями відповідних металів у хронічному токсикологічному експерименті. Хронічний токсикологічний експеримент по визначенню потенційної небезпечності, біосумісності та біодоступності дослідного зразка суміші NPMе проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії *Vistar* (n=80) масою 120–140 г. За принципом аналогів було сформовано 4 групи тварин по 20 щурів у кожній.

Тваринам дослідних груп (II і III групи) задавали з кормом упродовж 90 діб суміш NPMе та суміш солей відповідних металів (I група). Щурам I-ої дослідної групи суміш NPMе задавали у дозі 0,3 мг/кг маси тіла (біотична доза суміші NPMе, встановлена відповідно до попередніх досліджень за умов вивчення гострої токсичності, п. 3.1.3.1), II-ої дослідної групи – розчин суміші солей відповідних металів у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, а III-ої дослідної групи – суміш NPMе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла (найбільш токсична (небезпечна) доза суміші NPMе, встановлена відповідно до попередніх досліджень за умов вивчення гострої токсичності, п. 3.1.3.1) відповідно.

Спостереження за експериментальними тваринами проводили впродовж 90 діб (основний період). На 15-, 30-, 60- і 90-ту добу після згодовування суміші NPMе і суміші солей відповідних металів від 5 тварин з кожної групи після інгаляційного хлороформного наркозу відбирали проби крові з подальшим отриманням плазми крові, а після тотального

знекровлення – органи і тканини – для біохімічних та токсикологічних досліджень відповідно.

Визначення біохімічних маркерів токсичної дії та біосумісності суміші NPMe в організмі білих щурів у хронічному експерименті. Клінічні спостереження за щурами протягом 90 діб показали, що загальний стан організму тварин як контрольної, так і дослідних (I – III групи) був задовільний: щури були рухливі, адекватно реагували на зовнішні подразники. Загибелі тварин за весь термін спостереження не фіксували. Поїдання корму та споживання води щурами в I – III групах не відрізнялись від таких для тварин у контрольній групі.

При визначенні коефіцієнтів маси органів щурів встановлено (табл. 3.17), що вже на 15-ту добу експерименту реєстрували вірогідне підвищення значень коефіцієнтів маси серця, селезінки та печінки щурів, що отримували суміш NPMe в обох дозах.

На 30-ту добу експерименту цей показник залишався підвищеним лише для серця та печінки щурів, яким задавали суміш NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла. Але в щурів, що отримували біотичну дозу суміші NPMe (0,3 мг/кг маси тіла), на цей час збільшення значення коефіцієнту маси на 15,9 % ($P < 0,05$) реєстрували лише для нирок, що свідчить про інтенсивну елімінацію наночастинок металів органами виділення.

На 90-ту добу експерименту були визначені вірогідні зміни коефіцієнтів маси серця, селезінки та нирок в щурів I групи, які отримували розчин солей відповідних металів. Тобто, для металів у іонній формі органами – біологічними мішенями є серце та селезінка.

З метою визначення біосумісності суміші NPMe в порівнянні з розчином суміші солей відповідних металів за умов хронічного аліментарного надходження до організму дослідних щурів проводили дослідження клініко-біохімічних показників їх крові в динаміці 90 діб.

**Рівень значень коефіцієнтів маси внутрішніх органів білих щурів за умов
хронічного введення розчинів суміші солей Me і суміші NPMe
(M±m; n=5)**

Група тварин	Головний мозок	Серце	Селезінка	Печінка	Легені	Нирки
на 15-ту добу експерименту						
контроль	0,96±0,06	0,43±0,04	0,67±0,05	3,97±0,15	1,04±0,09	0,95±0,05
солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла	0,90±0,02	0,51±0,02	0,54±0,03	4,22±0,18	1,29±0,13	1,01±0,05
NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла	1,04±0,15	0,56±0,02*	0,79±0,01*	5,00±0,29*	1,18±0,13	1,03±0,03
NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла	0,99±0,06	0,54±0,03*	0,81±0,05*	5,11±0,11**	1,26±0,14	1,04±0,08
на 30-ту добу експерименту						
контроль	0,84±0,05	0,39±0,01	0,57±0,04	4,20±0,13	0,90±0,03	0,82±0,02
солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла	0,76±0,02	0,39±0,02	0,58±0,04	4,08±0,21	0,98±0,07	0,87±0,03
NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла	0,80±0,03	0,44±0,01	0,60±0,08	4,54±0,12	1,00±0,06	0,95±0,02**
NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла	0,75±0,03	0,45±0,01*	0,55±0,05	4,67±0,14*	0,90±0,04	0,87±0,03
на 60-ту добу експерименту						
контроль	0,70±0,03	0,43±0,02	0,46±0,05	3,46±0,05	0,96±0,04	0,86±0,02
солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла	0,63±0,04	0,44±0,02	0,47±0,02	3,40±0,08	1,02±0,12	0,87±0,04
NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла	0,70±0,03	0,45±0,01	0,46±0,01	3,33±0,08	0,97±0,10	0,90±0,10
NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла	0,65±0,03	0,49±0,01*	0,48±0,01	3,56±0,05	1,98±0,07	0,84±0,02
на 90-ту добу експерименту						
контроль	0,62±0,05	0,46±0,02	0,37±0,02	3,31±0,10	1,11±0,07	0,76±0,03
солі Me, 0,3 мг/кг маси тіла	0,65±0,04	0,40±0,01*	0,46±0,02**	3,28±0,06	1,04±0,09	0,87±0,03*
NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла	0,62±0,02	0,42±0,01	0,38±0,01	3,56±0,09	0,93±0,08	0,84±0,03
NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла	0,63±0,02	0,39±0,01*	0,35±0,02	3,37±0,15	0,89±0,06*	0,82±0,02

Примітка. *, ** – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна при P<0,05 та при P<0,01 відносно його рівня в контрольних тварин

У таблиці 3.18 наведені результати досліджень гематологічних показників крові дослідних щурів у динаміці експерименту.

Рівень лейкоцитів, еритроцитів і гемоглобіну в крові щурів за хронічного введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMе (M±m; n=5)

Група тварин	Термін дослідження, доба			
	15	30	60	90
Лейкоцити, 10 ⁹ /л				
Контроль	9,80±0,42	10,12±1,08	9,98±0,76	10,02±1,02
I дослідна група, солі Me – 0,3 мг/кг	10,04±1,10	9,85±0,56	10,24±1,84	11,06±1,25
II дослідна група, суміш NPMе – 0,3 мг/кг	10,80±1,62	10,88±0,95	11,08±1,67	10,17±0,78
III дослідна група, суміш NPMе – 4,0 мг/кг	11,28±0,86*	12,02±0,34*	12,72±1,15*	9,84±0,40
Еритроцити, 10 ¹² /л				
Контроль	8,00±0,25	8,20±0,39	7,80±0,82	
I дослідна група	8,09±0,80	7,99±0,81	8,09±0,68	
II дослідна група	8,88±0,24	8,91±0,64	6,87±0,52	
III дослідна група	7,05±0,21*	7,18±0,29*	6,09±0,62*	
Гемоглобін, г/л				
Контроль	130,20±5,48	131,00±4,87	131,50±5,18	
I дослідна група	125,40±8,06	127,40±6,34	126,80±10,30	
II дослідна група	127,00±6,20	130,10±5,40	136,08±8,10	
III дослідна група	118,80±10,05	106,00±6,25*	99,60±6,18*	

Примітки: * – різниця значень вірогідна при P<0,05 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Так, встановлено, що починаючи з 15- по 60-ту добу включно, в крові щурів III дослідної групи реєстрували поступове зростання кількості лейкоцитів у середньому від 15,1 % до 27,5 % (P<0,05) відносно рівня цього показника в контрольних тварин. Але на 90-ту добу досліді рівень лейкоцитів у крові тварин цієї групи знижувався та наближався за значенням до контрольного значення.

Кількість лейкоцитів у крові щурів, які одержували композиційну суміш металів у макро- і нанодисперсних формах у дозі 0,3 мг/кг маси тіла (I і II групи), впродовж 90 діб експерименту не зазнавала вірогідних змін, а її значення були близькими до контрольних.

Внаслідок хронічного надходження суміші NPMe у надмірній дозі – 4,0 мг/кг маси тіла (III група) відбувалось вірогідне зниження кількості еритроцитів впродовж всього терміну досліджень, відсоток якого в середньому складав від 11,9 % до 21,9 % від значень такого показника в контролі.

При цьому слід відзначити, що в крові тварин цієї групи (III дослід) на 30- та 90-ту добу дослідження реєстрували зниження рівня загального гемоглобіну в середньому на 19,1 % і 25,9 % ($P < 0,05$) відповідно від його контрольних значень, що вказує на розвиток порушення поповнення клітин еритроцитів гемом.

У крові дослідних щурів I групи впродовж експерименту спостерігали тенденцію також до зниження вмісту загального гемоглобіну, а II групи, навпаки, до його збільшення.

У таблиці 3.19 наведені результати досліджень показників білкового профілю та стану неспецифічної резистентності у плазмі крові експериментальних щурів у динаміці хронічного токсикологічного експерименту.

Встановлено, що вже на 15-ту добу дослідження в плазмі крові щурів, яким задавали суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг, реєстрували вірогідне підвищення вмісту загального білка в середньому на 9,7 %, а у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – зниження на 16,6 % відповідно відносно контрольного рівня цього показника.

Зареєстрована спрямованість змін загального білка залишалась такою до кінця дослідження. Так, в крові щурів, що одержували біотичну дозу суміші NPMe, на 60-ту добу експерименту встановлювали також збільшення рівня загального білка в середньому на 16,2 % ($P < 0,05$), а на 90-ту добу – його значення наближались до контрольних показників.

**Динаміка показників білкового профілю та неспецифічної
резистентності у плазмі крові щурів за хронічного введення розчинів
суміші солей металів і суміші NPMe (M±m; n=5)**

Група тварин	Доба	Загальний білок, г/л	Альбуміни, г/л	Загальні глобуліни, г/л	ЦК, мг/мл	Sm, мг/мл
Контроль	15	60,70±1,83	36,00±0,20	24,70±2,05	0,058±0,005	0,069±0,005
	30	60,90±1,73	38,00±1,40	22,90±1,50	0,068±0,006	0,066±0,008
	60	58,80±3,83	36,40±1,06	22,40±1,12	0,065±0,003	0,070±0,005
	90	61,60±0,43	39,20±1,40	22,40±2,62	0,062±0,004	0,067±0,010
I дослідна група	15	59,30±0,57	35,60±0,82	23,70±2,00	0,066±0,008	0,061±0,007
	30	61,70±2,17	37,20±1,05	24,50±1,25	0,073±0,006	0,071±0,003
	60	62,63±3,87	35,00±2,80	27,63±2,05*	0,068±0,010	0,068±0,006
	90	60,80±2,90	36,20±1,40	24,60±2,50	0,066±0,006	0,068±0,008
II дослідна група	15	64,30±0,70	38,00±1,25	26,30±2,05	0,064±0,003	0,070±0,0068
	30	66,80±3,70*	37,70±2,56	29,10±0,80*	0,070±0,007	0,071±0,004
	60	68,33±1,50*	38,00±2,20	30,33±2,15*	0,067±0,008	0,069±0,010
	90	62,53±1,40	36,50±3,40	26,03±2,25	0,068±0,004	0,066±0,009
III дослідна група	15	62,00±0,90	36,80±3,50	25,20±0,56	0,063±0,010	0,105±0,009*
	30	56,90±2,70	37,80±1,00	19,10±1,64*	0,07±0,01*	0,095±0,010*
	60	53,23±1,83*	35,75±3,00	17,48±1,35*	0,09±0,01*	0,120±0,010*
	90	51,90±0,80*	36,2±2,00*	15,70±1,12*	0,10±0,01*	0,125±0,016*

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

У плазмі крові щурів, які отримували надвисоку дозу суміші NPMe (III дослід), навпаки, рівень загального білка залишався зниженим, відсоток чого на 60-ту та 90-ту добу дослідів дорівнював у середньому 11,2 % та 15,7 % відповідно від такого в контрольних тварин.

Рівень альбумінів у плазмі крові щурів упродовж всього експерименту усіх дослідних груп не зазнавав вірогідних змін відносно їх контрольних значень. Виняток складало вірогідне зниження вмісту альбумінів у плазмі крові щурів III групи на 90-ту добу експерименту в середньому на 7,7 % відносно його контрольних значень.

Але, внаслідок надходження суміші NPMe у дозах 0,3 мг/кг та 4,0 мг/кг маси тіла в протеїнограмі плазми крові щурів вже на 30-ту добу дослідів відбувались зміни рівня загальних глобулінів. Так, у плазмі крові щурів II групи, на фоні підвищення рівня загального білка спостерігали підвищення

вмісту загальних глобулінів у середньому на 27 %, яке залишалось таким й на 60-ту добу експерименту.

У плазмі крові щурів III групи на фоні зниження рівня загального білка, починаючи з 30-ї доби та до 90-ї доби експерименту включно, встановлювали поступове зниження кількості фракцій загальних глобулінів на 18,6–29,9 % ($P < 0,05$) відносно їх рівня в контрольних тварин.

З результатів таблиці 3.19 виявляється, що, починаючи з 30-ї доби та до 90-ї доби включно, визначали вірогідне зростання рівня утворення ЦК середньої молекулярної маси в плазмі крові щурів, які одержували надмірну дозу суміші NPMе, у середньому на 36,1 % відносно їх контрольних значень, а внаслідок потрапляння суміші NPMе та суміші солей металів у дозі 0,3 мг/кг маси тіла рівень цього показника впродовж експерименту знаходився у межах контрольних значень.

Поряд з цим, вміст серомукоїдів у плазмі крові щурів III групи поступово підвищувався впродовж експерименту, починаючи з 15-ї доби: відсоток підвищення рівня серомукоїдів на 15-, 30-, 60- та 90-ту добу досліду складав у середньому 52,2 %; 43,9 %; 73,9 % та 81,2 % відповідно відносно його рівня в контрольних тварин.

Одержані результати, у сукупності з даними динаміки кількості лейкоцитів та показників еритропоезу, щодо змін у протеїнограмі переконливо свідчать про розвиток імуносупресії в організмі щурів внаслідок аліментарного надходження суміші NPMе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла впродовж 90 діб.

Результати дослідження інтенсивності процесів ПОЛ та ОМБ у плазмі крові дослідних щурів у динаміці експерименту наведені в таблиці 3.20.

Дослідженнями встановлено, що хронічне надходження з кормом композиційної суміші металів у різних дисперсних формах викликало у крові дослідних щурів різноспрямовані зміни показників продуктів ПОЛ у динаміці експерименту.

**Динаміка рівня продуктів процесів ПОЛ і похідних ОМБ у плазмі крові
щурів за хронічного введення розчинів суміші солей металів і
суміші NРМе (M±m; n=5)**

Група тварин	Термін дослідження, доба	Інтенсивність ПОЛ, продукти		Інтенсивність ОМБ, карбоксильні похідні	
		ДК, мкмоль/л	МДА, ΔД	НХ, ммоль/г білка	ОХ, ммоль/г білка
Контроль	15	38,9±2,5	5,52±0,20	549,2±64,2	274,2±24,0
	30	41,5±0,7	4,88±0,16	547,4±44,0	300,5±18,0
	60	39,4±3,2	5,11±0,234	597,9±22,8	302,0±34,3
	90	38,2±2,2	5,40±0,67	539,3±33,36	292,2±26,9
I дослідна група	15	39,1±1,2	5,46±0,27	568,2±10,2	285,8±21,8
	30	45,8±2,3	4,41±0,22	498,7±62,6	307,1±36,7
	60	51,2±2,6*	6,89±0,12*	544,2±50,2	277,5±26,8
	90	57,4±3,7*	6,91±0,45*	581,4±52,8	311,0±23,4
II дослідна група	15	37,92±1,5	5,34±0,22	550,1±23,7	277,7±25,0
	30	40,8±0,5	4,80±0,32	573,8±37,4	326,7±18,0
	60	39,5±2,8	5,77±0,20	523,7±41,7	280,7±16,7
	90	28,3±0,8*	5,01±0,28	526,8±26,0	322,6±40,0
III дослідна група	15	35,6±0,2	5,04±0,12	671,7±26,2*	388,2±25,0*
	30	28,0±0,8*	4,02±0,15*	557,9±33,0	328,4±20,5
	60	26,4±0,5*	4,14±0,12*	587,4±25,6	310,5±32,6
	90	25,8±2,5*	3,11±0,06*	556,2±38,6	302,2±24,8

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Так, у щурів, які отримували суміш солей металів (I група), визначали поступове посилення утворення ДК і МДА у плазмі крові, значення яких набували вірогідного збільшення на 60- та 90-ту добу експерименту в середньому на 29,9 і 34,8 % та 50,3 і 28,0 % відповідно відносно їх контрольного рівня.

В організмі щурів внаслідок хронічного потрапляння суміші наночастинок металів реєстрували зворотню картину: в плазмі тварин, що отримували суміш NРМе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла (II група), на 90-ту добу визначали зниження рівня лише показника ДК на 15,9 %, а у дозі 4,0 мг/кг маси тіла (III група) обох показників – ДК і МДА, – починаючи з 30-ої доби

досліджу, в середньому на 30,0 % і 30,4 % ($P < 0,05$) відповідно відносно значень таких показників у контрольних тварин.

Установлено, що на фоні відсутності надлишкового утворення продуктів ліпопероксидації в крові тварин III групи на 15-ту добу експерименту відбувалось вірогідне підвищення вмісту карбоксильних похідних ОМБ (табл. 3.20). Збільшення рівня похідних НХ і ОХ у цей термін досліджень дорівнював 22,3 % і 41,6 % ($P < 0,05$) відповідно відносно їх значень у плазмі контрольних тварин. У плазмі крові щурів I і II груп вірогідних змін інтенсивності процесів ОМБ впродовж експерименту не спостерігали.

При дослідженні рівня показників, що характеризують стан ферментативної ланки та загальної АОС у організмі експериментальних щурів, встановлено (табл. 3.21): за умов аліментарного надходження суміші металів у макро- та нанорозмірній формі у дозі 0,3 мг/кг маси тіла (I і II групи) реєстрували індукування активності індуцибельної каталази.

Таблиця 3.21

Рівень показників антиокиснювальної системи у плазмі крові щурів за хронічного введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMе (M±m; n=5)

Група тварин	Термін дослідження, доба			
	15	30	60	90
Активність каталази, нмоль H ₂ O ₂ /сек мг білка				
Контроль	123,2±10,0	127,2±8,9	126,5±10,8	118,3±8,3
I дослідна група	132,7±13,7	159,4±6,9*	188,7±21,1*	168,7±6,7*
II дослідна група	126,1±11,1	129,3±7,5	139,2±11,8*	108,2±12,6
III дослідна група	100,6±8,2*	94,2±5,8*	97,5±6,0*	117,8±8,8
Загальна АОА, % інгібіції				
Контроль	66,8±4,7	67,6±5,0	69,0±5,8	71,3±4,6
I дослідна група	61,8±8,2	69,0±3,5	74,7±2,5*	68,4±7,8
II дослідна група	72,8±4,6*	79,8±3,13*	73,5±6,2	72,6±4,7
III дослідна група	62,8±6,8	60,3±2,6*	58,0±4,6*	44,2±2,5*

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Установлено, що в плазмі крові щурів I групи збільшення активності каталази відбувалось поступово та на 30-, 60- та 90-ту добу складало в середньому 25,3 %; 49,2 % та 42,6 % ($P < 0,05$) відносно її значень контрольних тварин. Причому, вірогідне посилення активності цього ферменту в крові щурів за надходження суміші наночастинок металів (II група) фіксували лише на 60-ту добу експерименту, тоді як у тварин, що одержали суміш NPMe у максимальній дозі (III група), активність цього ферменту за значенням з часом знижувалась, що дорівнювало через 15, 30 та 60 діб експерименту в середньому 18,3 %; 25,9 % та 22,9 % ($P < 0,05$) відповідно від її контрольних значень.

Зворотну залежність щодо характеру змін активності каталази мав показник загальної АОА плазми крові щурів у динаміці хронічного токсикологічного експерименту (табл. 3.21). У щурів, які одержували композиційні суміші металів у іонній та нанорозмірній формі в дозі 0,3 мг/кг маси тіла (I і II групи), реєстрували вірогідне зростання рівня загальної АОА в щурів I дослідної групи на 60-ту добу, а II – на 15-ту та 30-ту добу в середньому на 8,3 %; 9,0 % та 18,1 % відповідно від її значень в контролі.

Поступове витрачання ресурсів власної (ендогенної) АОА реєстрували в щурів внаслідок впливу суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла, починаючи з 30-ї та до 90-ї доби включно ($P < 0,05$). Найменші значення рівня загальної АОА в плазмі крові щурів III групи встановлювали через 90 діб після впливу суміші NPMe, зниження яких складало 38,0 % від таких у контрольних тварин.

Виходячи з характеру змін інтенсивності утворення похідних ОМБ та продуктів ПОЛ в крові щурів за умов тривалого надходження як суміші солей металів у біотичній дозі (I група), так й суміші NPMe – у максимальній дозі (III група), виявилось недостатньо потенціалу власних ресурсів АОС організму дослідних тварин для запобігання впливу АМК і відповідного включення протективних механізмів.

Але можна зробити висновок щодо прояву антиокиснювальних властивостей суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла впродовж 30 діб. Про це свідчить активація ендогенної АОА на фоні відсутності змін інтенсивності процесів окиснювання в клітинах дослідних щурів.

Значні перебудови у функціональному стані печінки щурів III групи спостерігали, починаючи вже з 15-ї доби експерименту.

Дані, наведені у таблиці 3.22, показують, що уміст глюкози у плазмі крові щурів цієї групи підвищувався до 60-ї доби дослідження включно та на цей час складав 36,1 % ($P < 0,05$) від рівня цього показника в контролі.

Таблиця 3.22

Динаміка рівня глюкози, сечовини та креатиніну в плазмі крові щурів за хронічного введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMe (M±m; n=5)

Група тварин	Термін дослідження, доба			
	15	30	60	90
Глюкоза, ммоль/л				
Контроль	3,37±0,20	3,43±0,18	3,21±0,02	3,49±0,23
I дослідна група	3,50±0,28	3,60±0,33	4,07±0,19*	3,63±0,22
II дослідна група	3,46±0,25	3,53±0,28	3,90±0,16*	3,38±0,36
III дослідна група	3,73±0,26*	4,06±0,20*	4,37±0,24*	3,72±0,16
Сечовина, ммоль/л				
Контроль	5,93±0,46	6,07±0,51	6,04±0,68	6,99±0,25
I дослідна група	6,63±0,51	7,00±0,80	7,32±0,27*	6,71±0,35
II дослідна група	6,03±0,42	6,57±0,80	6,47±0,15	7,45±0,38
III дослідна група	10,05±0,50*	10,67±0,74*	7,72±0,35*	7,84±0,35*
Креатинін, мкмоль/л				
Контроль	159,1±5,7	149,80±8,22	152,3±10,2	160,2±10,5
I дослідна група	160,0±10,1	153,4±10,8	162,0±18,0	188,4±11,1*
II дослідна група	159,8±6,9	138,6±13,45	142,6±8,1	174,8±9,8*
III дослідна група	167,40±8,55	168,3±7,8*	183,8±13,3*	178,5±10,0*

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

У плазмі крові тварин, що отримували композиційну суміш металів у обох дисперсних формах у дозі 0,3 мг/кг маси тіла (I і II групи), уміст глюкози був вірогідно збільшеним лише на 60-ту добу в середньому на

26,8 % і 21,5 % відповідно, що вказує на активацію енергетичного обміну. Через 90 діб спочатку надходження суміші металів у плазмі крові щурів рівень глюкози нормалізувався та був наближеним до контрольних значень.

Установлено, що аліментарне надходження суміші NРМе у максимальній дозі до організму щурів впродовж всього експерименту сприяло посиленню сечовиноутворення вже з 15-ї доби (табл. 3.22). Максимальні значення сечовини (підвищення на 75,8 %) у плазмі крові щурів ІІІ групи фіксували на 30-ту добу, які залишалися вищими за контрольний рівень включно до 90-ї доби дослідіду.

В плазмі крові щурів, яким задавали суміш солей відповідних металів, також визначали підвищення рівня сечовини на 21,2 % ($P < 0,05$) відносно її контрольних значень.

Аліментарне задавання щурам суміші NРМе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла викликало підвищення рівня креатиніну в плазмі крові на 30-, 60- та 90-ту добу експерименту в середньому на 14,8 % ($P < 0,05$), а суміші солей металів і суміші NРМе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла – лише на 90-ту добу на 17,6 % і 9,1 % ($P < 0,05$) відносно його контрольних значень.

Результати досліджень динаміки активності основних гепатоспецифічних ферментів у крові експериментальних тварин наведені в таблиці 3.23.

Так, у плазмі крові щурів, яким задавали суміш солей металів, встановлювали посилення активності АлАТ, АсАТ, ГГТП – на 60-ту і 90-ту добу, а ЛФ – лише на 90-ту добу експерименту ($P < 0,05$) відносно значень активності таких ензимів у контрольних тварин.

У плазмі крові щурів внаслідок надходження суміші NРМе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла визначали незначну активацію лише АсАТ і ГГТП на 11,0 % і 7,2 % – на 60-ту та 90-ту добу дослідіду відповідно.

На виражений токсичний вплив тривалого надходження суміші NРМе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла вказує зареєстрована поступова активація АлАТ і ЛФ впродовж всього дослідіду, максимальний відсоток якої встановлювали на 60-

ту добу – 96,8 % і 69,1 % відповідно. У саме цей термін досліджень у крові щурів III групи також фіксували пік активації АсАТ і ГГТП в середньому на 14,8 % і 22,3 % ($P < 0,05$) відносно значень таких в контрольних тварин.

Таблиця 3.23

**Динаміка активності гепатоспецифічних ензимів у плазмі крові щурів за
хронічного введення розчинів суміші солей металів і суміші NPMе
($M \pm m$; $n=5$)**

Група тварин	Термін дослідження, доба	АЛАТ, мкмоль/год мл	АсАТ, мкмоль/год мл	ГГТП, ммоль/год л	ЛФ, нмоль/сек л
Контроль	15	1,45±0,14	1,28±0,05	2,46±0,16	2396,5±118,2
	30	1,43±0,07	1,30±0,06	2,55±0,12	2390,0±184,0
	60	1,56±0,12	1,42±0,05	2,60±0,05	1940,2±188,4
	90	1,75±0,05	1,40±0,09	2,65±0,06	2122,8±142,8
I дослідна група	15	1,48±0,06	1,33±0,16	2,60±0,31	2442,6±108,0
	30	1,45±0,08	1,31±0,04	2,70±0,12	2394,0±130,0
	60	1,90±0,10*	1,52±0,03*	3,08±0,04*	2275,3±127,9
	90	2,61±0,11*	1,54±0,06*	3,12±0,12*	2917,3±119,9*
II дослідна група	15	1,53±0,13	1,27±0,09	2,58±0,11	2456,4±151,5
	30	1,49±0,08	1,35±0,12	2,65±0,30	2365,0±145,0
	60	1,66±0,10	2,02±0,06*	2,58±0,08	2017,3±124,9
	90	1,83±0,11	1,92±0,05	2,84±0,06*	2088,0±112,5
III дослідна група	15	1,61±0,06*	1,32±0,06	2,63±0,04	3189,1±204,0*
	30	1,65±0,08*	1,35±0,08	3,00±0,20*	3278,9±165,6*
	60	3,07±0,13*	1,63±0,10*	3,18±0,10*	3280,7±81,6*
	90	1,05±0,10*	1,55±0,12*	2,82±0,32	3192,9±105,8*

Примітка. * – різниця значень вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Отримані результати щодо динаміки показників функціонального стану печінки характеризують ступінь прояву гепатотоксичного впливу суміші металів, особливо у нанодисперсній формі (III група), та узгоджуються з патологоанатомічною картиною органних змін в організмі щурів за хронічного аліментарного експерименту.

За результатами клініко-біохімічних досліджень під час хронічного токсикологічного експерименту на білих щурах можна стверджувати про біосумісність та адаптогенну дію суміші NPMе (Ag, Cu, Fe, MnO₂) у дозі

0,3 мг/кг впродовж 30 діб та вважати її як біотичну в порівнянні з сумішю солей відповідних металів у аналогічній дозі.

Отже, механізм токсичної дії суміші металів у іонній та нанодисперсній формах, максимальну вираженість якої встановлювали в організмі щурів вже на 30-ту добу досліду, полягає у формуванні оксидативного стресу та розвитку запальних процесів з ознаками імуносупресії, що супроводжуються цитотоксичним ураженням печінки на тлі зниження ємності ендогенних ресурсів АОС і надмірного утворення токсичних похідних ОМБ, та узгоджується з характером патологоанатомічних і змін коефіцієнтів маси органів тварин ($P < 0,05$).

На 90-ту добу експерименту були визначені вірогідні зміни коефіцієнтів маси серця, селезінки та нирок у щурів I групи, які отримували розчин солей відповідних металів.

Слід зауважити, що вищу біодоступність мають NPMe порівняно з металами у іонній формі. Суміш солей металів і суміш NPMe у біотичній дозі елімінуються через нирки, а суміш NPMe у максимальній дозі (4,0 мг/кг маси тіла) є тропною для серцевого м'язу та легенів.

Визначення біодоступності суміші NPMe за вмістом Купруму, Феруму та Мангану в органах білих щурів у хронічному токсикологічному експерименті. Результати визначення розподілення та накопичення Купруму, Феруму та Мангану в органах експериментальних щурів зведені в таблицях 3.24 – 3.35.

Уміст Купруму в шлунку дослідних щурів на 15-ту добу експерименту (табл. 3.24) вірогідно перевищував його контрольні значення в I та II групах у середньому на 50,4 та 70,1 %, тоді як в III – не відрізнявся від контролю.

На 30-ту добу досліду (табл. 3.25), навпаки, рівень Cu в шлунках щурів I та II груп вірогідно знижувався відносно контрольного на 38,8 та 20,7 % відповідно, а III групи – реєстрували тенденцію до підвищення його вмісту.

Уміст Купруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 15-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш NPMe, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	2,42±0,28	3,64±0,39**	4,14±0,09**	2,32±0,02
Тонкий к-к	4,34±0,04	3,75±0,03***	5,24±0,07***	3,64±0,13**
Товстий к-к	7,08±0,09	10,07±0,15***	5,50±0,11***	7,82±0,12**
Печінка	0,48±0,01	2,03±0,07***	1,30±0,12**	0,39±0,01*
Селезінка	0,43±0,02	0,38±0,02	1,20±0,19*	1,49±0,19***
Серце	2,36±0,08	2,12±0,07	2,27±0,06	2,40±0,03
Легені	0,18±0,06	0,23±0,02	0,30±0,01	0,20±0,01
Нирки	4,84±0,25	5,13±0,60	2,96±0,06**	2,99±0,09**
Плазма крові	1,27±0,01	2,15±0,15**	1,40±0,03**	1,70±0,03**

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ та *** – $P < 0,001$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Таблиця 3.25

Уміст Купруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 30-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	3,15±0,08	2,27±0,03***	2,61±0,01**	3,37±0,02
Тонкий к-к	3,62±0,03	3,86±0,11	4,41±0,20*	4,32±0,10**
Товстий к-к	5,67±0,08	12,52±0,13***	8,35±0,20***	5,83±0,19
Печінка	1,21±0,11	0,70±0,13*	0,93±0,04	1,48±0,06
Селезінка	0,68±0,08	1,04±0,15*	1,51±0,26*	1,18±0,07**
Серце	2,16±0,09	2,41±0,08	1,64±0,03**	2,24±0,23
Легені	0,18±0,01	0,18±0,01	0,23±0,07	0,25±0,01*
Нирки	4,67±0,20	4,25±0,06	5,22±0,13	4,12±0,12
Плазма крові	1,31±0,07	1,80±0,02*	1,81±0,10*	2,13±0,09**

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ та *** – $P < 0,001$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Максимальний вміст Cu в шлунках щурів спостерігали на 60-ту добу експерименту (табл. 3.26) у щурів II групи, що свідчить про високу біологічну активність наночастинок металу в біотичній дозі.

Таблиця 3.26

Уміст Купруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMе і суміш солей металів, на 60-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	3,76±0,03	4,27±0,02***	6,65±0,07***	5,94±0,07***
Тонкий к-к	2,17±0,10	4,26±0,11***	4,33±0,14***	2,78±0,05**
Товстий к-к	5,21±0,05	17,77±0,06***	5,39±0,11	7,00±0,18***
Печінка	2,24±0,09	1,33±0,06**	1,63±0,15*	2,08±0,00
Селезінка	2,35±0,18	2,31±0,11	2,64±0,05	2,73±0,11
Серце	2,32±0,08	2,20±0,02	1,36±0,02***	1,75±0,08***
Легені	0,26±0,03	0,23±0,02	0,23±0,02	0,56±0,02***
Нирки	4,22±0,08	3,75±0,02**	3,86±0,05*	4,05±0,09
Плазма крові	1,40±0,08	2,51±0,02***	2,61±0,17**	2,57±0,05***

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ та *** – $P < 0,001$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

На даному терміні досліджень вірогідне підвищення вмісту елементу було у щурів усіх дослідних груп: I – на 11,9 %, II – на 43,5 % і III групи – на 36,7 % відповідно.

Подібного характеру біодоступність реєстрували щодо розподілення та накопичення Купруму і на 90-ту добу після введення препаратів металів (табл. 3.27).

У шлунках щурів, які отримували суміш NPMе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла вміст Cu вірогідно перевищував контрольний на 19,5 %, тоді як у тварин, яким задавали NPMе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – його вміст мав лише тенденцію до підвищення, а яким задавали суміш солей відповідних металів – вірогідно знижувався на 15,4 % відповідно.

Уміст Купруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NРМе і суміш солей металів, на 90-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	3,89±0,04	3,37±0,03***	4,83±0,05***	4,07±0,10
Тонкий к-к	3,46±0,05	3,70±0,18	2,96±0,04	3,28±0,13
Товстий к-к	6,00±0,03	18,12±0,07***	7,37±0,13***	5,89±0,09
Печінка	2,60±0,07	1,95±0,18*	1,98±0,10**	2,81±0,24
Селезінка	2,35±0,10	2,96±0,26	2,69±0,09	3,68±0,15**
Серце	2,44±0,21	2,93±0,08	2,29±0,05	2,45±0,06
Легені	0,27±0,02	0,34±0,01	0,33±0,02	0,40±0,02*
Нирки	4,54±0,38	4,32±0,09	4,65±0,10	4,89±0,22
Плазма крові	2,24±0,02	2,25±0,03	2,38±0,07	2,67±0,04***

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ та *** – $P < 0,001$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Отримані дані свідчать про можливість всмоктування і накопичення (фіксації) наночастинок Си в шлунку щурів при введенні їх у біотичній дозі.

Децю іншу динаміку спостерігали при визначенні вмісту Феруму в шлунках дослідних щурів (табл. 3.28 – 3.31).

На 15-ту добу експерименту вміст Fe (табл. 3.28) в шлунках дослідних щурів усіх груп вірогідно зростав відносно контрольного: I групи – на 29,6 %, II – на 33,5 % і III – на 41,5 % відповідно, що вказує на наявність дозалежного ефекту відносно накопичення цього металу.

На 30-ту ж добу експерименту (табл. 3.29) спостерігали вірогідне зниження вмісту Fe в шлунках щурів I, II і III груп на 33,7 %; 7,1 % і 37,8 % відповідно відносно контролю, тоді як на 60-ту добу (табл. 3.30) – вірогідних змін вмісту металу не було визначено. Слід відмітити динаміку до підвищення вмісту Fe в шлунках щурів III дослідної групи та зниження в I та II груп відповідно.

Уміст Феруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 15-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	22,82±1,86	32,42±1,00**	34,32±0,09**	39,00±0,68**
Тонкий к-к	35,23±0,95	36,76±0,84	27,87±0,15**	25,97±0,21***
Товстий к-к	80,73±1,15	73,06±0,76**	55,78±0,61***	88,66±0,33**
Печінка	44,86±1,65	67,55±1,23***	73,57±1,69***	73,47±1,01***
Селезінка	177,92±4,85	217,48±5,66**	149,60±3,81**	120,69±3,70***
Серце	83,78±0,42	87,16±2,02	82,26±0,50	96,99±0,42***
Легені	102,25±0,61	137,02±0,61***	87,88±2,33**	85,74±1,20**
Нирки	65,39±1,64	70,67±3,00	52,57±0,31**	63,90±0,35
Плазма крові	6,68±0,32	6,39±0,10	3,48±0,09***	5,23±0,21*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05, ** – P<0,01 та *** – P<0,001 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Таблиця 3.29

Уміст Феруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 30-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	39,85±0,45	29,80±0,10***	37,22±0,08**	28,92±0,67***
Тонкий к-к	31,60±1,22	32,79±0,24	24,16±0,65**	20,93±0,14**
Товстий к-к	70,07±0,91	104,76±2,92***	93,32±0,52***	45,15±0,35***
Печінка	92,96±1,39	71,29±0,20***	105,99±0,85**	99,31±1,69*
Селезінка	251,92±5,06	270,23±4,47	229,52±8,38	151,20±5,38***
Серце	77,35±1,69	64,46±0,85**	97,25±2,04**	101,82±2,01***
Легені	85,76±1,25	94,77±0,15**	115,35±1,19***	120,42±0,60***
Нирки	79,49±1,54	90,37±0,46**	75,79±0,21	53,71±0,58***
Плазма крові	5,14±0,30	3,89±0,07*	7,08±0,27**	6,77±0,12**

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05, ** – P<0,01 та *** – P<0,001 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Уміст Феруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 60-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	40,58±0,57	38,42±0,55	38,68±0,80	42,50±1,20
Тонкий к-к	28,31±0,38	36,22±0,89**	32,09±0,60*	27,54±0,70
Товстий к-к	64,36±1,13	109,45±3,59***	62,07±1,24	75,45±2,04**
Печінка	158,62±4,16	180,44±3,38*	122,55±2,16**	110,29±2,72***
Селезінка	371,69±4,34	524,21±5,03***	274,20±6,51***	334,45±6,26**
Серце	104,00±1,10	100,69±1,12	121,95±0,71***	104,04±0,45
Легені	125,80±1,23	144,20±3,26**	130,91±2,83	135,85±0,50**
Нирки	61,95±0,40	61,68±0,52	62,52±0,39	61,52±0,99
Плазма крові	9,43±0,14	9,55±0,27	10,80±0,04***	15,81±0,05***

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05, ** – P<0,01 та *** – P<0,001 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Таблиця 3.31

Уміст Феруму в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 90-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	32,27±0,31	50,87±0,81***	54,64±0,23***	40,07±0,21***
Тонкий к-к	21,36±0,21	25,77±0,41***	23,57±0,34*	26,71±0,59**
Товстий к-к	62,21±0,59	77,92±2,00**	86,52±1,23***	54,64±0,71**
Печінка	131,55±2,20	144,65±4,04*	110,60±1,67*	111,33±3,37**
Селезінка	427,51±8,55	475,90±5,22**	413,10±4,87	454,52±6,78*
Серце	71,99±0,45	71,92±0,77	81,62±0,83**	69,25±1,08
Легені	163,20±3,10	160,01±1,25	143,64±1,17**	155,54±1,13
Нирки	79,63±0,29	125,17±4,64***	73,54±0,62***	70,94±0,87***
Плазма крові	11,70±0,10	12,79±0,25*	14,98±0,24***	14,52±0,27***

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05, ** – P<0,01 та *** – P<0,001 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

На 90-ту добу експерименту максимальним вміст Феруму (табл. 3.31) був у шлунках щурів II групи, які отримували суміш NPMe у біотичній дозі, і вірогідно перевищував контрольний на 40,9 %.

Дещо меншим був вміст Fe в шлунках щурів, які отримували суміш солей металів, і вірогідно перевищував контрольний на 36,6 %. Мінімальним, але вищим на 19,5 % за контрольний рівень, був вміст елементу в шлунках щурів, які отримували суміш NPMe у надвисокій дозі (4,0 мг/кг маси тіла).

Результати визначення вмісту Мангану в шлунках щурів у динаміці експерименту наведені у таблицях 3.32 – 3.35.

На 15-ту добу експерименту вміст Мангану (табл. 3.32) був вірогідно вищим за контрольний в шлунках щурів дослідних груп, які отримували суміш NPMe в обох дозах, на 72,1 % та 68,2 % відповідно, тоді як у тварин, яким задавали суміш солей металів – статистичних змін показника не встановлювали.

На 30-ту добу експерименту також не встановлювали вірогідних змін вмісту Mn (табл. 3.33) у тварин I групи, які отримували суміш солей металів, а II і III груп – реєстрували його вірогідне зниження на 23,7 % та 14,3 % відповідно.

На 60- та 90-ту добу експерименту вміст Mn (табл. 3.34 та 3.35) за накопиченням у шлунках дослідних щурів мав однакову динаміку.

Так, у шлунку тварин I групи (суміш солей металів) не встановлювали вірогідних змін вмісту Mn у порівнянні з контролем, тоді як II і III груп (суміш NPMe в обох дозах) – його рівень вірогідно зростав відносно контрольного на 81,3 % та 81,5 % (60-та доба дослідження) і на 85,8 та 89,1 % (90-та доба дослідження) відповідно.

Отримані дані свідчать про те, що наночастинки двоокису мангану здатні довше, ніж відповідна їх іонна форма затримуватися в шлунку щурів.

Уміст Мангану в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe суміш солей металів, на 15-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	1,29±0,06	1,56±0,12	4,63±0,11***	4,06±0,01***
Тонкий к-к	2,93±0,02	2,27±0,09*	5,18±0,14***	2,83±0,07
Товстий к-к	23,87±0,51	23,27±0,34	20,34±0,23**	30,13±0,12***
Печінка	1,78±0,09	2,29±0,04**	1,99±0,04*	1,52±0,01*
Селезінка	0,86±0,04	0,96±0,07	1,07±0,03*	0,58±0,04**
Серце	0,22±0,01	0,23±0,02	0,24±0,01	0,28±0,01*
Легені	0,06±0,00	0,08±0,01	0,08±0,01	0,03±0,00***
Нирки	1,37±0,06	1,31±0,06	0,59±0,02***	0,76±0,10**
Плазма крові	0,11±0,00	0,15±0,01*	0,17±0,01**	0,14±0,00**

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05, ** – P<0,01 та *** – P<0,001 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Таблиця 3.33

Уміст Мангану в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 30-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	7,66±0,22	7,57±0,15	6,19±0,08**	6,70±0,22*
Тонкий к-к	3,97±0,10	3,99±0,03	3,99±0,04	3,73±0,09
Товстий к-к	23,64±0,32	34,56±1,00***	34,01±0,24***	27,24±0,43**
Печінка	2,36±0,01	1,76±0,13*	1,82±0,16*	1,78±0,18*
Селезінка	1,18±0,08	1,30±0,27	0,85±0,05*	0,64±0,03**
Серце	0,32±0,00	0,34±0,02	0,20±0,02**	0,28±0,02
Легені	0,11±0,03	0,09±0,00	0,25±0,02*	0,25±0,02*
Нирки	0,49±0,05	0,91±0,05**	0,55±0,06	0,59±0,01
Плазма крові	0,25±0,02	0,25±0,02	0,19±0,01*	0,22±0,02

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при P<0,05, ** – P<0,01 та *** – P<0,001 відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Таблиця 3.34

Уміст Мангану в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 60-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	1,53±0,09	1,43±0,03	8,18±0,42***	8,25±0,24***
Тонкий к-к	3,72±0,15	3,42±0,09	8,32±0,30***	4,45±0,10*
Товстий к-к	24,71±0,31	24,45±0,76	21,02±0,82*	29,47±0,69**
Печінка	3,11±0,09	2,43±0,05**	1,95±0,03***	2,91±0,10
Селезінка	0,65±0,04	0,79±0,04	0,81±0,05	0,89±0,05*
Серце	0,14±0,00	0,11±0,02**	0,13±0,01	0,20±0,01***
Легені	0,16±0,02	0,46±0,03***	0,14±0,03	0,27±0,02*
Нирки	0,64±0,02	0,35±0,01***	0,53±0,02*	0,62±0,07
Плазма крові	0,19±0,02	0,31±0,01**	0,48±0,05**	0,60±0,02***

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ та *** – $P < 0,001$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Таблиця 3.35

Уміст Мангану в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів, які отримували різні дози суміші NPMe і суміш солей металів, на 90-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група	II дослідна група	III дослідна група
Шлунок	0,72±0,06	0,75±0,01	5,06±0,23***	6,61±0,05***
Тонкий к-к	3,12±0,08	1,80±0,21**	3,14±0,06	1,93±0,02***
Товстий к-к	24,25±0,11	25,15±0,39	33,77±0,53***	22,34±0,07***
Печінка	2,39±0,12	2,75±0,18	2,54±0,01*	3,37±0,28*
Селезінка	0,78±0,03	1,16±0,10*	0,83±0,06	0,81±0,12
Серце	0,20±0,01	0,16±0,01*	0,30±0,00***	0,20±0,01
Легені	0,16±0,01	0,15±0,02	0,15±0,02	0,19±0,01
Нирки	0,63±0,04	0,66±0,03	0,85±0,02**	0,59±0,13
Плазма крові	0,19±0,01	0,22±0,01	0,27±0,02*	0,25±0,01*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$ та *** – $P < 0,001$ відносно значень такого показника у контрольних тварин.

Наступним відділом ШКТ, через який проходить корм, як відомо є тонкий відділ кишечника. Саме в ньому відбувається всмоктування більшості поживних речовин, а також металів.

Динаміка вмісту Купруму в тонкому відділі кишечника щурів представлена в таблицях 3.24 – 3.27.

На 15-ту добу експерименту вміст Купруму (табл. 3.24) в тонкому відділі кишечника щурів змінювався наступним чином: I та III груп – його рівень знижувався відносно контрольного на 13,6 % та 19,2 % відповідно, тоді як II групи – був вищим ніж у контрольних тварин у середньому на 17,2 %.

На 30-ту добу експерименту вміст Cu (табл. 3.25) в тонкому відділі кишечника щурів I дослідної групи, які отримували солі металів, мав лише тенденцію до підвищення, а II і III груп, щури яким задавали суміш NPMе в обох дозах, вірогідно зростав на 17,9 % і 16,2 % відносно його контрольних значень.

На 60-ту добу експерименту (табл. 3.26) також спостерігали вірогідне підвищення вмісту Cu в тонкому кишечнику щурів усіх дослідних груп: I групи – на 49,1 %, II і III – на 49,8 % і 21,9 % відповідно.

На останньому терміні досліджень (90-та доба експерименту) статистичних змін вмісту металу в тонкому кишечнику щурів не визначали, але тенденцію до зниження його рівня реєстрували в щурів груп, що отримували суміш NPMе.

Уміст Феруму в тонкому кишечнику щурів мав наступну динаміку, результати якої наведені у таблицях 3.28 – 3.31.

Так, на 15- та 30-ту добу експерименту вміст Fe (табл. 3.28 і 3.29) в тонкому кишечнику щурів I групи, яким задавали суміш солей металів, вірогідно не відрізнявся від контрольних значень, але мав тенденцію до підвищення, а у щурів, які отримували суміш NPMе в обох дозах, на цей час визначали вірогідне зниження його вмісту на 26,4 і 35,6 % та на 30,8 і 51,0 % відповідно.

На 60-ту добу досліду вміст Fe (табл. 3.30) в тонкому кишечнику щурів, які отримували солі металів і NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, вірогідно збільшувався на 21,8 % і 11,8 %, тоді як у щурів, які отримували NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – статистично не відрізнявся від контрольного рівня.

На 90-ту добу досліду вміст Fe (табл. 3.31) в тонкому відділі кишечнику тварин усіх дослідних груп вірогідно збільшувався відносно контрольного наступним чином: I групи – на 17,1 %, а II і III – на 9,4 % і 20,0 % відповідно.

У таблицях 3.32 – 3.35 наведені результати динаміки вмісту Мангану в тонкому кишечнику щурів. На 15-ту добу експерименту (табл. 3.32) встановлювали вірогідне перевищення вмісту Mn в тонкому кишечнику щурів II групи на 43,4 %, тоді як у тварин I групи його рівень вірогідно знижувався на 29,1 %, а III – статистично не відрізнявся від контрольного.

На останньому терміні досліджень вміст Мангану (табл. 3.35) в тонкому кишечнику щурів не відрізнявся від його контрольних значень в II групі та вірогідно знижувався в I і III групах на 73,3 % та 61,7 % відповідно.

Товстий кишечник є останнім відділом травного тракту, з яким можуть мати прямий контакт як наночастинки металів, що не всмокталися, так і їх макродисперсні форми. Окрім того, до товстого кишечнику відбувається виділення елементів, які вже пройшли процес біотрансформації.

Слід зазначити, що у товстому кишечнику щурів I дослідної групи, які отримували суміш солей металів, значення вмісту Купруму (табл. 3.24 – 3.27) були вірогідно вищими за контрольні впродовж усього експерименту: на 15-ту добу – на 29,7 %, 30-ту – на 54,7 %, 60- і 90-ту – на 70,68 % і 66,9 % відповідно.

Тоді як у щурів II та III дослідних груп, яким задавали суміш NPMe у дозах 0,3 та 4,0 мг/кг маси тіла, реєстрували наступну динаміку: на 15-ту добу вміст Cu вірогідно знижувався у товстому кишечнику щурів II групи на 28,7 %, а III – перевищував його контрольний рівень на 9,5 %.

На 30-ту добу експерименту (табл. 3.25), навпаки, у щурів II групи вміст Cu в товстому кишечнику зростав на 32,1 %, а III – статистично не змінювався відносно його контрольного рівня.

На 60-ту добу (табл. 3.26) вірогідне підвищення вмісту металу знову визначали в щурів III групи, на 25,6 %, а II – статистичних відхилень його рівня не встановлювали.

На 90-ту добу (табл. 3.27) знову відмічали подібну до 30-ї доби картину накопичення в товстому кишечнику вмісту Cu: його вірогідне збільшення у щурів II групи на 18,6 %, а III – відсутність його статистичних змін.

При дослідженні вмісту Феруму в товстому кишечнику щурів встановлено динаміку подібну вмісту Купруму в тварин, які отримували NPMe (табл. 3.28 – 3.31).

Так, вірогідне підвищення Fe визначали у щурів III групи на 15- та 60-ту добу на 8,94 та 14,7 % відповідно (табл. 3.28 і 3.30), тоді як II групи – на 15-ту добу його рівень в товстому кишечнику знижувався на 44,7 %, а на 60-ту – не відрізнявся від контрольного.

На 30-ту (табл. 3.29) і 90-ту добу (табл. 3.31) експерименту, навпаки, в товстому кишечнику щурів III групи встановлювали вірогідне зниження вмісту Fe на 55,19 % і 13,9 %, тоді як II групи – перевищення на 24,9 % та 28,1 % відповідно відносно його контрольного рівня.

У товстому кишечнику щурів I групи визначали вірогідне зниження вмісту Fe на 10,5 % лише на 15-ту добу досліду (табл. 3.29), а на інших термінах (30-, 60- і 90-та доба) – підвищення на 33,1 %; 41,2 % і 20,2 % відповідно від таких значень у контролі.

При дослідженні вмісту Мангану в товстому кишечнику щурів I та III груп було виявляли іншу динаміку в порівнянні з Купрумом і Ферумом (табл. 3.32 – 3.35).

Тоді як у щурів II групи, які отримували суміш NPMe у біотичній дозі, динаміка Mn була подібною до Cu і Fe: вірогідне зниження вмісту

реєстрували на 15- і 60-ту добу та підвищення на 30- і 90-ту добу дослідів відповідно на 17,4 і 17,6 % та 30,5 і 28,2 % відповідно відносно контролю.

У I групі щурів вірогідне підвищення вмісту Mn на 31,6 % встановлювали лише на 30-ту добу експерименту (табл. 3.33), на 60- та 90-ту добу (табл. 3.34 і 3.35) – статистичних змін цього показника не визначали.

У товстому кишечнику щурів III групи на 15-, 30- та 60-ту добу експерименту визначали вірогідне підвищення вмісту Mn на 20,8 %, 13,2 % та 16,2 %, а на 90-ту – зниження на 8,5 % відповідно відносно контролю.

Наступною тканиною організму, що контактує з наночастинками є кров. Вміст Купруму, Феруму і Мангану визначали в плазмі крові, результати чого представлені в таблицях 3.24 – 3.35.

Слід відмітити, що в плазмі крові щурів, які отримували NkMe, вміст Cu вірогідно збільшувався впродовж усього експерименту (табл. 3.24 – 3.27), а в тварин, які отримали солі металів – лише з 15- по 60-ту добу включно.

На 15-ту добу експерименту максимальне збільшення значень Cu (табл. 3.24) спостерігали в плазмі крові щурів I групи (на 40,9 %), тоді як II і III груп – лише на 9,3 % і 25,3 % відносно їх контрольного рівня.

На 30-ту добу експерименту вмісту Cu (табл. 3.25) в плазмі крові щурів I, II і III груп вірогідно перевищував його контрольні значення на 27,2 %, 27,6 % і 38,5 %, а на 60-ту добу (табл. 3.26) – перевищення становило 44,2 %, 46,4 % і 45,5 % відповідно.

На 90-ту добу вміст Cu (табл. 3.27) в плазмі крові щурів, які отримували суміш солей металів та суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, статистично не відрізнявся від контрольного, тоді як у щурів, які отримували NPMe в дозі 4,0 мг/кг маси тіла, перевищував такий на 16,1 % відповідно.

Динаміка вмісту Феруму в плазмі крові (табл. 3.28 – 3.31) мала інший характер спрямованості впродовж експерименту: на 15-ту добу рівень показника в щурів, які отримували суміш солей металів, не відрізнявся від

контрольного, а в тварин, які отримували суміш NPMe, – був вірогідно нижчим у II та III групах на 91,9 % та 27,7 % відповідно.

У подальші терміни експерименту вміст Fe (табл. 3.29 і 3.30) в плазмі крові щурів, які отримували суміш NPMe, збільшувався у II та III групах на 27,4 і 12,7 % та на 24,1 і 40,4 % відповідно відносно контролю. У щурів, які отримували солі металів, вміст елементу, навпаки, знижувався за контрольні значення на 32,1 % на 30-ту добу та не відрізнявся від таких на 60-ту добу експерименту.

Наприкінці експерименту вміст Fe (табл. 3.31) в плазмі крові щурів усіх дослідних груп вірогідно перевищував його контрольний рівень: I – на 8,5 %, II – 21,9 % і III групі – на 19,4 % відповідно.

У таблицях 3.32 – 3.35 наведені результати дослідження вмісту Мангану в плазмі крові щурів. На 15-ту добу експерименту вміст елементу (табл. 3.32) в плазмі крові щурів усіх груп вірогідно перевищував контрольний: I – на 26,7 %, II – 35,3 % і III групи – на 21,4 % відповідно.

На 30-ту добу експерименту вміст Mn в плазмі крові щурів (табл. 3.33) I групи статистично не відрізнявся від контрольного рівня, тоді як у тварин II – вірогідно знижувався від такого на 31,6 %, III – мав тенденцію до зниження.

На 60-ту добу динаміка рівня Mn (табл. 3.34) була подібною такої на 15-ту добу експерименту: вірогідне перевищення відносно контролю спостерігали у плазмі крові щурів I групи – на 38,7 %, II – на 60,4 % і III – на 99,7 % відповідно.

Тенденцію до підвищення вмісту Mn в плазмі крові щурів I дослідної групи реєстрували на 90-ту добу експерименту (табл. 3.35), а II та III груп – рівень показника вірогідно збільшувався на 29,6 та 24,0 % відповідно відносно контролю.

Після всмоктування в кров всі речовини проходять через печінку. Так, вміст Купруму в печінці на 15-ту добу досліду (табл. 3.24) вірогідно

збільшувався в щурів I і II груп у середньому на 76,4 % і 63,08 %, тоді як III групи – знижувався на 23,1 % відносно його контрольного рівня.

На 30-ту добу експерименту в печінці щурів III групи (табл. 3.25), які отримували суміш NPMе в умовно-токсичній дозі, спостерігали вірогідне підвищення вмісту Cu на 18,2 %, тоді як у тварин I та II дослідних груп – він вірогідно знижувався на 72,8 % та 30,1 % відповідно відносно контролю.

На 60-ту добу експерименту в печінці щурів I та II груп (табл. 3.26), які отримували солі металів та суміш NPMе в дозі 0,3 мг/кг маси тіла, вміст Cu продовжував знижуватись на 68,4 % та 37,4 %, тоді як у печінці III групи – мав лише тенденцію до зниження.

Подібну динаміку щодо вмісту Cu в печінці спостерігали на останньому терміні досліджень (табл. 3.27) – вірогідне зниження показника в щурів I та II груп складало 33,3 % та 31,3 %, тоді як у III групі – він статистично не відрізнявся від контрольних значень.

На 15-ту добу експерименту вміст Fe в печінці щурів усіх дослідних груп (табл. 3.28) вірогідно збільшувався відносно контрольного на 33,6 %; 39,0 % і 38,9 % (I, II і III групи) відповідно.

На 30-ту добу експерименту вміст Fe в печінці щурів I дослідної групи (табл. 3.29) вірогідно знижувався на 30,4 %, тоді як II та III груп – збільшувався на 12,4 % та 6,4 % відповідно відносно контролю.

На 60- і 90-ту добу експерименту (табл. 3.30 і 3.31) спостерігали подібну динаміку: вірогідне підвищення вмісту Fe в печінці щурів I групи дорівнювало 12,1 % та 9,1 %, а зниження в тварин II та III груп – 29,43 і 18,9 % та 43,8 і 18,2 % відповідно.

На 15-ту добу експерименту вміст Мангану в печінці щурів (табл. 3.32) I та II груп вірогідно збільшувався на 22,3 % та 10,6 % відповідно, тоді як III групи – знижувався на 17,1 % відносно контролю.

На 30- та 60-ту добу дослідів показник Mn (табл. 3.33 і 3.34) в печінці щурів усіх дослідних груп за значенням знижувався відносно такого у контролі: на 30-ту добу – на 34,1 % (I група), 29,6 % і 32,6 % (II і III групи);

на 60-ту добу – на 28,0 % (I група), 59,5 % (II група), а III – мав лише тенденцію до зниження.

На 90-ту добу експерименту (табл. 3.35) вміст Mn вірогідне збільшувався на 29,1 % відносно контролю в печінці щурів III групи, а I і II груп – мав лише тенденцію до підвищення.

На 15-ту добу досліджень вміст Купруму в селезінці щурів II та III груп (табл. 3.24) вірогідно збільшувався відносно контрольного на 64,2 % та 71,1 %, тоді як I групи – не мав статистичних змін.

На 30-ту добу досліду вміст Cu в селезінці щурів I, II та III груп (табл. 3.25) продовжував зростати на 34,6 %; 54,9 % та 42,4 % відносно контролю, тоді як на 60-ту добу (табл. 3.26) в тварин II та III груп – мав тенденцію до підвищення, а I – до зниження.

На останньому терміні досліджень (табл. 3.27) лише в селезінці щурів III групи, які отримували суміш NPMе в дозі 4,0 мг/кг маси тіла, виявляли вірогідне підвищення вмісту Cu, в інших групах – тенденцію до підвищення.

Слід відзначити, протягом усього досліду максимальний вміст Феруму в селезінці реєстрували у щурів I групи (від 18,0 % до 29,1 %), а II групи – визначали зниження вмісту металу (особливо на 15- та 60-ту добу на 18,9 % та 35,6 % відповідно).

Мінімальний вміст Fe в селезінці щурів III групи встановлювали на 15- та 30-ту добу експерименту (табл. 3.28 і 3.29), якій знижувався 47,4 % та 66,6 % відносно контролю. На 60-ту добу експерименту (табл. 3.30) вміст металу дещо підвищувався, але залишався вірогідно нижчим за контрольний рівень на 11,1 %, а на 90-ту добу – мав тенденцію до підвищення.

Подібну вмісту Феруму динаміку Мангану в селезінці фіксували в щурів III групи на 15- та 30-ту добу експерименту (табл. 3.32 і 3.33): вірогідне зниження становило 48,3 % та 84,4 %, але вже на 60-ту добу (табл. 3.34) – збільшення відносно контролю на 27,0 % відповідно, а на 90-ту добу (табл. 3.35) – тенденцію до підвищення.

Упродовж усього експерименту вміст Mn в селезінці (табл. 3.32 – 3.35) збільшувався в щурів I групи, але на 15-, 30- та 60-ту добу реєстрували лише тенденцію до підвищення, а на 90-ту – знову збільшувався на 32,8 % відносно контролю.

Іншою реєстрували динаміку вмісту Mn в селезінці щурів II групи: на 15-ту добу встановлювали вірогідне підвищення його рівня на 19,6 %, на 30-ту – зниження на 38,8 %, а на 60- та 90-ту – лише тенденцію до його зростання.

Встановлено, що у серці щурів I групи впродовж усього експерименту не реєстрували статистичних змін вмісту Купруму, лише на 90-ту добу спостерігали тенденцію до його підвищення.

У серці щурів II групи, які отримували суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, визначали вірогідне зниження вмісту Cu на 30- і 60-ту добу експерименту (табл. 3.25 і 3.26) у середньому на 31,7 % та 70,6 % відповідно.

На 15-; 30- і 90-ту добу не встановлювали статистичних змін вмісту Cu відносно його контрольних значень у серці щурів III групи, а на 60-ту добу – його рівень вірогідно знижувався на 32,6 %.

Динаміка вмісту Феруму в серці мала інший характер: його значення в щурів I групи на 15-ту добу статистично не змінювались, на 30-ту – вірогідно знижувались на 20,0 %, а на 60- і 90-ту добу – мали тенденцію до зниження.

У серці щурів II групи вміст Fe на 15-ту добу експерименту (табл. 3.28) мав тенденцію до зниження, тоді як на 30-, 60- і 90-ту добу (табл. 3.29 – 3.31) вірогідно збільшувався відносно контролю на 20,5 %; 14,7 % і 11,8 % відповідно.

У серці щурів III групи вміст Fe мав максимальні значення на 15- та 30-ту добу експерименту вірогідно збільшувався на 13,6 % та 24,0 %, а на останніх термінах досліджень – статистично не відрізнявся від контрольного рівня.

На 15-ту добу досліджень вміст Мангану в серці щурів III групи (табл. 3.32) вірогідно збільшувався за контрольні значення на 21,4 %, а в інших групах – мав лише тенденцію до підвищення.

На 30-ту добу експерименту динаміка вмісту Mn в серці щурів (табл. 3.33) I групи мала тенденцію до підвищення, III – до зниження, а II – вірогідно знижувався на 60,0 % відносно контролю.

На 60-ту добу досліду у серці щурів (табл. 3.34) I групи визначали вірогідне зниження вмісту Mn на 27,3 %, а III групи – підвищення його вмісту на 30,0 %.

На 90-ту добу експерименту в серці щурів (табл. 3.35) I групи реєстрували вірогідне зниження вмісту Mn на 25,0 %, II – збільшення на 33,3 %, а III групи – статистичних змін не визначали.

Органами та тканинами, через які може відбуватися виділення металів є легені та нирки, тому є важливим знати вміст металів у них.

Динаміка вмісту Купруму в легенях мала наступний характер: на 15-ту добу досліду (табл. 3.24) не визначали статистичних змін його рівня в щурів усіх дослідних груп, але спостерігали тенденцію до підвищення.

На 30-ту добу експерименту (табл. 3.25) встановлювали вже вірогідне збільшення вмісту Cu в легенях щурів III групи, які отримували найвищу дозу NPMе, на 28,0 %, тоді як II групи – лише тенденцію до підвищення відносно контролю, а I – відсутність статистичних його змін.

Вірогідне збільшення вмісту Cu залишалось й на 60- та 90-ту добу експерименту (табл. 3.26 і 3.27) в легенях щурів III групи на 53,6 % та 32,5 % відповідно, в інших групах – спостерігали тенденцію до зниження показника, яка зберігалась такою на 90-ту добу досліду.

Іншу динаміку мав вміст Феруму: на 15-ту добу експерименту максимальний вміст Феруму (табл. 3.28) виявляли в легенях щурів I групи (перевищення контрольного показника становило 25,4 %), тоді як II та III груп навпаки, вірогідне зниження вмісту елемента на 16,4 % та 19,3 % відповідно.

На 30-ту добу дослідю (табл. 3.29) визначали вірогідне підвищення вмісту Fe в легенях щурів усіх дослідних груп: I – на 9,5 %, II і III – на 25,7 % і 28,8 % відповідно.

На цей час рівень Fe в легенях щурів II групи наближався до його контрольних значень, тоді як I і III груп він вірогідно підвищувався на 12,8 % та 7,4 % відповідно.

На 90-ту добу експерименту (табл. 3.31) лише у легенях щурів II групи реєстрували вірогідне зниження вмісту Fe на 13,6 % відносно контролю.

Динаміка вмісту Мангану в легенях щурів проявлялася наступним чином: на 15-ту добу експерименту (табл. 3.32) у легенях щурів I групи встановлювали лише тенденцію до підвищення його рівня, а на 30-ту добу (табл. 3.33) – до зниження, тоді як на 60-ту добу (табл. 3.34) – значення показника вірогідно перевищували контрольні на 65,2 %, наближаючись до їх контрольного рівня на 90-ту добу експерименту.

У легенях щурів II групи, які отримували суміш NPMe в дозі 0,3 мг/кг маси тіла, на 15-; 60- та 90-ту добу вміст Mn наближався також до його контрольного рівня, а на 30-ту добу (табл. 3.33) – вірогідно перевищував на 56,0 % відповідно.

Вірогідно нижчими за контрольний рівень були значення вмісту Mn в легенях щурів III групи на 15-ту добу дослідю на 100,0 %, тоді як на 30- та 60-ту добу – вірогідно збільшувались на 56,0 % та 40,7 %, на 90-ту добу – мали тенденцію до підвищення.

Результати визначення вмісту металів у нирках дослідних щурів наведені у таблицях 3.24 – 3.35.

Вміст Купруму в нирках щурів I дослідної групи мав тенденцію до підвищення на 15-ту добу дослідю (табл. 3.24), тоді як II та III груп – вірогідно знижувався на 63,5 % та 61,9 % відносно контролю.

На 30-ту добу експерименту (табл. 3.25) рівень Cu в нирках щурів усіх груп статистично не відрізнявся від такого у контрольних тварин: у I та III групі – мав тенденцію до зниження, а в II – до підвищення.

На 60-ту добу досліджу (табл. 3.26) вміст Cu в нирках щурів I та II груп вірогідно знижувався на 12,5 % та 9,3 %, тоді як III групи – мав тенденцію до зниження відносно контролю.

На 90-ту добу експерименту (табл. 3.27), як і на 30-ту, рівень Cu в нирках щурів усіх груп статистично не відрізнявся від такого у контрольних тварин.

Динаміка вмісту Феруму мала наступний характер: на 15-ту добу експерименту (табл. 3.28) встановлювали вірогідне зниження показника в нирках щурів II групи на 24,4 % відносно контролю, тоді як I групи – лише тенденцію до його підвищення.

На 30-ту добу (табл. 3.29) вміст Fe у нирках щурів I групи вірогідно збільшувався за контрольний рівень на 12,0 %, II – мав тенденцію до зниження і III – вірогідно знижувався на 48,0 %.

На 60-ту добу експерименту (табл. 3.30) значення вмісту Fe в нирках щурів усіх дослідних груп статистично не відрізнялися від таких у контролі.

На останньому терміні досліджень (табл. 3.31) вміст Fe значно збільшувався в нирках щурів I групи, які отримували макродисперсну форму елемента, на 36,4 %, тоді як II та III груп тварин, які отримували HкMe в обох дозах, він знижувався на 8,3 % та 12,2 % відповідно.

Динаміка вмісту Мангану мала наступний характер: на 15-ту добу досліджу (табл. 3.32) його рівень вірогідно знижувався в нирках щурів II і III груп, які отримували суміш NPMe в обох дозах, на 132,2 % і 80,3 % відповідно, I групи – мав лише тенденцію до зниження.

На 30-ту добу досліджу (табл. 3.33) в нирках щурів II і III груп динаміка накопичення Mn була подібна такої в I групі, а його вміст вірогідно збільшувався на 46,2 % відносно контролю.

На 60-ту добу експерименту (табл. 3.34) вміст Mn лише у нирках щурів III групи не відрізнявся від контрольного показника, а I та II груп – вірогідно знижувався на 82,9 % та 20,8 % відносно контрольних значень.

На 90-ту добу дослідю (табл. 3.35) вміст Mn в нирках щурів II групи вірогідно зростав на 25,9 %, а I і III – статистично не відрізнявся від такого у контролі.

Отже, при визначенні біодоступності суміші металів у різних дисперсних формах за умов 90-добового впливу на організм білих щурів встановлено, що NPMe, при введенні в дозі 0,3 мг/кг маси тіла, мали тенденцію до кращого всмоктування, ніж солі металів, про що свідчить підвищений вміст металів у шлунку і тонкому кишечнику при зниженому їх вмісті в товстому кишечнику на 15-ту та 60-ту добу дослідю.

При хронічному введенні NPMe у біотичній дозі переважала функціональна кумуляція (за зниженням в печінці щурів вмісту Cu і Mn протягом дослідю і Fe, починаючи з 60-ї доби), тоді як в токсичній – матеріальна (за підвищенням вмісту Cu протягом всього дослідю, Fe – з 15-ї по 30-ту та Mn – з 60-ї по 90-ту добу) порівняно з контролем та іонною формою металів. Легені приймали активну участь у метаболізмі та екскреції і біотрансформації NPMe у вищій дозі, що виявляється значним вмістом елементів в щурів на 60-ту і 90-ту добу дослідю, особливо дозозалежним накопиченням Феруму.

Тобто, за результатами експериментів на білих щурах встановлено, що суміш NPMe має біосумісність та адаптогенну дію при введенні в дозі 0,3 мг/кг маси тіла та вищу біодоступність у порівнянні з металами у іонній формі.

Отже, результати визначення клініко-біохімічних параметрів біосумісності та біодоступності суміші NPMe у токсикологічних експериментах у системі *in vivo* можуть бути базовими для доклінічного тестування наноматеріалів, що дозволить прогнозувати їх потенційну небезпечність для здоров'я людей і тварин. Наукову новизну результатів було підтверджено та захищено патентом України на корисну модель (Додаток Е) [518].

Отримані результати були систематизовані та увійшли до методичних рекомендацій (Додаток Ж) [519], які встановлюють порядок проведення токсико-біохімічних досліджень при оцінюванні безпечності NPMe в експериментах *in vivo*, та опубліковано в наукових працях (Додаток Л) [520 – 532].

3.2 Біохімічна характеристика дії NPMe на прокаріотичні організми за умов ліофілізації/регідратації та при отриманні біомаси функціонально активних клітин

3.2.1 Дослідження впливу процесів ліофілізації/регідратації на рівень біохімічних показників функціональної активності прокаріотичних клітин різних таксономічних видів. Дослідженню факторів ушкодження та загибелі мікроорганізмів за умов ліофілізації присвячена велика кількість робіт [379, 380, 532, 534]. Під час рішення біотехнологічних задач у першу чергу розглядаються фізико-хімічні процеси, такі як швидкість та глибина заморожування біомаси, формування та локалізація кристалів льоду, концентрування розчинених речовин, фазові переходи ліпідів у мембранах тощо. Але не менш значущою виявляється метаболічна природа ушкоджень мікробних клітин та її фізіологічний статус, наприклад, фази їх росту, активність енергоперетворюючих систем та вільнорадикальні реакції в їх структурах, а також міжвидові та навіть штамові відмінності, та яка має спільні риси із процесами анабіозу і може виявитися летальними для клітини [383 – 388, 402, 403].

Як експериментальні моделі використовували періодичні культури прокаріотичних організмів *E. coli* виробничих штамів 19, 20, 24 і 25; *P. multocida* штамів 2, 5, 16, 550 і «Смол»; штамів *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16, *S. Enteritidis* 34 і штамів *M. orale* ATCC 23714, *M. arginini* G 230, *M. gallisepticum* ATCC 19610 і *Ach. laidlawii* ATCC 23206.

Фізіолого-біохімічні реакції бактеріальних клітин до (контроль) та після ліофілізації/регідратації оцінювали за інтенсивністю приросту біомаси

у динаміці 24 та 80 год та ендogenousного дихання клітин – за визначенням рівня питомої дихальної активності та величини мембранної H^+ -АТР-азної активності.

Дослідженнями встановлено, що кінетичні криві приросту біомаси до (контроль) та після ліофілізації/регідратації клітин *Esherichia* spp., *Salmonella* spp. і *Pasteurella* spp. різних штамів впродовж 25 год культивування (рис. 3.14 – 3.22, табл. 3.36) за характером кривизни є подібними та класичними для швидкоростучих мікроорганізмів [352 – 355, 381].

Так, тривалість латентної фази (лаг-фази) розвитку популяцій нативних клітин *P. multocida* усіх штамів у середньому дорівнювала близько 1 год (рис. 3.14 – 3.16), а після їх ліофілізації/регідратації – 1 год лише для клітин штамів 16 і «Смол» (рис. 3.15, А, 3.18) і 4 год – штамів 2, 5 і 550 (рис. 3.14, 3.15, Б) відповідно.

Максимальну швидкість накопичення біомаси за кількістю утворення як до, так й після регідратації клітин *P. multocida* дослідних штамів, реєстрували на 6–7-му годину від початку культивування (рис. 3.14 – 3.16), що відповідає за прийнятою класифікацією фаз розвитку бакпопуляцій логарифмічній фазі (фаза активного росту).

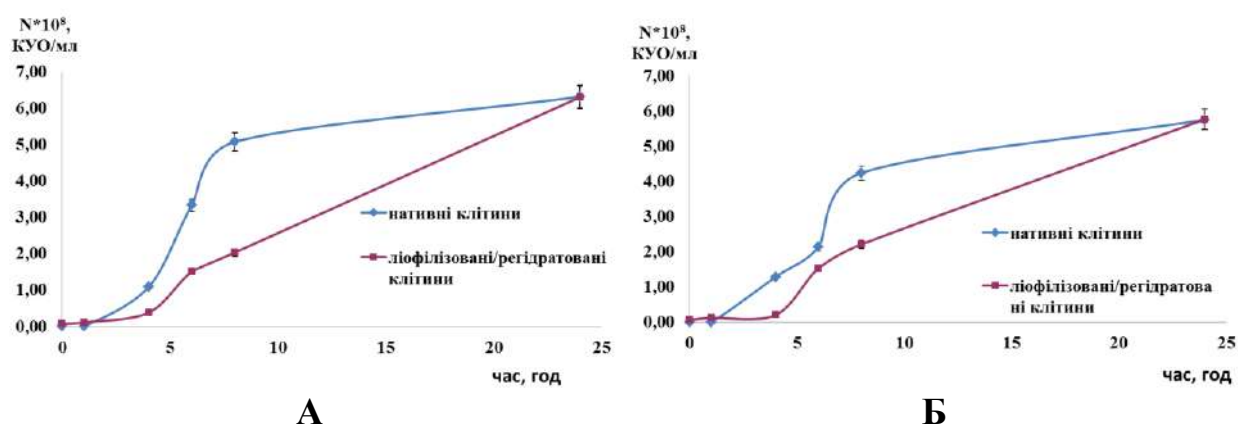


Рис. 3.14 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *P. multocida* штамів 2 (А) і 5 (Б) до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

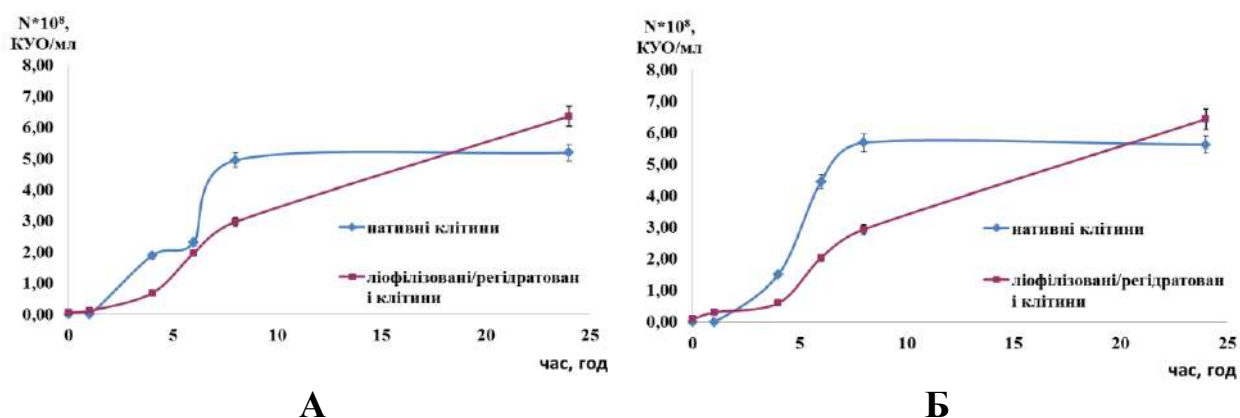


Рис. 3.15 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *P. multocida* штамів 16 (А) і 550 (Б) до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Періодичні культури регідратованих клітин штамів 16 і «Смол» за часом тривалості лог-фази були однаковими у порівнянні з таким у контрольних зразках і складала у середньому 5–6 год.

Але тривалість цієї фази для клітин штамів 2, 5 і 550 після ліофілізації/регідратації за часом була меншою і складала у середньому 2 – 3 год проти 5 – 6 год для культур нативних клітин (контроль) таких штамів.

Починаючи з 7–8-ї по 25-ту год культивування включно, спрямованість кривих росту для нативних клітин *P. multocida* усіх штамів вирівнювалась, що свідчить про рівновагу між кількістю утворених та померлих клітин, що притаманно стаціонарній фазі максимуму [384, 385].

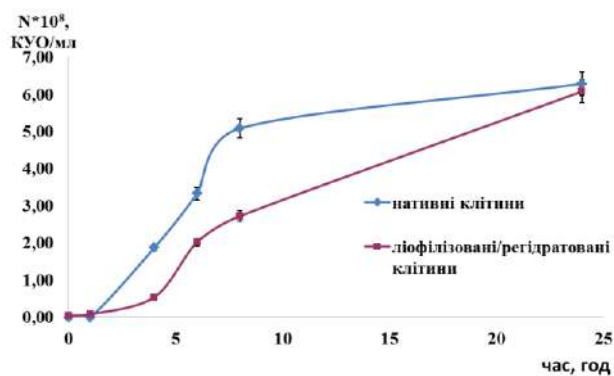


Рис. 3.16 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *P. multocida* штаму «Смол» до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Інтенсивність утворення ліофілізованих/регідратованих клітин *P. multocida* для дослідних штамів була однаковою та збільшувалась до кінця культивування. Причому максимальне накопичення біомаси *P. multocida*

після ліофілізації/регідратації штамів 2, 5 і «Смол» реєстрували лише на 25-ту год культивування, тоді як нативних клітин штамів 16 і 550 – на 9–10-ту год культивування відповідно (рис. 3.15). Уцілому, максимальна кількість утворення біомаси клітин *P. multocida* усіх штамів як до (контроль), так й після ліофілізації/регідратації, дорівнювала у середньому 5,0–6,5 КУО/мл.

З характеру кривих, що ілюструють інтенсивність проліферативної активності клітин *Esherichia* spp. і *Salmonella* spp. дослідних штамів, виявляється, що тривалість латентної фази розвитку популяцій як до (контроль), так й після ліофілізації/регідратації дорівнювала у середньому 1,5–2,0 год (рис. 3.17 – 3.20).

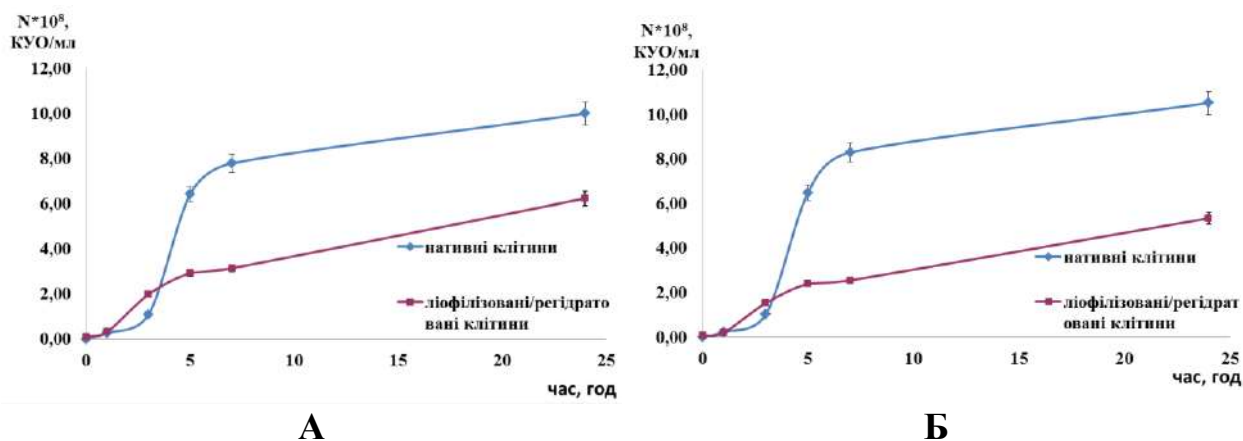


Рис. 3.17 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *E. coli* штамів 19 (А) і 20 (Б) до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Поступове накопичення біомаси та максимальну кількість утворення клітин усіх дослідних штамів реєстрували до 25-ї год культивування включно, що відповідає за прийнятою класифікацією фаз розвитку бактеріальних популяцій фазі експоненціального росту (лог-фаза).

При цьому для періодичних культур нативних клітин *E. coli* штамів 19, 20 (рис. 3.17) і 24 (рис. 3.18, А) та клітин штамів *Salmonella* spp. усіх штамів (рис. 3.19, 3.20), лог-фаза тривала з 3-ї по 7-му год відповідно.

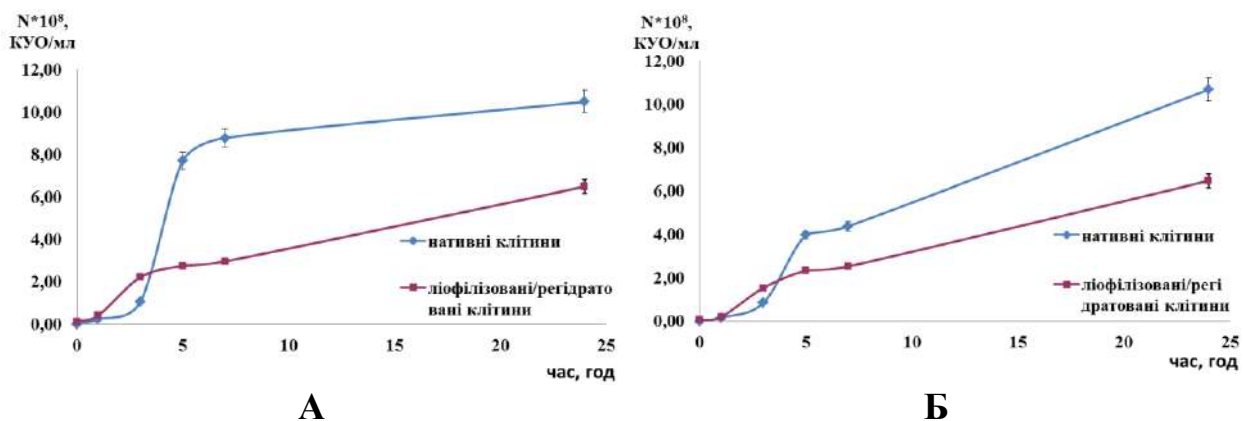


Рис. 3.18 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *E. coli* штамів 24 (А) і 25 (Б) до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

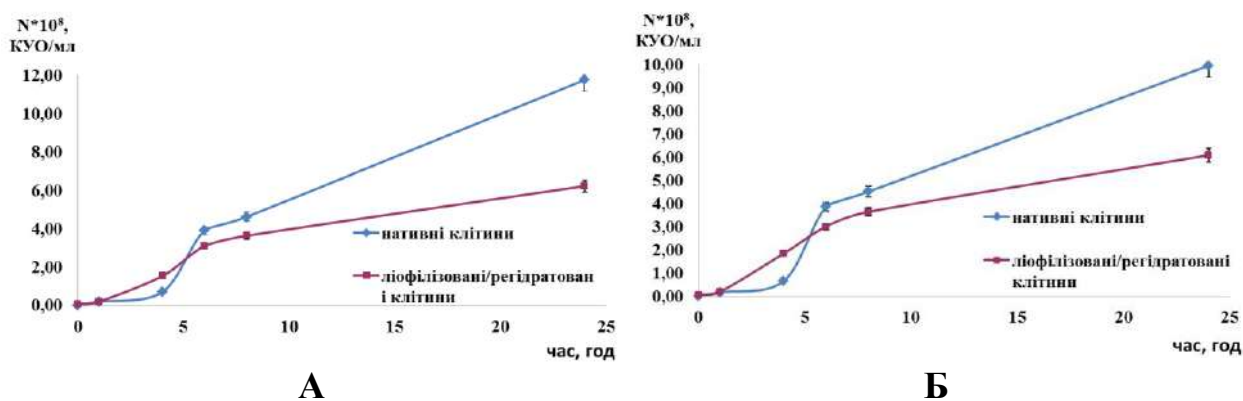


Рис. 3.19 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *S. Dublin* штаму 12 (А) і *S. Typhimurium* штаму 16 (Б) до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

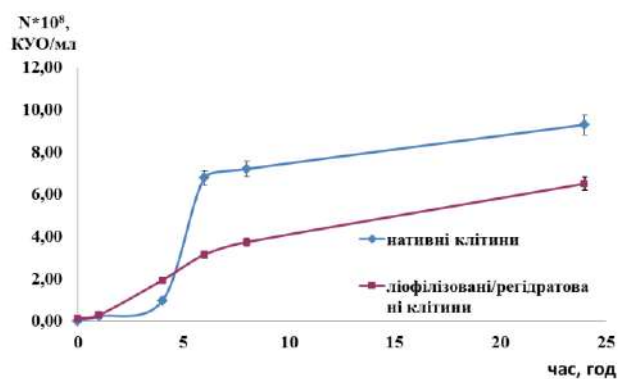


Рис. 3.20 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *S. Enteritidis* штаму 34 до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Для регідратованих клітин *E. coli* дослідних штамів її тривалість відбувалась пізніше за строками – з 5-ї по 8-му год і клітин штамів

Salmonella spp. – з 6-ї по 8-му год, потім криві росту вирівнювались за своєю спрямованістю, що свідчить про рівновагу між кількістю утворених та кількістю померлих бактерій, що притаманно стаціонарній фазі максимуму. Але за кількістю накопичення біомаси нативні клітини (контроль) перевищували такі після ліофілізації/регідратації: максимальна кількість їх утворення досягала через 25 год культивування у середньому 10,0–11,0 і 9,5–12,0 КУО/мл, а після регідратації – 5,0–6,2 і 6,0–6,5 КУО/мл відповідно.

Таким чином, довготривале зберігання культур клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. у ліофілізованому стані призводить до зниження інтенсивності приросту їх біомаси майже усіх дослідних штамів після регідратації.

Так, за рівнем утворення колоній періодичних культур бактеріальних клітин, більш резистентними (стабільними) щодо впливу ліофілізації/регідратації слід вважати *P. multocida* штамів 2, 5, 16, 550 і «Смол» на відміну від клітин штамів *E. coli*, *S. Dublin*, *S. Typhimurium* і *S. Enteritidis*.

З результатів досліджень, які наведені у таблиці 3.36, видно, що тривалість фази адаптації (лаг-фаза) при культивуванні періодичних культур як до (контроль), так й після ліофілізації клітин *M. orale* ATCC 23714, *M. arginini* G 230 і *Ach. laidlawii* ATCC 23206 була однаковою і складала у середньому 16, 32 і 5 год відповідно. Тривалість цієї фази для клітин *M. gallisepticum* штаму ATCC 19610 після ліофілізації/регідратації була вищою у 6,0 разів, ніж її тривалість для нативних клітин цього штаму ($P < 0,05$).

Фаза експоненціального росту (лог-фаза) виявилась більш тривалою за часом для нативних та після ліофілізації/регідратації клітин *M. orale* G 230 і *A. laidlawii* ATCC 23206 (табл. 3.36). Довготривале зберігання у ліофілізованому стані клітин цих штамів не вплинуло на інтенсивність приросту їх біомаси у лог-фазі, а її тривалість була близькою за значенням до такої у контрольному зразку.

Тривалість фаз приросту біомаси клітин *Mycoplasma* spp. тест-штамів до (контроль) та після ліофілізації/регідратації (M±m; n=5)

Умови культивування клітин тест-штамів		Фази приросту біомаси клітин, год		
		Лаг-фаза	Лог-фаза	Фаза «негативного» прискорення
<i>M. orale</i> ATCC 23714	нативні	16,00±0,45	65,00±3,50	10,00±0,90
	ліофілізовані	16,00±0,28	42,00±2,05*	30,00±1,56*
<i>M. arginini</i> G 230	нативні	32,00±2,00	23,00±1,15	8,00±0,58
	ліофілізовані	32,00±1,17	22,00±3,05	8,00±1,00
<i>M. gallisepticum</i> ATCC 19610	нативні	5,00±0,40	26,00±1,90	39,00±4,00
	ліофілізовані	30,00±2,33*	23,00±0,75*	15,00±3,80*
<i>Ach. laidlawii</i> ATCC 23206	нативні	5,00±0,17	43,00±2,75	22,00±1,20
	ліофілізовані	5,00±0,50	43,00±4,45	22,00±1,09

Примітка. * – різниця значень показників клітин після ліофілізації/регідратації вірогідна при $P < 0,05$ відносно їх рівня для нативних клітин (контроль).

Дослідженнями встановлено, що стаціонарна фаза максимуму для періодичних культур клітин *Ach. laidlawii* до та після ліофілізації/регідратації тривала впродовж 11 і 17 год, у подальшому (на 70-ту добу культивування) кількість їх утворення знижувалась в 1,5 і 1,2 разу ($P < 0,05$) відповідно.

Тривалість фази відмирання (фази «негативного» прискорення) для обох видів періодичних культур клітин *M. arginini* G 230 і *A. laidlawii* ATCC 23206 за значенням була однаковою (табл. 3.36, рис. 3.21).

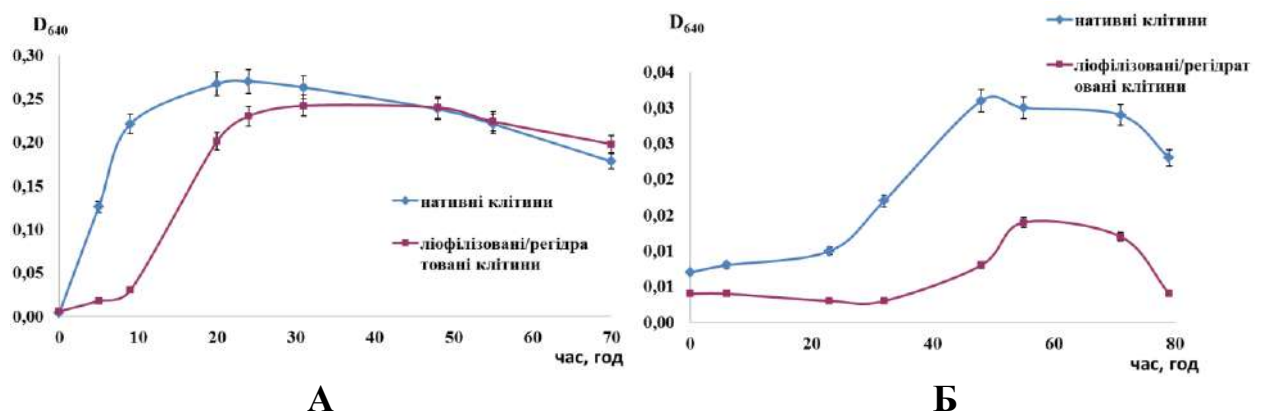


Рис. 3.21 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *Ach. laidlawii* штаму ATCC 23206 (А) і *M. arginini* штаму G 230 (Б) до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D₆₄₀ (M±m; n=5, P<0,05 відносно контролю).

З результатів досліджень, що відображено на рисунку 3.22 видно, що тривалість лог-фази у процесі культивування нативних клітин *M. orale* ATCC 23714 і *M. gallisepticum* ATCC 19610 була довше, ніж після їх ліофілізації/регідратації на 35,4 % і 11,5 % відповідно ($P < 0,05$).

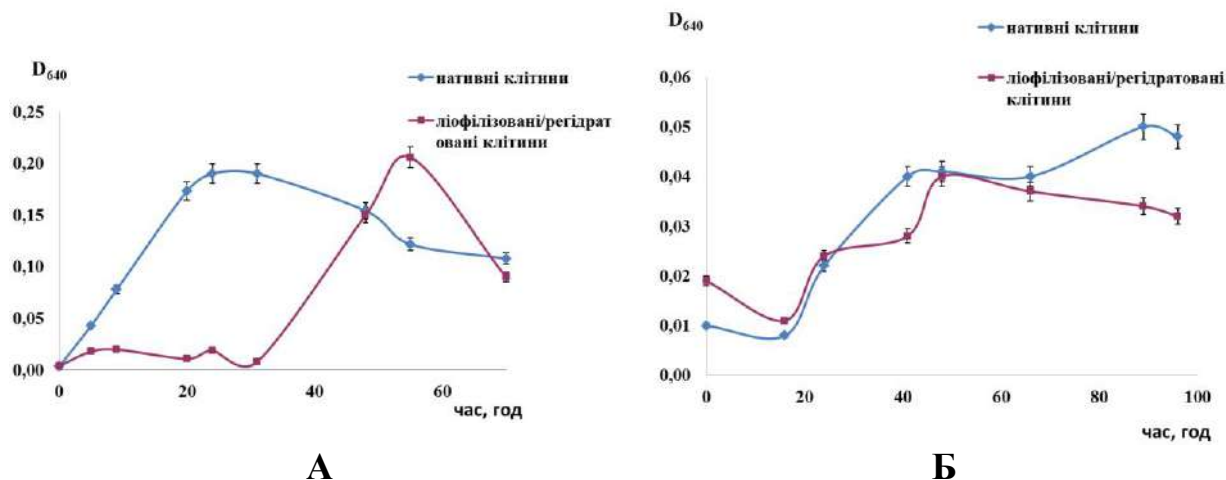


Рис. 3.22 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *M. gallisepticum* штаму ATCC 19610 (А) і *M. orale* штаму ATCC 2371 (Б) до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, D_{640} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Тривалість стаціонарної фази росту за культивування культур обох видів клітин *M. gallisepticum* у середньому дорівнювала 7 год, тоді як для нативних клітин *M. orale* – була довше у 2,3 разу, ніж для цих клітин після ліофілізації/регідратації (рис. 3.22).

Максимальну швидкість розмноження клітин мікоплазм та їх накопичення у середовищі культивування, тобто посилення інтенсивності накопичення біомаси реєстрували раніше для нативних клітин *M. orale* ATCC 23714, *M. gallisepticum* ATCC 19610 і *Ach. laidlawii* ATCC 23206 відповідно на 7, 24 і 11 год у порівнянні з показником у клітин після ліофілізації/регідратації (рис. 3.21, 3.22) відповідно. За кількістю утворених клітин ободва штами були однаковими.

Але, час максимального накопичення клітин *M. arginini* G 230, *M. gallisepticum* ATCC 19610 і *Ach. laidlawii* ATCC 23206 як до, так й після регідратації, припадав у середньому на 50–55-ту год культивування

(рис. 3.21, 3.22, А), тоді як клітин *M. orale* штаму ATCC 23714 – на 90-ту год відповідно.

При цьому, слід зауважити, що рівень приросту біомаси нативних клітин *M. arginini* G 230 і *M. orale* ATCC 23714 був вищим за значенням у середньому в 2,0 і 1,5 разу у порівнянні з таким у регідратованих клітин (рис. 3.21, Б, 3.22, Б).

Тобто, культури нативних клітин мікоплазм дослідних штамів за спрямованістю розвитку та інтенсивністю приросту біомаси були подібними та більш потужними з точки зору фізіологічного потенціалу в порівнянні з такими клітинами після ліофілізації/регідратації.

Довготривале зберігання культур клітин *M. orale* ATCC 23714 і *M. gallisepticum* ATCC 19610 у ліофілізованому стані впливало гальмуючим чином на інтенсивність приросту їх біомаси, тривалість лог-фази була меншою, а початок стаціонарної фази їх розвитку відстрочився і був більш пізнішим ($P < 0,05$) у порівнянні з контрольним зразком.

Отже, за рівнем утворення колоній клітини *Ach. laidlawii* ATCC 23206 як до, так й після регідратації, були однаковими, тобто їх можна вважати більш резистентними (стабільними) щодо температурного впливу в процесі ліофілізації та тривалого зберігання.

За результатами порівняльного аналізу інтенсивності приросту біомаси за кількістю утворення бактеріальних клітин у стаціонарній фазі максимуму, культури *M. arginini* G 230 визначено як найменш потужні та перспективні за їх фізіологічним потенціалом для біологічної промисловості.

На іншому етапі досліджень проводили визначення рівня показника питомої ДА ізольованих бактеріальних клітин дослідних штамів.

У таблиці 3.37 наведені результати досліджень рівня питомої ДА клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. дослідних штамів до (контроль) та після ліофілізації/регідратації клітин.

**Рівень питомої дихальної активності клітин *Escherichia spp.*,
Pasteurella spp. і *Salmonella spp.* дослідних штамів у стаціонарній фазі
росту до (контроль) та після ліофілізації/регідратації, (M±m; n=5)**

Клітини бактерій дослідних штамів	Інтенсивність питомої ДА, $\frac{мгO_2}{л \cdot хв \cdot мг}$		
	Нативні клітини бактерій (контроль)	Після ліофілізації/регідратації	
		без додавання дихального субстрату	за умов енергізації (глюкоза 1 %)
<i>E. coli</i> 19	0,640±0,003	2,520±0,030*	3,35±0,02**
<i>E. coli</i> 20	2,440±0,010	1,540±0,003*	3,02±0,01**
<i>E. coli</i> 24	1,690±0,008	2,280±0,002*	5,05±0,21**
<i>E. coli</i> 25	1,930±0,005	1,360±0,001*	2,89±0,15**
<i>P. multocida</i> 2	0,700±0,002	1,480±0,002*	3,41±0,09**
<i>P. multocida</i> 5	1,456±0,035	1,180±0,005*	2,35±0,11**
<i>P. multocida</i> 16	1,186±0,025	1,230±0,025	2,48±0,09**
<i>P. multocida</i> 550	0,916±0,005	0,890±0,001	2,68±0,25**
<i>P. multocida</i> «Смол»	1,914±0,007	1,000±0,003*	2,77±0,17**
<i>S. Enteritidis</i> 34	2,260±0,010	1,500±0,010*	3,40±0,09**
<i>S. Dublin</i> 12	1,050±0,003	0,920±0,003	1,99±0,03**
<i>S. Typhimurium</i> 16	3,520±0,040	1,060±0,005*	2,83±0,07**

Примітки: * – різниця значень рівня показника клітин після ліофілізації/регідратації вірогідна при $P < 0,05$ щодо його рівня у нативних клітин (контроль); ** – різниця значень рівня показника клітин після ліофілізації/регідратації, додатково енергізованих, вірогідна при $P < 0,05$ щодо його рівня у клітин без додавання дихального субстрату.

Внаслідок зберігання бактеріальної біомаси більшості дослідних штамів у ліофілізованому стані відбувалось пригнічення питомої ДА в порівнянні з її контрольним рівнем (до ліофілізації).

Так, вірогідне зниження рівня питомої ДА регідратованих клітин *E. coli* штамів 20 і 25 складало 36,9 і 29,5 %, *S. Enteritidis* штаму 34 і *S. Typhimurium* штаму 16 – 33,6 і 232,0 %, а *P. multocida* штаму 5 і «Смол» – 19,0 і 47,7 % ($P < 0,05$) відповідно.

Рівень питомої ДА після ліофілізації/регідратації клітин вірогідно підвищувався для *E. coli* штамів 19, 24 і *P. multocida* штаму 2 у 3,9, 1,4 і 2,1 разу відповідно відносно її контрольних значень, що, очевидно, може

бути ознакою адаптаційної відповіді клітин у процесі репараційного відновлення.

Визначено, що для регідратованих клітин *S. Dublin* штаму 12 та *P. multocida* 16 і 550 рівень ендогенної ДА статистично не змінювався та наближався до контрольних значень показника.

При додаванні дихального субстрату до середовища інкубації в кінцевій концентрації 1 % за об'ємом встановлено, що рівень питомої ДА значно підвищувався для регідратованих клітин бактерій усіх дослідних штамів.

Так, для регідратованих клітин *Escherichia* spp. дослідних штамів посилення інтенсивності ДА реєстрували у середньому в межах 1,3–2,2, *Salmonella* spp. – 2,2–2,7 і *Pasteurella* spp. – 1,9–3,0 разів ($P < 0,05$) відповідно відносно її рівня для клітин відповідних штамів без додавання глюкози, що свідчить про залежність дихальної активності цих клітин від типу субстрату та технологічну можливість її корегування.

За підсумком результатів досліджень показника фізіологічного потенціалу клітин бактерій – питомої ДА – встановлено, що більш чутливими до процесів ліофілізації/регідратації за витрачанням потужності ендогенного дихання виявились клітини *P. multocida* штамів 5 і «Смол», *E. coli* – 20 і 25, *S. Enteritidis* 34 і *S. Typhimurium* 16 відповідно.

У таблиці 3.38 наведені результати досліджень питомої ДА клітин мікоплазм дослідних штамів до та після ліофілізації/регідратації.

Так, за умов ендогенного дихання (без додавання дихального субстрату) найвищі значення показника ДА реєстрували для нативних клітин *M. orale*, які були більшими у середньому в 10,6, 3,8 і 6,2 разу, ніж у клітин *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *Ach. laidlawii* відповідно ($P < 0,05$).

За умов додавання до середовища інкубації періодичних культур клітин *M. orale* і *M. arginini* глюкози рівень питомої ДА за значенням суттєво підвищувався в 1,30 і 1,85 разу відносно його початкових значень ($P < 0,05$).

**Рівень питомої дихальної активності клітин *Mycoplasma* spp. тест –
штамів у стаціонарній фазі росту до (контроль) та після
ліофілізації/регідратації (M±m; n=5)**

Клітини бактерій тест-штамів	Інтенсивність питомої ДА, $\frac{мгO_2}{л \cdot хв \cdot мг}$	
	без додавання дихального субстрату	за умов енергізації (глюкоза 1 %)
Нативні клітини бактерій (контроль)		
<i>M. orale</i> ATCC 23714	9,820±0,850	12,720±1,005**
<i>M. arginini</i> G 230	1,929±0,010	3,576±0,725**
<i>M. gallisepticum</i> ATCC 19610	2,621±0,055	3,092±0,800
<i>Ach. laidlawii</i> ATCC 23206	1,582±0,026	1,638±0,040
Клітини бактерій після ліофілізації/регідратації		
<i>M. orale</i> ATCC 23714	7,568±0,050*	8,075±0,060
<i>M. arginini</i> G 230	6,240±0,090*	6,400±0,058
<i>M. gallisepticum</i> ATCC 19610	5,455±0,035*	5,931±0,590
<i>Ach. laidlawii</i> ATCC 23206	3,826±0,040*	4,023±0,400

Примітки: * – різниця значень рівня показника для клітин після ліофілізації/регідратації вірогідна при $P < 0,05$ щодо його рівня у нативних клітин; ** – різниця значень рівня показника для клітин після ліофілізації/регідратації, додатково енергізованих, вірогідна при $P < 0,05$ щодо його рівня у клітин без додавання дихального субстрату.

Встановлено, що за додавання енергетичного субстрату до середовища інкубації не відбувалось зміни інтенсивності дихальної активності клітин *M. gallisepticum* і *Ach. laidlawii*, що, очевидно, пов'язано з притаманною для цих сероваріантів мікоплазм фізіологічною властивістю ферментувати глюкозу на відміну від здатності клітин, наприклад, *M. orale* і *M. arginini* ферментувати аргінін.

Процеси ліофілізації викликали інгібіцію інтенсивності ДА клітин *M. orale* як у випадку ендogenousного, так й енергізованого дихання. Так, зниження рівня показника ендogenousне дихання регідратованих клітин *M. orale* складало 22,1 %, а дихання за додаткової енергізації – 38,5 % ($P < 0,05$) відповідно.

Але, навіть після ліофілізації, рівень процесів як ендogenousного дихання, так й енергізованого, залишався вищим за значення щодо такого у інших

клітин мікоплазм дослідних штамів, що свідчить про вищу фізіологічну потужність клітин *M. orale*.

Рівень ендогенної ДА клітин після ліофілізації/регідратації дослідних штамів мікоплазм суттєво підвищувався відносно контрольного, що для клітин *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *Ach. laidlawii* складало 3,2, 2,1 і 2,4 рази ($P < 0,05$) відповідно. Слід відзначити, що додаткова енергізація середовища інкубації не викликала вірогідних змін інтенсивності процесів дихання для клітин цих штамів, що вказує про витрачання їх фізіологічного потенціалу внаслідок впливу ліофілізації/регідратації.

Як свідчать результати, що наведені у таблиці 3.39, за значеннями своєї абсолютної активності, питома H^+ -АТР-аза у СМФ клітин *E. coli* штамів 19, 20, 24 і 25 після ліофілізації/регідратації набувала вірогідного зниження, кратність якого складала у середньому 1,7, 3,5, 5,3 і 1,3 рази відповідно відносно її контрольного рівня, що вказує на гальмування швидкості гідролізу АТР у бактеріальних клітин дослідних штамів.

Визначено, що процеси ліофілізації/регідратації сприяли індукції активності мембранної H^+ -АТР-ази клітин *P. multocida* штамів 5, 16 і 550 на 143,9, 66,0 і 75,6 % ($P < 0,05$) відповідно відносно її активності нативних клітин (контроль) (табл. 3.39).

При цьому, значення мембранної H^+ -АТР-ази клітин *P. multocida* штамів і «Смол» після регідратації не зазнавали статистичних змін, що може забезпечуватись високим (потужним) базовим рівнем активності цього ферменту для нативних клітин цих штамів.

Значення активності мембранної H^+ -АТР-ази клітин *Salmonella* spp. дослідних штамів після ліофілізації/регідратації також вірогідно підвищували базовий рівень такої у нативних клітин (контроль). Так, з даних, наведених у таблиці 3.39, виявляється, що відсоток зростання активності ферменту для клітин штамів *S. Enteritidis* 34, *S. Dublin* 12 і *S. Typhimurium* 16 складав у середньому 236,2, 194,1 і 284,0 % ($P < 0,05$) відповідно.

**Рівень питомої Н⁺-АТФ-азної активності мембранної фракції клітин
Escherichia spp., *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp. і *Mycoplasma* spp.
дослідних штамів до (контроль) та після ліофілізації/регідратації
($M \pm m$; n=5)**

СМФ клітин бактерій дослідних штамів	Питома Н ⁺ -АТФ-аза, мкмоль Р _i /хв мг білка	
	СМФ нативних клітин бактерій (контроль)	СМФ клітин бактерій після ліофілізації/регідратації
<i>E. coli</i> 19	8,20±0,50	4,80±0,89*
<i>E. coli</i> 20	25,60±2,30	7,40±0,43*
<i>E. coli</i> 24	15,74±2,10	3,00±0,05*
<i>E. coli</i> 25	7,02±1,55	5,40±0,48*
<i>P. multocida</i> 2	8,86±1,15	9,00±0,60
<i>P. multocida</i> 5	3,28±0,15	8,00±0,27*
<i>P. multocida</i> 16	5,18±0,23	8,60±1,00*
<i>P. multocida</i> 550	2,62±0,30	4,60±0,15*
<i>P. multocida</i> «СМОЛ»	8,33±0,90	8,80±0,95
<i>S. Enteritidis</i> 34	2,32±0,90	7,80±0,12*
<i>S. Dublin</i> 12	3,40±0,05	10,00±0,95*
<i>S. Typhimurium</i> 16	2,50±0,15	9,60±0,40*
<i>M. orale</i> ATCC 23714	1749,8±120,5	23040±150,0*
<i>M. arginini</i> G 230	1106,7±97,0	5305,3±85,0*
<i>M. gallisepticum</i> ATCC 19610	685,6±90,0	2126,7±100,0*
<i>Ach. laidlawii</i> ATCC 23206	821,6±55,0	4009,0±59,0*

Примітка. * – різниця значень рівня показника для клітин після ліофілізації/регідратації вірогідна при $P < 0,05$ щодо його рівня у нативних клітин.

Значення абсолютної Н⁺-АТФ-азної активності мембран клітин *Mycoplasma* spp. усіх штамів внаслідок ліофілізації/регідратації вірогідно збільшувались відносно їх базового рівня для нативних клітин (контроль). Так, кратність підвищення активності ензиму для регідратованих клітин *M. orale*, *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *Ach. laidlawii* у середньому складала 13,2, 4,8, 3,1 і 4,9 рази ($P < 0,05$) відповідно.

Тому, можна припустити, що формування різниці трансмембранного потенціалу на мембранах регідратованих клітин *P. multocida* штамів 5, 16 і 550, клітин *Salmonella* spp. і *Mycoplasma* spp. усіх дослідних штамів у процесі

відтворення їх життєздатності забезпечується ферментною системою H^+ -АТР-ази, яка знаходиться у більш активному функціональному стані ніж у нативних клітин цих штамів, та кінетика якої є основним молекулярним механізмом генерації його величини.

Але у клітинах *P. multocida* штаму 2 та *E. coli* штамів 19 і 24 формування величини електрохімічних потенціалів на клітинній мембрані внаслідок ліофілізації/регідратації, навпаки, визначається лише їх фізіологічною функцією – дихальною активністю.

Про участь обох ланцюгів енергетичного обміну клітин *M. arginini* G 230, *M. gallisepticum* ATCC 19610 і *Ach. laidlawii* ATCC 23206 у генерації величини трансмембранного потенціалу вказує додаткова участь власних ресурсів ендогенного дихання (табл. 3.39).

Таким чином, за підсумком результатів визначення інтенсивності приросту біомаси, величини питомої дихальної та H^+ -АТР-азної активності бактеріальних клітин, слід відзначити, що лише клітини *E. coli* штамів 19 і 24, *P. multocida* штамів 16 і 550 та штамів *M. orale*, *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *Ach. laidlawii* проявляли кріорезистентність під час ліофілізації/регідратації.

Але, вважаючи лише на часткове відновленням приросту їх біомаси у порівнянні з таким у контрольних зразків, з одного боку буде чинити збитки для біологічного виробництва через підвищення собівартості технологій, а з іншого – спонукає щодо наукового пошуку речовин, за використання яких можливо спрямованно регулювати накопичення біомаси клітин мікроорганізмів, що є актуальним науково-практичним завданням.

Стрімкий розвиток технологій синтезу наноматеріалів, зокрема NPMe, дозволяє значно розширити межі їх застосування. Тому подальшою метою нашої роботи було вивчення біохімічних параметрів біосумісності дослідних зразків NPMe, охарактеризованих у попередніх експериментах як біосумісні та мембранотропні (п. 3.1), за контактної взаємодії з клітинами прокаріотичних організмів під час їх ліофілізації/регідратації.

3.2.2 Мікроскопічне дослідження контактної взаємодії NPAu та NPAg з клітинами прокаріотичних організмів. За результатами проведення трансмісійної електронної мікроскопії було з'ясовано здатність бактеріальних клітин зв'язувати NPMe. Отримані результати свідчать про нерівномірність розподілення акумульованих NPAu на поверхні та всередині бактеріальної клітини із переважною їх локалізацією поблизу одного з кінців останньої.

Візуалізовано взаємодію NPAu розміру ~ 20 нм і ~ 30 нм та NPAg ~ 30 нм з клітинами *E. coli* штамів 4 і 20, *S. Enteritidis* штаму 34 та *S. Typhimurium* штаму 16 у концентрації 10^8 – 10^9 КУО/мл за умов інкубації при температурі 23 ± 1 °C впродовж 10 хв відповідно (рис. 3.23 – 3.26).

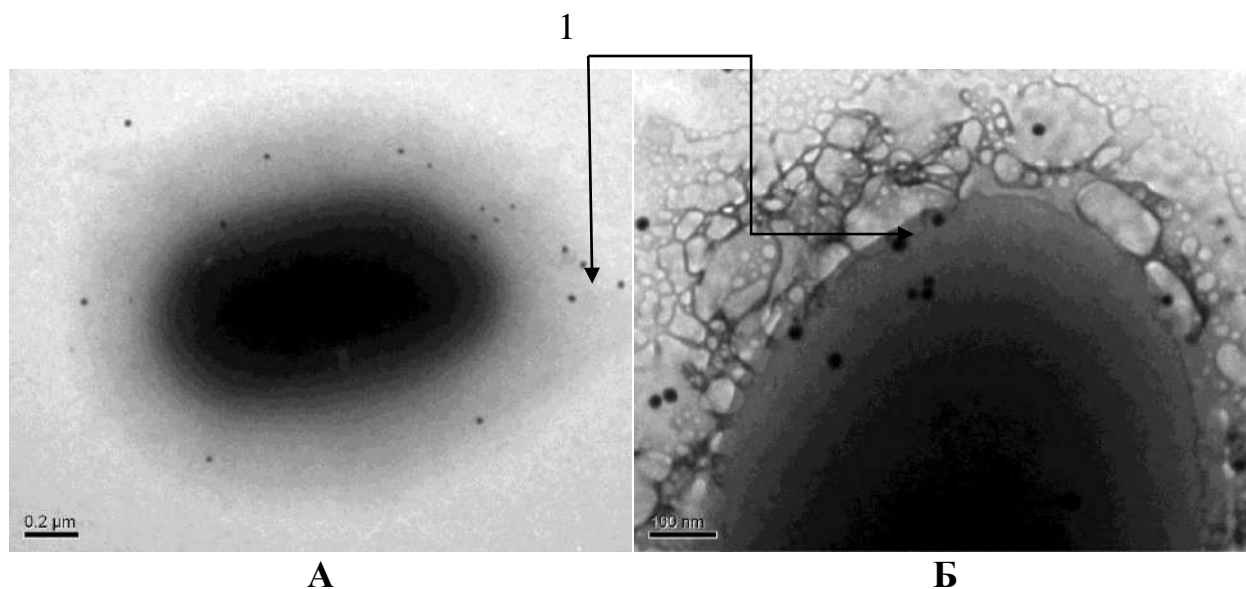


Рис. 3.23 Бактеріальна клітина *E. coli* штаму 4 з акумульованими NPAu (1) розміру ~ 20 нм (А); фрагмент збільшеної ділянки клітини (Б) (дані TEM; JEM–1230, JEOL, Японія).

Висока електронна щільність отриманих зображень свідчить про здатність клітин *E. coli* активно концентрувати NPAu і NPAg як на поверхні, так і всередині клітини. Поряд із цим виявлялась помітною нерівномірність розподілу ділянок проникнення обох видів NPMe всередину клітини.

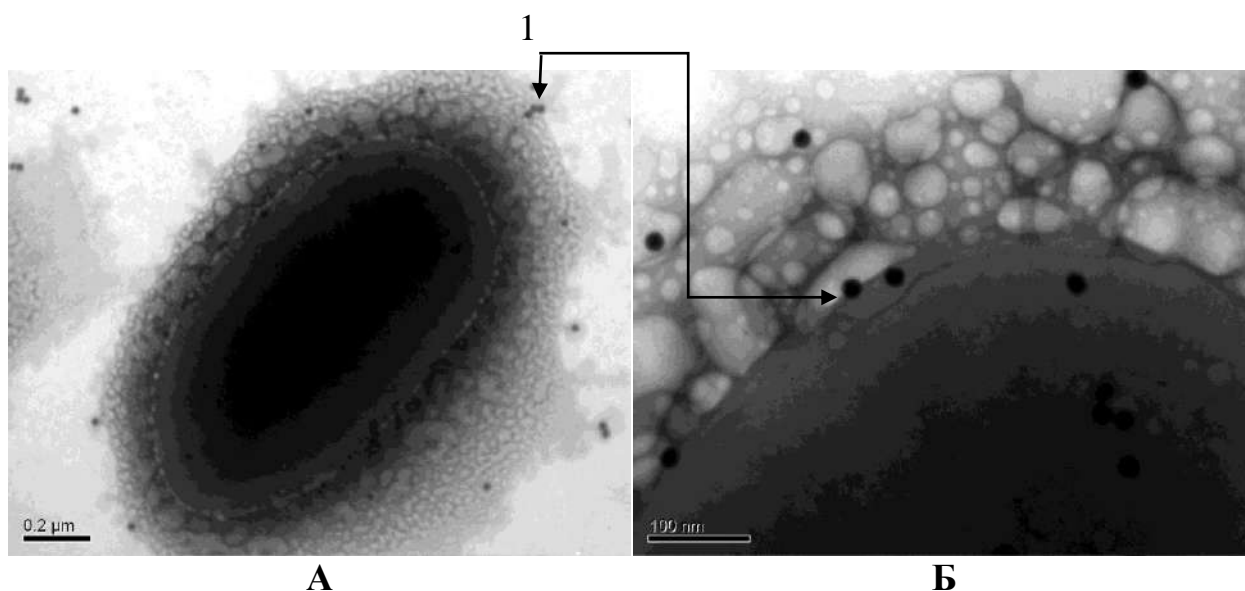


Рис. 3.24 Бактеріальна клітина *E. coli* штаму 20 з акумульованими NPAg (1) розміру ~30 нм (А); фрагмент збільшеної ділянки клітини (Б) (дані TEM; JEM-1230, JEOL, Японія).

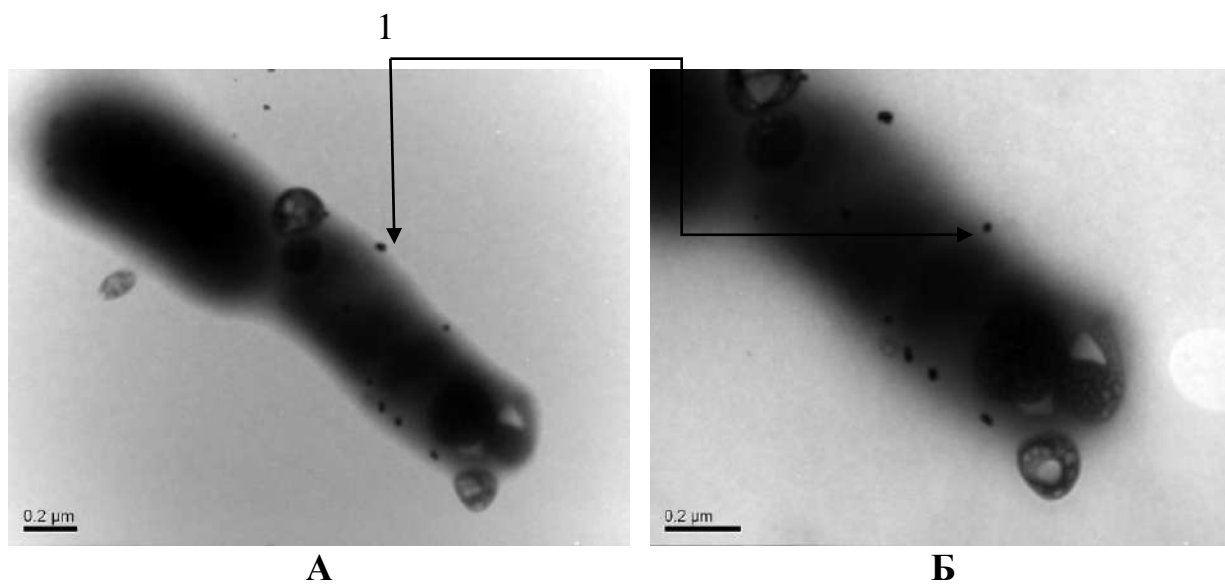


Рис. 3.25 Бактеріальна клітина *S. Typhimurium* 16 з акумульованими NPAu (1) розміру ~30 нм (А) та фрагмент збільшеної клітини (Б) (дані TEM; JEM-1230, JEOL, Японія).

Також з рисунків 3.25 і 3.26 виявляється, що за методом TEM можливо візуалізувати здатність клітин штамів *S. Typhimurium* 16 і *S. Enteritidis* 34 активно зв'язувати NPAu і NPAg розміру ~30 нм.

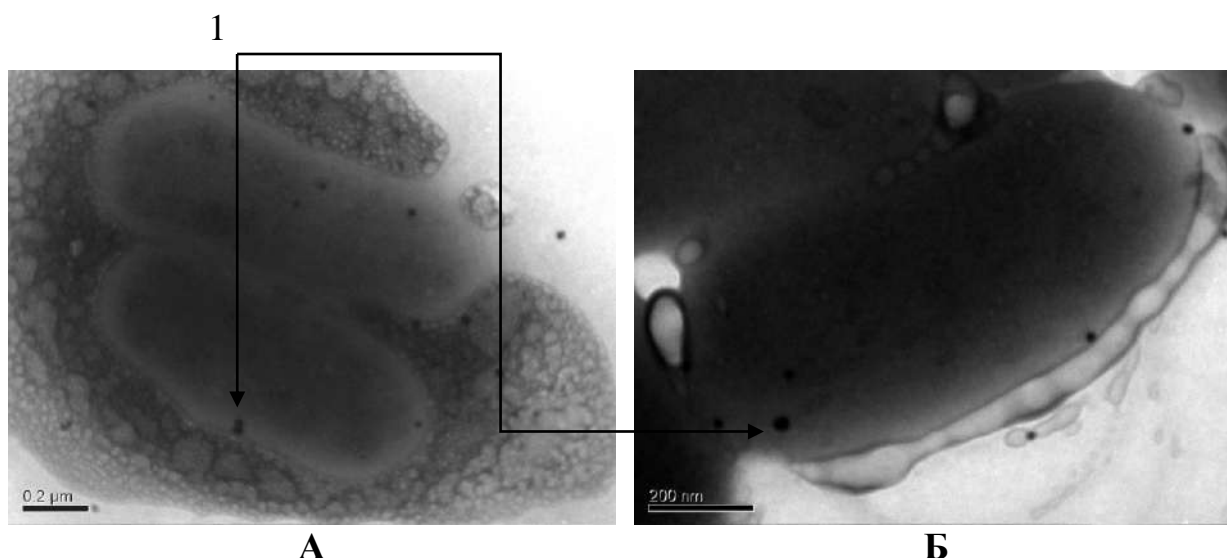


Рис. 3.26 Бактеріальна клітина *S. Enteritidis* 34 з акумульованими NPAg (1) розміру ~30 нм (А); фрагмент збільшеної клітини (Б) (дані TEM; JEM-1230, «JEOL», Японія).

Так, активне зв'язування NPAu і NPAg клітинами *Salmonella* spp. дослідних штамів реєстрували вже через 10 хв з початку контактної взаємодії, тоді як зазвичай середній час акумуляції NPMe клітинами *Esherichia* spp. становить 30–40 хв, як описано в роботі [447].

За результатами TEM також доведено акумуляцію NPAu на поверхні клітин *B. anthracis* вегетативної та спорової форми у розведенні 1:1 (рис. 3.27, А) та 1:2 (рис. 3.27, Б) відповідно.

За результатами TEM реєстрували активну взаємодію та акумуляцію NPAu на поверхні спорової і вегетативної форми штаму *B. anthracis* у розведеннях 1:4 (рис. 3.28, А) і 1:8 (рис. 3.28, Б) відповідно.

Таким чином, висока електронна щільність отриманих зображень свідчить про здатність клітин *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* і *B. anthracis* дослідних штамів активно концентрувати NPAu і NPAg розміру ~20 нм і ~30 нм як на поверхні, так і всередині клітини, вже через 10–30 хв спочатку їх контактної взаємодії.

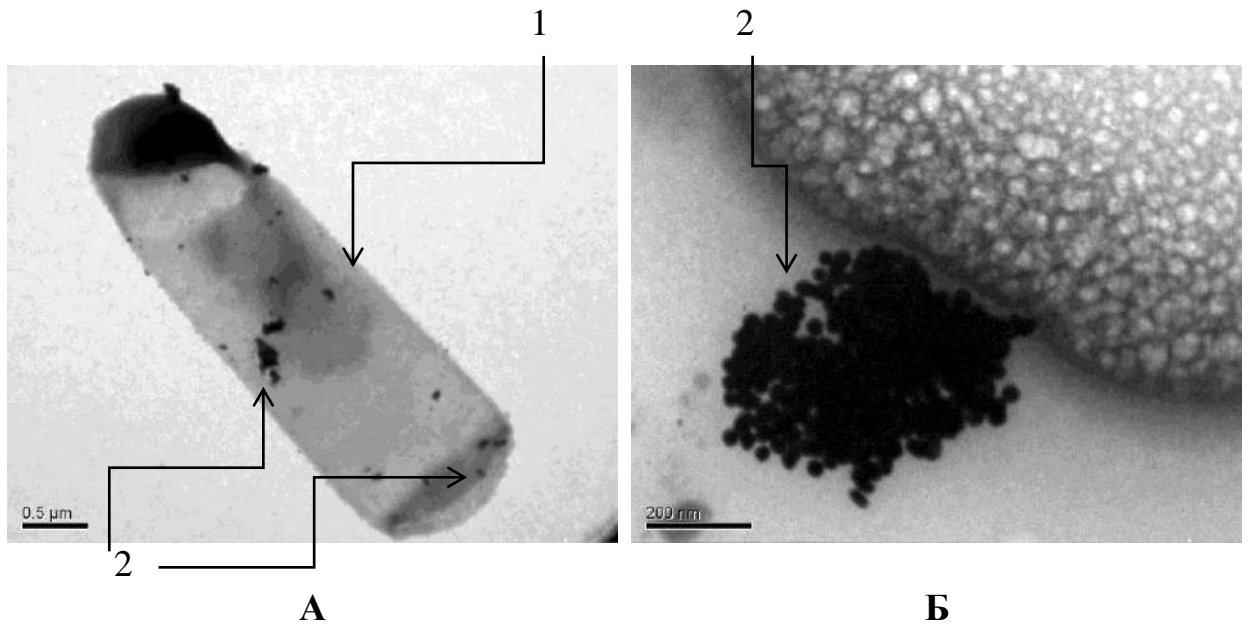


Рис. 3.27 Вегетативна форма клітини штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 за взаємодії з NPAu у розведенні 1:1 (А) та спорова форма – 1:2 (Б) (дані TEM; JEM–1230, JEOL, Японія): 1 – вегетативна форма *B. anthracis* штаму Sterne 34F2; 2 – NPAu.

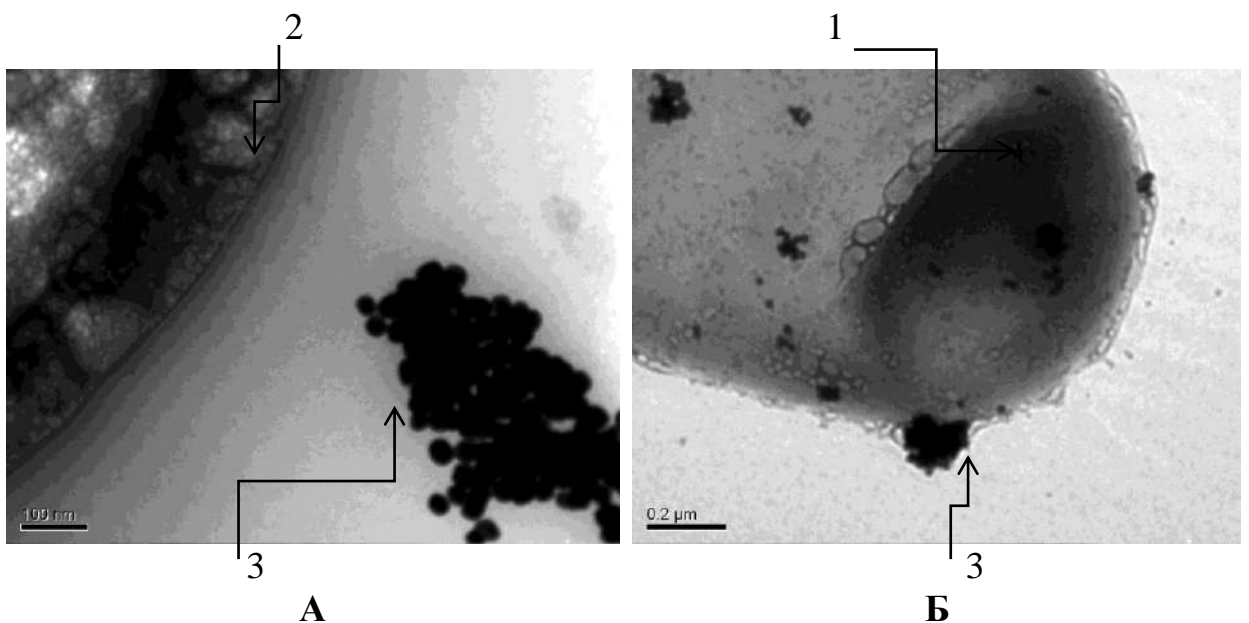


Рис. 3.28 Спорова форма клітини штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 за взаємодії з NPAu у розведенні 1:4 (А) та вегетативна форма – 1:8 (Б) (дані TEM; JEM–1230, JEOL, Японія).

Отже, є очевидним, що один з механізмів, що визначає природу взаємодії NPMe з прокаріотичною клітиною, полягає у пасивній локалізації

металів та може ґрунтуватися на фізико-хімічному їх зв'язуванні структурними компонентами клітинної мембрани. Поряд з цим, природа цього явища може бути зумовлена й реакціями метаболізм-залежного механізму, відповідального за взаємодію з наночастинками металів.

Тому в подальшому ми проводили визначення індикаторних показників структурно-функціонального стану прокариотичних клітин за дії дослідних NPMe та після ліофілізації/регідратації.

3.2.3 Інтенсивність приросту біомаси клітин *Escherichia spp.*, *Pasteurella spp.* і *Salmonella spp.* за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації. У цієї серії експериментів проводили культивування бактеріальних клітин на відповідних поживних середовищах з вмістом NPAu і NPAg (9:1) розміру ~ 30 нм з вихідною концентрацією 19,3 мкг/мл і 86,4 мкг/мл за металом впродовж 24 год за температури 37 ± 1 °C та подальшу їх ліофілізацію/регідратацію. У роботі використовували періодичні культури *P. multocida* штамів 5, 15, 396, 606, 877 і 1718 та *E. coli* штамів 4, 20, 25 і 57.

Результати визначення інтенсивності накопичення біомаси прокариотичних клітин за дії NPMe виражали кінетичними кривими, які відображено на рисунках 3.29 – 3.42.

Встановлено, що введення NPAu до середовища культивування у кінцевій концентрації 1,16 мкг/мл за металом перед етапом ліофілізації сприяло вираженому приросту рівня біомаси клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 (рис. 3.29) та *E. coli* штамів 4, 20 і 57 (рис. 3.30, 3.31) у середньому на 22,2 і 8,0 % та на 42,0, 21,7 і 22,8 % ($P < 0,05$) відповідно у порівнянні з контрольним рівнем цього показника.

У випадку попереднього культивування бактеріальних клітин у присутності NPAg у кінцевій концентрації 2,59 мкг/мл за металом встановлювали вірогідне збільшення біомаси *P. multocida* штамів 606 і 877 (рис. 3.29) та *E. coli* штамів 20 і 57 (рис. 3.30, 3.31, Б) у середньому на 11,6 і

61,5 % та на 36,4 і 8,1 % ($P < 0,05$) відповідно у порівнянні з контрольним зразком.

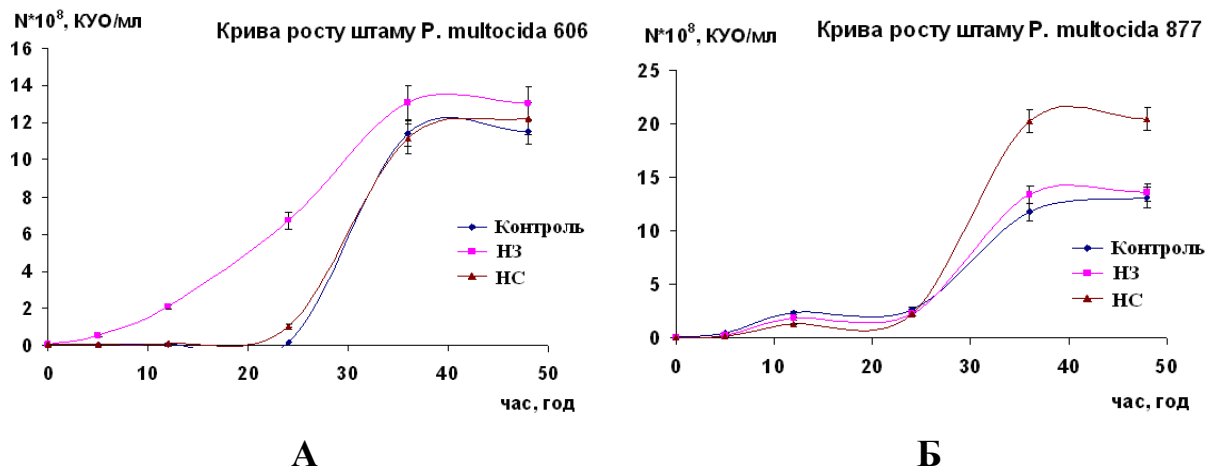


Рис. 3.29 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *P. multocida* штамів 606 (А) і 877 (Б) за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) і NPAg (НС) та після ліофілізації/регідратації, D_{640} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

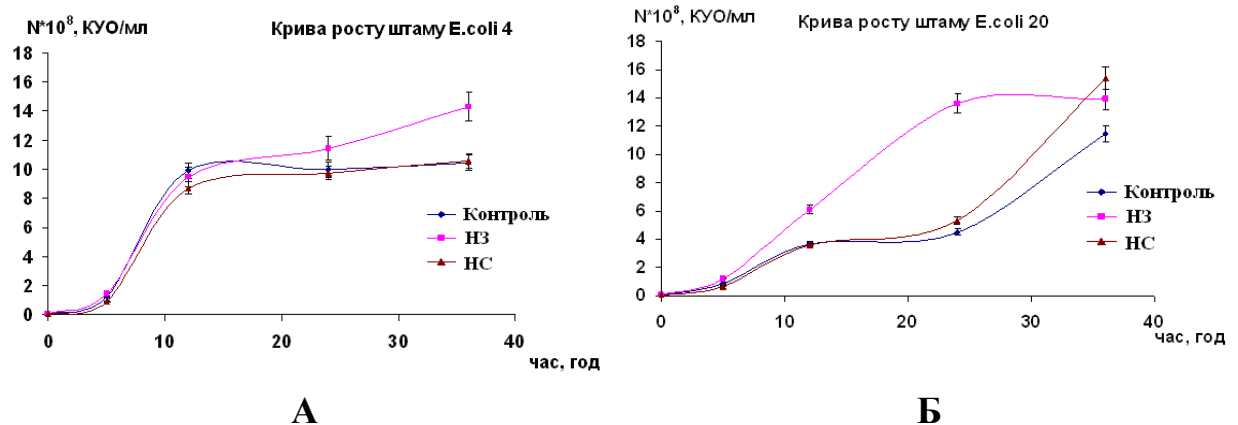


Рис. 3.30 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *E. coli* штамів 4 (А) і 20 (Б) за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) і NPAg (НС) та після ліофілізації/регідратації, D_{640} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

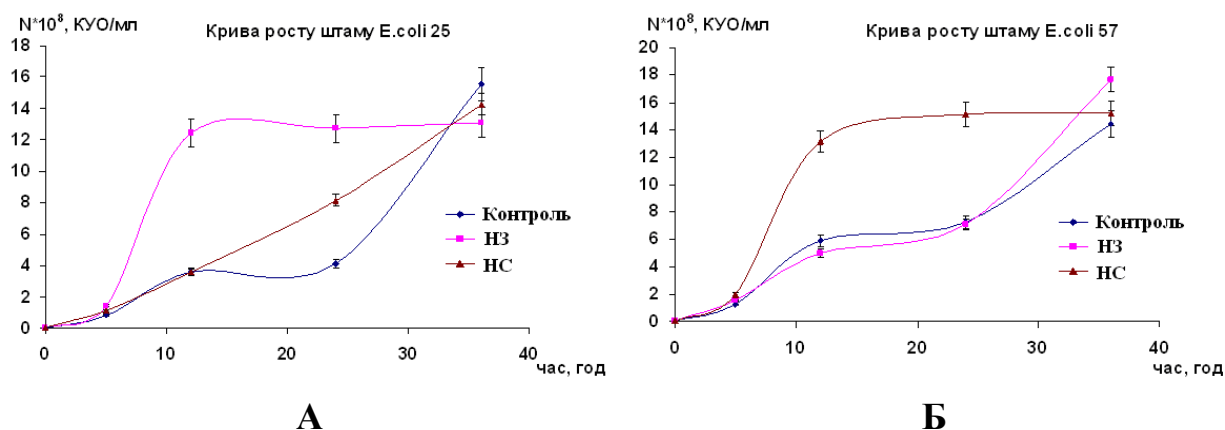


Рис. 3.31 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *E. coli* штамів 25 (А) і 57 (Б) за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) і NPAg (НС) та після ліофілізації/регідратації, D_{640} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Отримані результати свідчать, що для *P. multocida* штамів 15 і 396 (рис. 3.32) введення обох видів NPMe не призводило до статистичних змін рівня приросту біомаси, порівняно з таким у контролі.

Незначну стимуляцію приросту біомаси встановлювали при дослідженні проліферативної активності клітин *P. multocida* штамів 396, які культивували у присутності NPAu, у перші 24 год після деліофілізації.

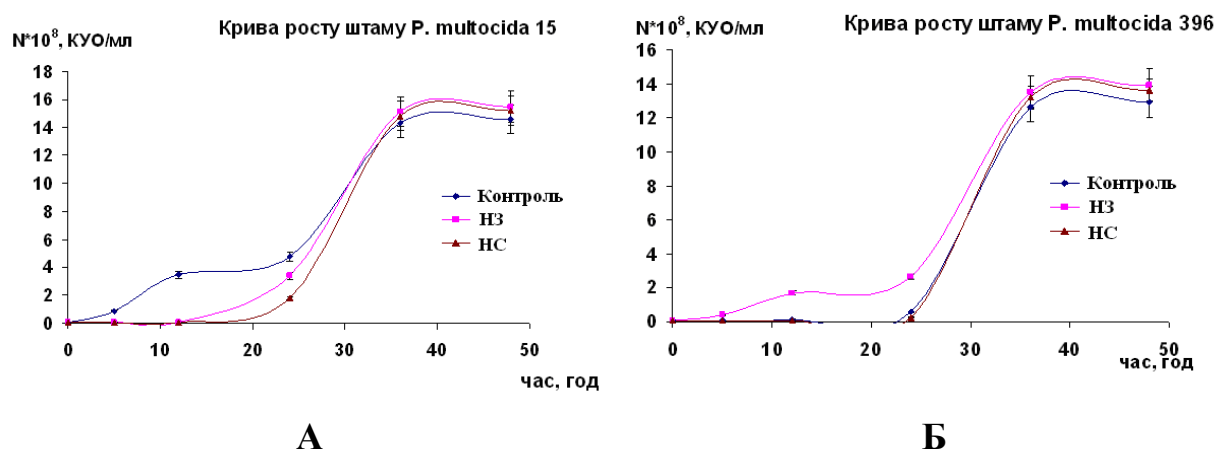


Рис. 3.32 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *P. multocida* штамів 15 (А) і 396 (Б) за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) і NPAg (НС) та після ліофілізації/регідратації, D_{640} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

За введення до середовища інкубації біомаси *P. multocida* штаму 5 обох видів NPMe (рис. 3.33, А) призводило до зменшення рівня приросту біомаси відносно контрольних значень показника та було більш вираженим у випадку застосування NPAg, ніж NPAu.

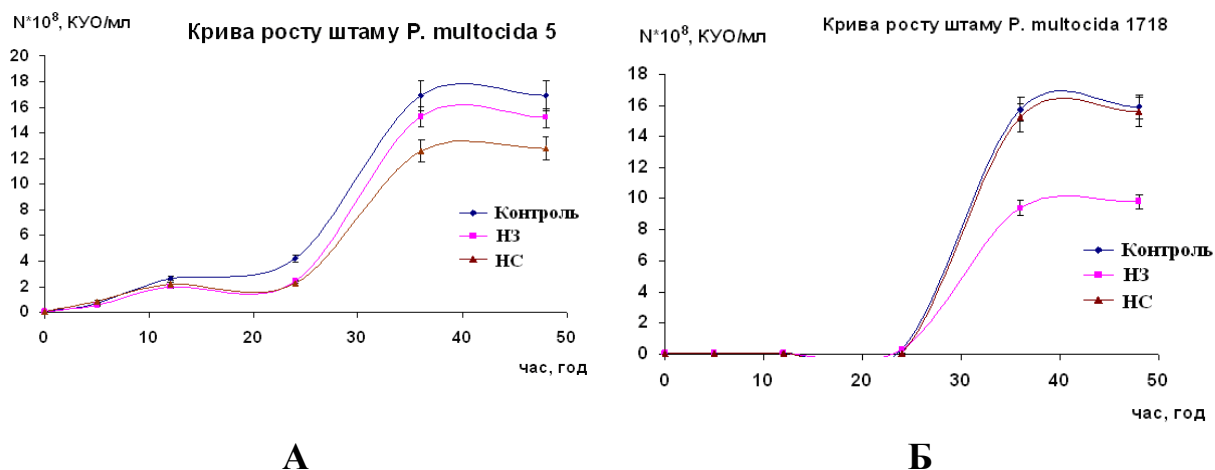


Рис. 3.33 Інтенсивність накопичення біомаси клітин *P. multocida* штаму 5 (А) і 1718 (Б) за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) і NPAg (НС) та після ліофілізації/регідратації, D_{640} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Аналогічного висновку можна дійти щодо впливу NPAu в зазначеній концентрації на *P. multocida* штаму 1718 (рис. 3.33, Б), оскільки визначали виражене зниження приросту біомаси у порівнянні з контрольним показником.

Культивування бактеріальної маси клітин штамів *S. Dublin* 12, *S. Enteritidis* 34 і М та *S. Typhimurium* 16 проводили за введення до середовища інкубації NPAu в діапазоні концентрації 0,03–1,93 мкг/мл та NPAg – 0,07–4,32 мкг/мл за металом розміру ~30 нм відповідно.

Типові зображення кінетичних кривих приросту біомаси клітин *Salmonella* spp. дослідних штамів за умов попереднього культивування з NPMe та подальшої їх ліофілізації/регідратації наведені на рисунках 3.34 – 3.42.

Так, за рівнем накопичення біомаси клітин штаму *S. Dublin* 12 виявились ефективними NPAu: у кінцевої концентрації 1,01 мкг/мл (рис. 3.34) показник КУО/мл після ліофілізації/регідратації підвищувався в середньому на 41,7 % ($P < 0,05$), тоді як у концентрації 0,24–0,48 мкг/мл за металом (рис. 3.35) – знижувався у порівнянні з його контрольним рівнем. У діапазоні концентрацій 0,015–0,12 мкг/мл за металом не встановлювали статистичних змін приросту біомаси регідратованих клітин *S. Dublin* 12.

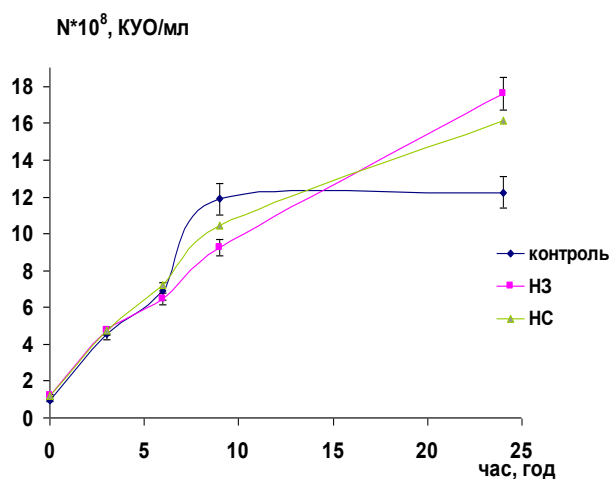


Рис. 3.34 Інтенсивність приросту біомаси клітин *S. Dublin* 12 за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) і NPAg (НС) у концентраціях 1,01 і 0,29 мкг/мл за металом та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Внаслідок додавання до середовища культивування клітин штаму *S. Dublin* 12 з NPAg у концентрації 0,29 мкг/мл за металом після деліофілізації реєстрували підвищення приросту їх біомаси, що в середньому складало 34,3 % ($P < 0,05$) (рис. 3.34).

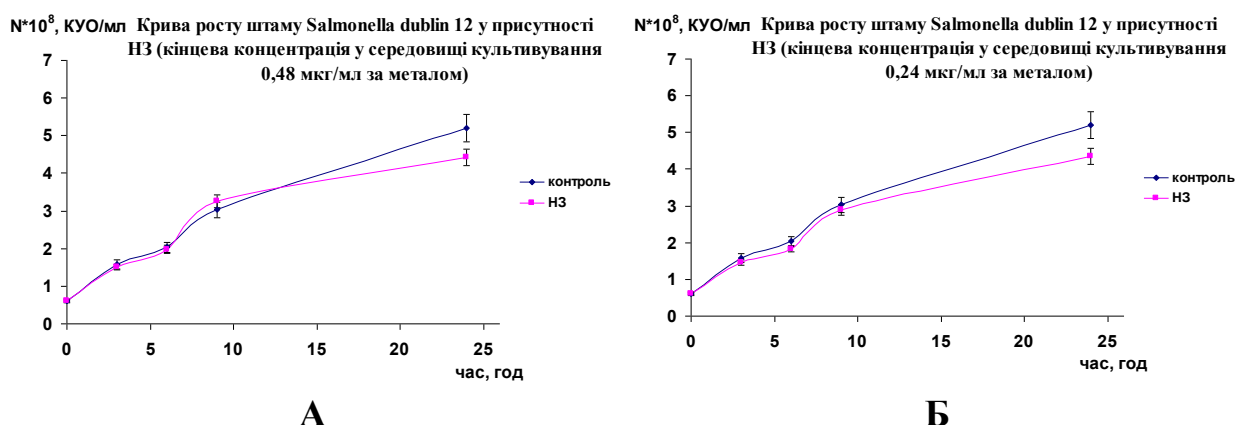


Рис. 3.35 Інтенсивність приросту біомаси клітин *S. Dublin* 12 за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) у концентраціях 0,48 (А) і 0,24 (Б) мкг/мл за металом та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Але пригнічення інтенсивності приросту біомаси регідратованих клітин цього штаму визначали за дії NPAg у діапазоні концентрацій 0,14–4,32 мкг/мл за металом (рис. 3.36, А) відповідно у порівнянні з контрольним рівнем показника.

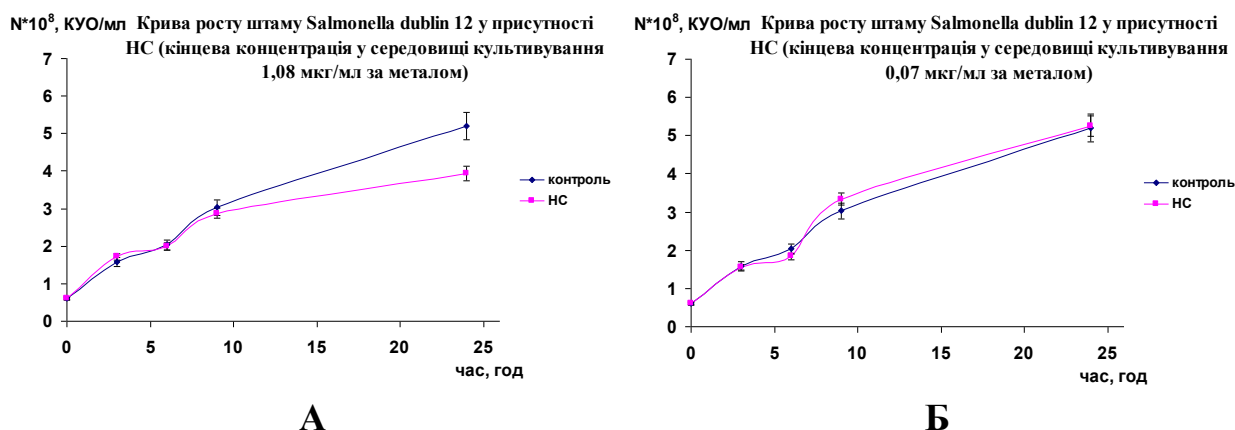


Рис. 3.36 Інтенсивність приросту біомаси клітин *S. Dublin* 12 за умов культивування з додаванням NPAg (НС) у концентраціях 1,08 (А) і 0,07 (Б) мкг/мл за металом та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Використання NPAg у кінцевій концентрації 0,07 мкг/мл за металом не викликало у подальшому статистичних змін інтенсивності приросту біомаси клітин штаму *S. Dublin* 12 (рис. 3.36, Б).

Типові зображення характеру кінетичних кривих приросту біомаси регідратованих клітин штаму *S. Typhimurium* 16 за впливу NPAu і NPAg представлені на рисунках 3.37 і 3.38.

Так, за попередньої взаємодії з NPAu у діапазоні концентрацій 0,12–1,93 мкг/мл за металом (рис. 3.37) рівень накопичення біомаси регідратованих клітин цього штаму вірогідно підвищувався у середньому від 15,3 до 35,4 % ($P < 0,05$) у порівнянні з таким у контрольного зразка. Отримані дані засвідчили, що за впливу NPAu в концентраціях менших за 0,12 мкг/мл за металом рівень показника КУО/мл клітин цього штаму не відрізнявся від його контрольних значень.

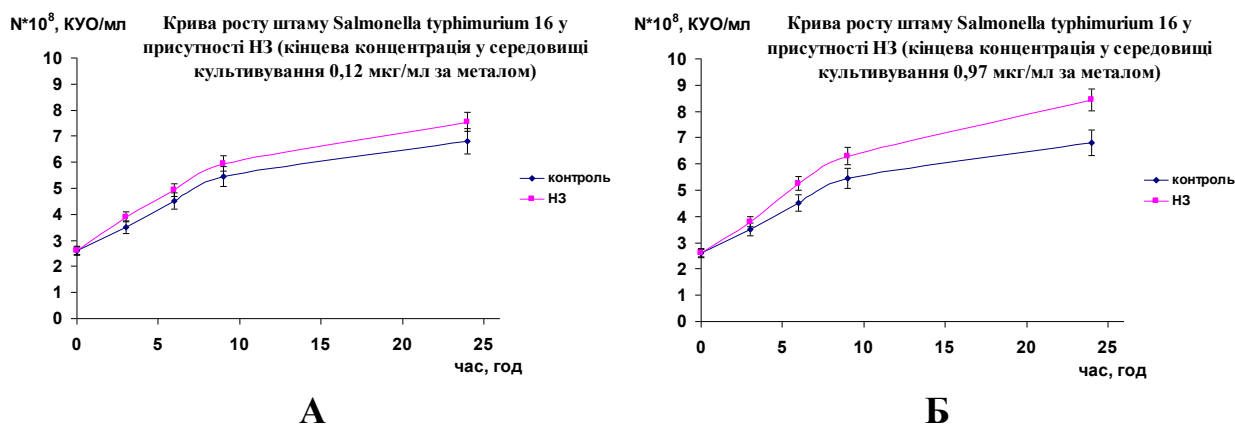


Рис. 3.37 Інтенсивність приросту біомаси клітин *S. Typhimurium* 16 за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) у концентраціях 0,12 (А) і 0,97 (Б) мкг/мл за металом та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P<0,05$ відносно контролю).

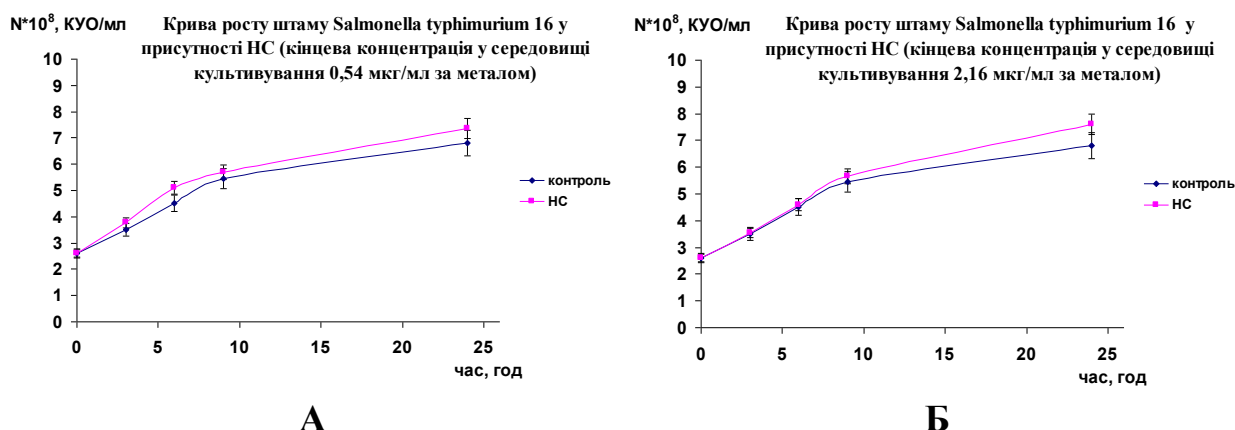
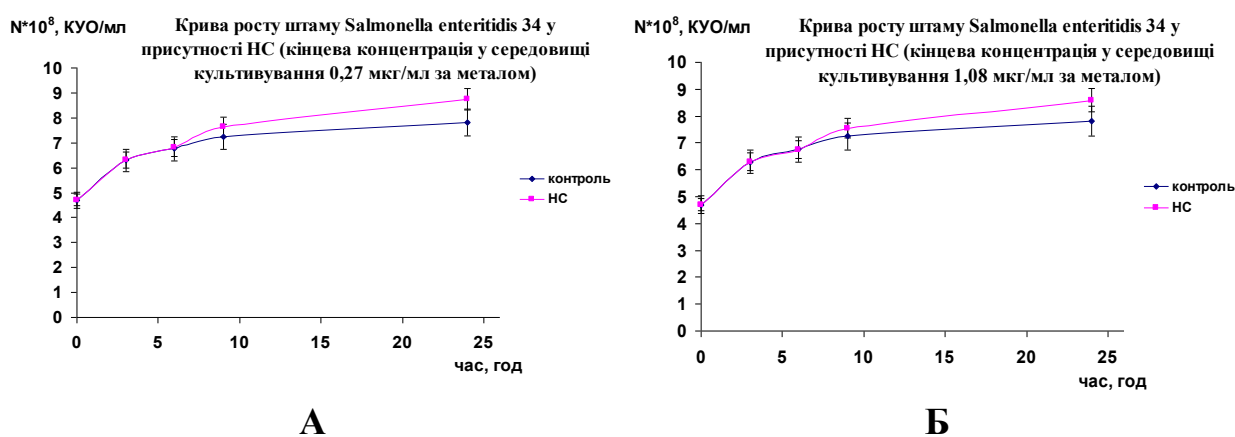
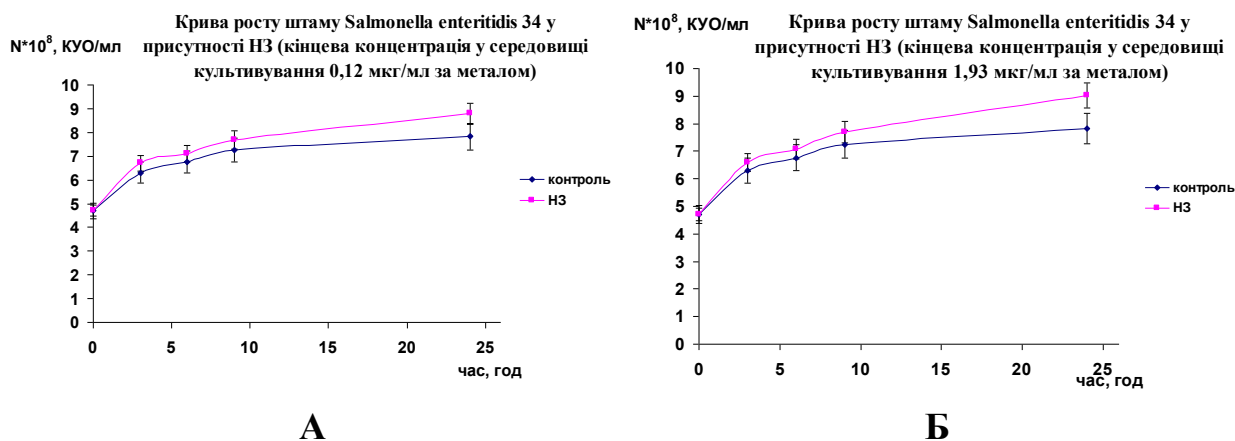


Рис. 3.38 Інтенсивність приросту біомаси клітин *S. Typhimurium* 16 за умов культивування з додаванням NPAg (НС) у концентраціях 0,54 (А) та 2,16 (Б) мкг/мл за металом та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P<0,05$ відносно контролю).

Ефективними при культивуванні клітин штаму *S. Typhimurium* 16 виявились також NPAg в широкому діапазоні концентрацій 0,54–4,32 мкг/мл за металом (рис. 3.38): підвищення рівня приросту біомаси регідратованих клітин варіювало від 11,9 до 18,5 % ($P<0,05$) у порівнянні з таким у контрольному зразку. Встановлено, що за впливу NPAg у концентраціях

нижчих за 0,54 мкг/мл за металом рівень утворення клітин цього штаму наближався за значенням до контрольного показника.

За результатами досліджень інтенсивності приросту біомаси клітин штаму *S. Enteritidis* 34 після ліофілізації/регідратації перспективними виявилися NPAu та NPAg у діапазоні концентрацій 0,12–1,93 та 0,14–1,08 мкг/мл за металом, типові кінетичні криві яких представлені на рисунках 3.39 і 3.40.



Так, найвищий рівень приросту біомаси клітин цього штаму, які культивували за присутності NPAu та NPAg , дорівнював у середньому 19,7 та 16,5 % ($P < 0,05$) у порівнянні з таким у контрольній пробі.

Встановлено, що за впливу NPAu в діапазоні концентрацій 0,015–0,060 мкг/мл та NPAg – у найменшій та найбільшій концентраціях 0,035 та 4,32 мкг/мл за металом відповідно рівень утворення клітин цього штаму за значенням наближався до контрольного.

Встановлено, що за попереднього культивування регідратованих клітин штаму *S. Enteritidis* М з NPAu лише у кінцевій концентрації 0,24 мкг/мл визначали посилення приросту біомаси на 13,5 % ($P < 0,05$), а у концентраціях 0,47–1,93 мкг/мл за металом – пригнічення до 22,8 % ($P < 0,05$) відповідно у порівнянні з таким рівнем у контрольному зразку (рис. 3.41).

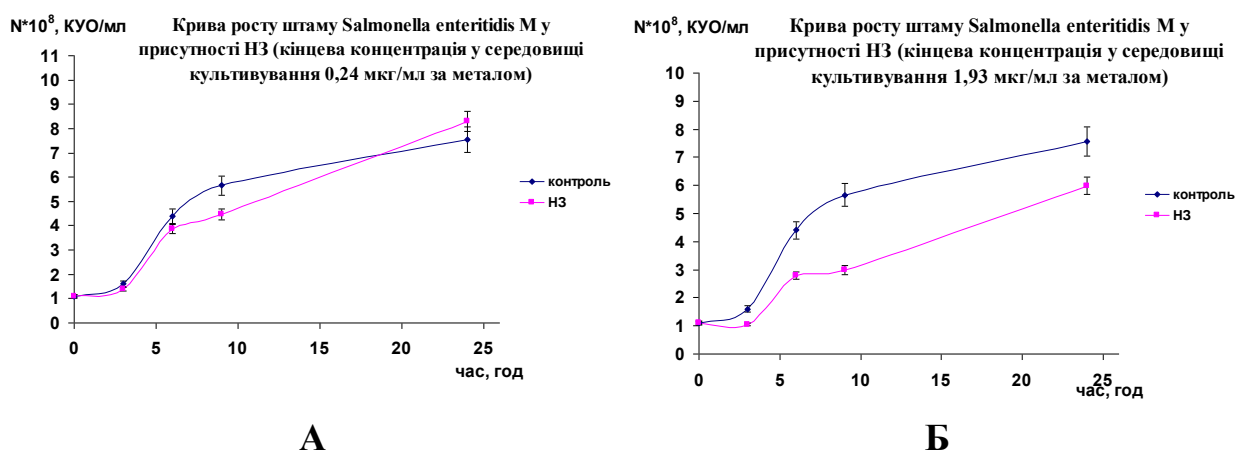


Рис. 3.41 Інтенсивність приросту біомаси клітин *S. Enteritidis* М за умов культивування з додаванням NPAu (НЗ) у концентраціях 0,24 (А) і 1,93 (Б) мкг/мл за металом та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

За аналізом приросту біомаси клітин штаму *S. Enteritidis* М перспективними виявилися NPAg : у концентраціях 0,27–2,16 мкг/мл – за зростанням рівня показника КУО/мл та 4,32 мкг/мл за металом – за його зниженням, що складало у середньому 14,7 і 11,8 % ($P < 0,05$) відповідно (рис. 3.42).

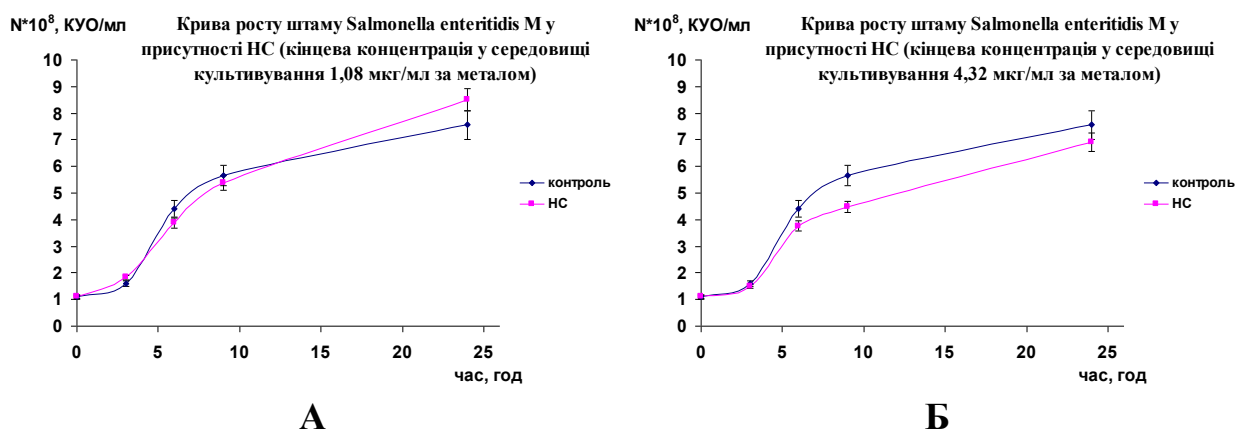


Рис. 3.42 Інтенсивність приросту біомаси клітин *S. Enteritidis* M за умов культивування з додаванням NPAg (НС) у концентраціях 1,08 (А) і 4,32 (Б) мкг/мл за металом та після ліофілізації/регідратації, D_{630} ($M \pm m$; $n=5$, $P < 0,05$ відносно контролю).

Але за впливу NPAu та NPAg у концентраціях 0,12 і 0,54 мкг/мл за металом значення рівня КУО/мл для клітин цього штаму знаходились на контрольному рівні.

Отже, за підсумком отриманих даних щодо впливу NPMe за попереднього культивування бактеріальних клітин перед етапом ліофілізації встановлено такі закономірності.

Для клітин *E.coli* усіх штамів та *P. multocida* штамів 606 і 877 можна зазначити, що введення до середовища культивування NPAu та NPAg у кінцевих концентраціях 1,16 та 2,59 мкг/мл за металом перед етапом ліофілізації сприяло підвищенню рівня приросту їх біомаси, що складало у середньому 23,3 % та 29,4 % ($P < 0,05$) у порівнянні з таким для регідратованих клітин контрольних зразків.

Дослідні NPMe за впливу на клітини *Salmonella* spp. досліджених штамів виявились перспективними щодо отримання їх біомаси в діапазоні концентрацій – 0,12–1,93 мкг/мл та 0,14–2,16 мкг/мл за металом відповідно. Так, за культивування NPMe вдалося досягти збільшення приросту біомаси регідратованих клітин штамів *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16, *S. Enteritidis* 34 і M у середньому на 22,6 % порівняно з контрольним рівнем показника.

За культивування біомаси клітин *P. multocida* штаму 5 та *E. coli* штаму 25 у присутності NPAg, навпаки, реєстрували їх бактеріостатичну дію: зниження показника КУО/мл клітин сягало 24,7 та 9,0 % відповідно порівняно з його контрольним значенням.

Слід відзначити, що NPMe за більш низьких або надвисоких концентрацій виявляли також бактеріостатичні ефекти за попереднього культивування клітин *Salmonella spp.* дослідних штамів, а саме: за впливу NPAu у концентрації нижчій за 0,12 мкг/мл та починаючи з 1,93 мкг/мл, а NPAg – 0,14 мкг/мл та 4,32 мкг/мл за металом відповідно.

Таким чином, отримані результати дозволили експериментально обґрунтувати застосування NPAu та NPAg розміру ~30 нм у певному діапазоні концентрацій при отриманні біомаси клітин *Escherichia spp.*, *Pasteurella spp.* і *Salmonella spp.* промислово значимих штамів після ліофілізації/регідратації.

Наукову новизну способу застосування NPMe при культивуванні мікроорганізмів було підтверджено і захищено патентом України на корисну модель (Додаток 3) [536].

3.2.4 Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних показників їх регуляції у мембранах клітин *Escherichia spp.* за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації. Біосумісність NPAu розміру ~20 нм, ~30 нм і ~45 нм і NPAg розміру ~30 нм з вихідною концентрацією 19,3 мкг/мл і 86,4 мкг/мл за металом оцінювали за визначенням показників структурно-функціонального стану мембран бактеріальних клітин після ліофілізації/регідратації продуктів ліпопероксидації – ДК і МДА та карбоксильних похідних окислювальної модифікації білків – нейтрального і основного характеру, а також показників АОС – активності каталази та рівня загальної АОА.

Аналіз інтенсивності процесів ПОЛ у СМФ клітин *E. coli* штамів 57, 25, 24 і 20 за впливу ліофілізації/регідратації виявив різноспрямовані зміни. Так, з результатів, наведених у таблиці 3.40, виявляється, що у СМФ регідратованих клітин *E. coli* штамів 57, 25 і 20 реєстрували вірогідне гальмування інтенсивності процесів ПОЛ порівняно з їх рівнем у нативних клітин цих штамів (контроль).

Таблиця 3.40

Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів до та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$)

СМФ бактеріальних клітин	Продукти ПОЛ			
	СМФ нативних клітин (контроль)		СМФ клітин після ліофілізації/регідратації	
	ДК, мкмоль/л	МДА, ΔD	ДК, мкмоль/л	МДА, ΔD
<i>E. coli</i> 57	31,00 \pm 0,54	4,80 \pm 0,20	21,80 \pm 0,15*	2,98 \pm 0,05*
<i>E. coli</i> 25	54,40 \pm 1,45	7,20 \pm 0,52	32,80 \pm 3,15*	5,00 \pm 0,25*
<i>E. coli</i> 24	23,60 \pm 0,65	3,20 \pm 0,09	26,80 \pm 1,00*	3,80 \pm 0,08*
<i>E. coli</i> 20	30,80 \pm 2,05	4,40 \pm 0,25	25,40 \pm 0,80*	3,60 \pm 0,12*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ щодо значень такого показника у СМФ нативних клітин відповідного штаму (контроль).

Так, зниження рівня показника ДК після ліофілізації/регідратації клітин штамів 57, 25 і 20 складало у середньому 29,7 %; 39,7 % і 17,5 %, МДА – 37,9 %; 30,6 % і 18,2 % ($P < 0,05$) відповідно відносно їх контрольних значень.

У мембранах регідратованих клітин *E. coli* штаму 24 рівень показників ДК і МДА, навпаки, вірогідно підвищувався у середньому на 13,6 % і 18,8 % відповідно відносно їх контрольних значень.

Таким чином, отримані дані вказують на різноспрямований характер впливу процесів ліофілізації/регідратації на рівень процесів ПОЛ *E. coli* дослідних штамів у межах одного виду.

Аналіз характеру впливу NP_{Au} та NP_{Ag} на рівень утворення продуктів ПОЛ у СМФ клітин *E. coli* дозволив виявити певні дискретні значення розмірів дослідних зразків NP_{Me} . Так, на рисунках 3.43 – 3.46 відображено

вплив дослідних зразків NPАu та NPАg у певному розмірному діапазоні на рівень показників ДК і МДА у СМФ клітин *E.coli* дослідних штамів після ліофілізації/регідратації.

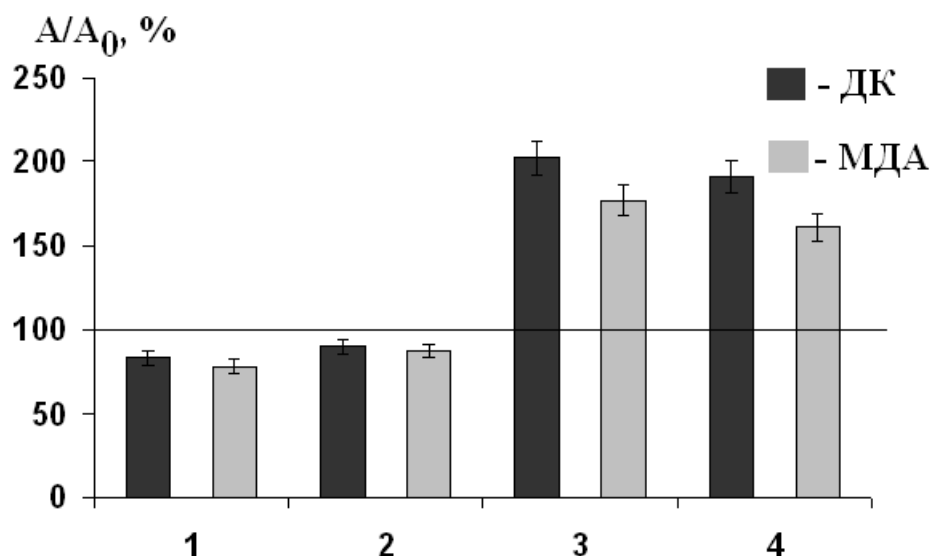


Рис. 3.43 Уміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 57 під впливом NPАu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPАg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ДК і МДА у СМФ клітин *E.coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMe (контроль).

Встановлено, що за умов преінкубації клітин *E. coli* штаму 57 з NPАu розміру ~20 нм і ~30 нм з (рис. 3.43, 1, 2) після ліофілізації/регідратації відбувалось уповільнення, а за впливу NPАu розміру ~45 нм та NPАg розміру ~30 нм (рис. 3.43, 3, 4) – посилення інтенсивності процесів ПОЛ за рівнем утворення продуктів ліпопероксидації відносно їх значень для СМФ нативних клітин (контроль, 100 %).

Так, зниження умісту ДК і МДА у СМФ клітин *E. coli* штаму 57 після ліофілізації/регідратації за впливу NPАu у середньому складало – 17,4 і 22,1 % (~20 нм) та 10,1 і 12,8 % (~30 нм) ($p \leq 0,05$), а за дії NPАu (~45 нм) та NPАg – збільшення – на 102,8 і 77,2 % та на 90,8 і 61,1 % ($P < 0,05$) відповідно відносно контрольних значень показників.

У СМФ регідратованих клітин *E. coli* штаму 25 (рис. 3.44) реєстрували уповільнення інтенсивності процесів ПОЛ за умов взаємодії з усіма варіантами обох видів NPMe відносно їх контрольного рівня.

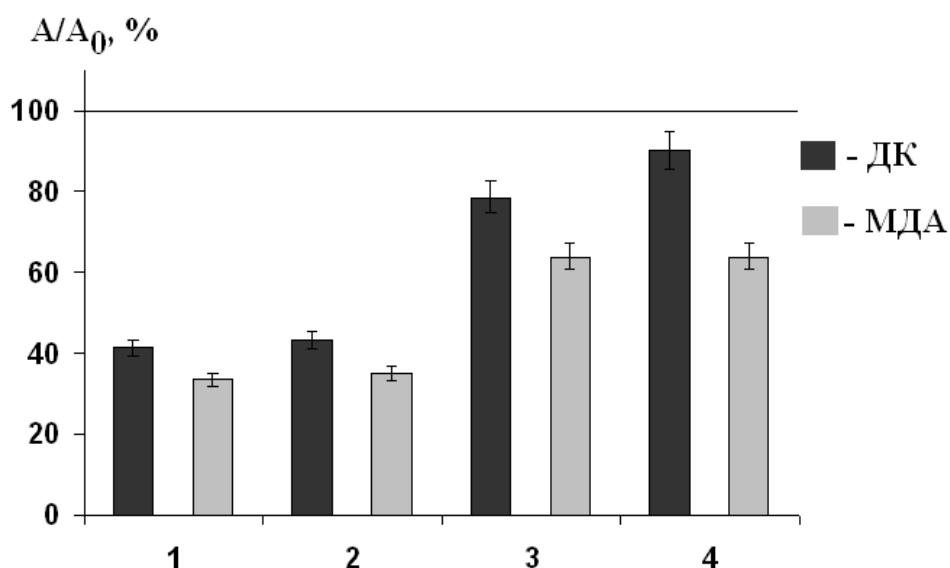


Рис. 3.44 Уміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 25 під впливом NPAu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ДК і МДА у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMe (контроль).

Так, вірогідне зниження рівня ДК і МДА за умов преінкубації клітин цього штаму під впливом NPAu після ліофілізації/регідратації у середньому дорівнювало: 2,4; 2,3; 1,3 рази і 3,0; 2,8; 1,6 рази (рис. 3.44, 1 – 3), а під впливом NPAg – 9,8 % і 36,0 % (рис. 3.44, 4) відповідно відносно їх контрольних значень.

На рисунку 3.45 наведені результати впливу наночастинок металів на стан процесів ПОЛ у СМФ клітин *E. coli* штаму 24. Встановлено, що внаслідок контактної взаємодії клітин *E. coli* штаму 24 з NPAu і NPAg у всьому розмірному діапазоні не відбувалось значних змін вмісту продуктів ліпопероксидації.

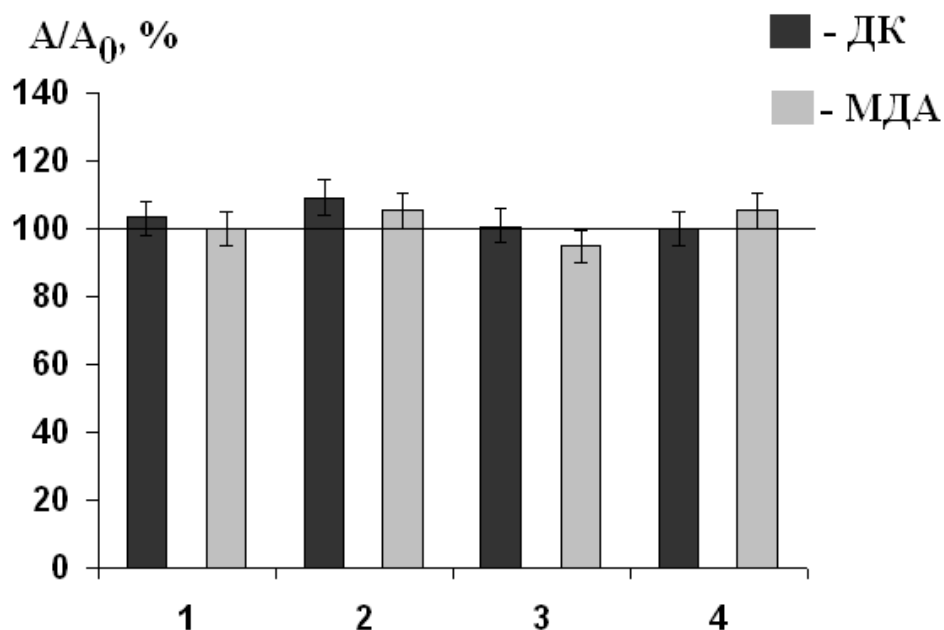


Рис. 3.45 Уміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у мембранних фракціях клітин *E.coli* штаму 24 під впливом NPAu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ДК і МДА у СМФ клітин *E.coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMe (контроль).

Виняток складало незначне підвищення рівня ДК і МДА у випадку преінкубації клітин цього штаму з NPAu та NPAg розміру ~30 нм (рис. 3.45, 2, 4) у середньому на 9,0 % відносно контрольних значень цих показників.

Дані, що відображені на рисунку 3.46, свідчать, що внаслідок взаємодії дослідних зразків NPAu і NPAg з клітинами *E. coli* штаму 20 після ліофілізації/регідратації також не було встановлено значних змін рівня утворення продуктів ПОЛ.

Виняток складало вірогідне підвищення значень ДК і МДА у СМФ клітин цього штаму за взаємодії з NPAu розміру ~30 нм (рис. 3.46, 2) у середньому на 22,8 і 22,2 % та тенденція до підвищення значень показників за взаємодії з NPAu ~45 нм (рис. 3.46, 3) відповідно відносно контрольного рівня показників.

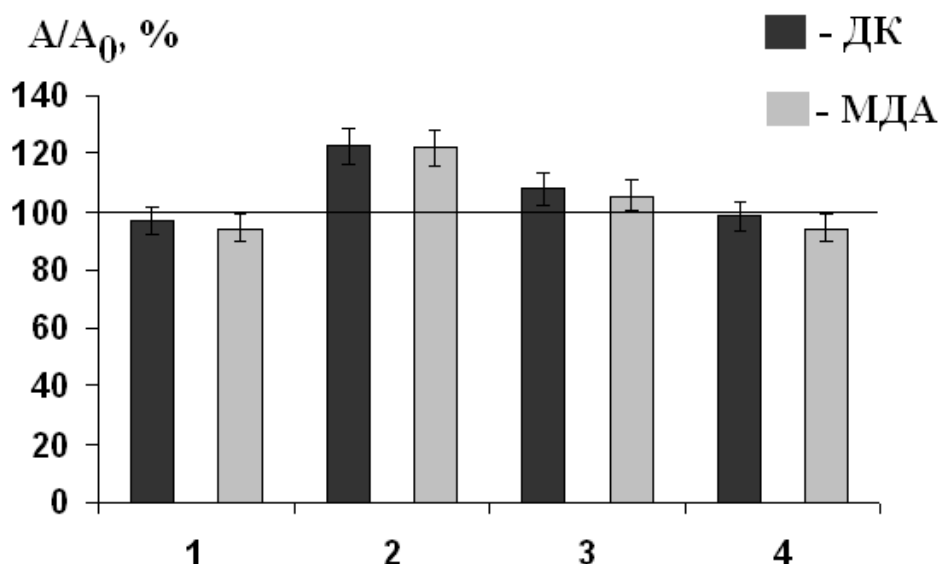


Рис. 3.46 Уміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 20 під впливом NPAu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ДК і МДА у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMе (контроль).

За підсумком отриманих результатів щодо преінкубації NPAu і NPAg певного дискретного розміру з *E. coli* після ліофілізації/регідратації у СМФ клітин штаму 57 (рис. 3.43, 1, 2); штаму 25 (рис. 3.44, 1 – 4); штаму 24 (рис. 3.45, 1, 3) та штаму 20 (рис. 3.46, 1, 3, 4) встановлювали регуляцію рівня інтенсивності процесів ПОЛ за рівнем утворення його продуктів. У цих випадках значення показників ДК і МДА у СМФ клітин за відповідних умов культивування після ліофілізації/регідратації або були нижчими, або наближались до контрольного рівня таких показників.

Клітини *E. coli* штаму 57 після ліофілізації/регідратації виявились резистентними щодо впливу NPAu і NPAg розміру ~45 нм і ~30 нм, а штамів 20 і 24 – щодо NPAu розміру ~30 нм відповідно. У таких випадках реєстрували надмірне накопичення мембранотоксичних продуктів ліпопероксидації в СМФ клітин цих штамів після ліофілізації/регідратації.

Результати дослідження характеру впливу процесів ліофілізації/регідратації на інтенсивність ОМБ у СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів наведені в таблиці 3.41.

Таблиця 3.41

Інтенсивність процесів окиснювальної модифікації білків у СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів до та після ліофілізації/регідратації (M±m; n=5)

СМФ екстрактів бактеріальних клітин	Карбоксильні похідні нейтрального і основного характеру, ммоль/г білка			
	СМФ нативних клітин (контроль)		СМФ клітин після ліофілізації/регідратації	
	НХ	ОХ	НХ	ОХ
<i>E. coli</i> 57	2,12±0,05	1,06±0,02	1,31±0,03*	0,680±0,002*
<i>E. coli</i> 25	4,17±0,20	2,98±0,12	11,40±2,15*	6,00±0,31*
<i>E. coli</i> 24	1,30±0,18	0,80±0,04	1,96±0,10*	1,12±0,04*
<i>E. coli</i> 20	3,20±0,08	1,43±0,04	4,28±0,20*	2,44±0,08*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при $P < 0,05$ відносно значень такого показника в СМФ нативних клітин відповідного штаму (контроль).

Встановлено, що у СМФ регідратованих клітин *E. coli* штаму 57 реєстрували вірогідне зниження вмісту похідних НХ і ОХ у середньому на 38,2 % і 35,8 % відносно їх значень для нативних клітин цього штаму (контроль).

При визначенні рівня утворення карбоксильних похідних НХ і ОХ у СМФ клітин *E. coli* штамів 25; 24 і 20 після ліофілізації/регідратації визначено, навпаки, вірогідне посилення інтенсивності ОМБ відносно їх рівня в нативних клітин (контроль). Так, збільшення рівня похідних НХ у СМФ регідратованих клітин штамів 25; 24 і 20 складало у середньому 173,6; 50,8 і 33,8 %, а ОХ – 101,6 %; 40,0 % і 70,6 % ($P < 0,05$) відповідно відносно значень таких показників контрольних зразків.

Результати визначення інтенсивності процесів ОМБ за рівнем утворення карбоксильних похідних у СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів за впливу NPMе після ліофілізації/регідратації відображені на рисунках 3.47 – 3.50.

Необхідно підкреслити, що застосування обох видів NPMе у всьому вивченому розмірному діапазоні приводило до вірогідного зниження рівня карбоксильних похідних у СМФ клітин *E. coli* після ліофілізації/регідратації усіх обраних штамів. На рисунку 3.47 наведені результати впливу NPMе на стан процесів ОМБ у мембранах клітин *E. coli* штаму 57.

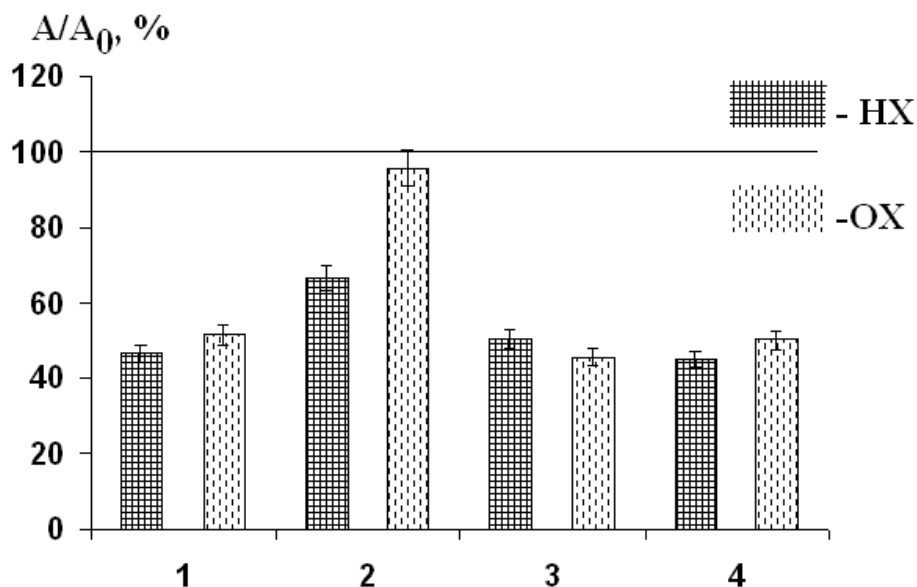


Рис. 3.48 Уміст карбоксильних похідних нейтрального (HX) і основного (OX) характеру в мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 57 під впливом NPAu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ОМБ у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMе (контроль).

У СМФ клітин *E. coli* штаму 57 (рис. 3.47, 1 – 4) за впливу NPAu і NPAg у розмірному діапазоні було встановлено вірогідне зниження вмісту похідних HX та OX відносно їх контрольного рівня, що у середньому складало у межах 1,5–2,2 та 1,9–2,2 разів ($P < 0,05$) відповідно.

На рисунку 3.48 наведені результати впливу NPMе на стан процесів ОМБ у мембранах клітин *E. coli* штаму 25. Встановлено, що за взаємодії NPAu розміру ~20, ~30, ~45 нм та NPAg ~30 нм у СМФ регідратованих клітин *E. coli* штаму 25 (рис. 3.49) рівень утворення похідних вірогідно знижувався, що дорівнювало для показника HX у межах 3,2–10,8 та

19,0 разів, а для ОХ – 1,5–4,9 та 30,0 разів ($P < 0,05$) відповідно відносно їх контрольних значень.

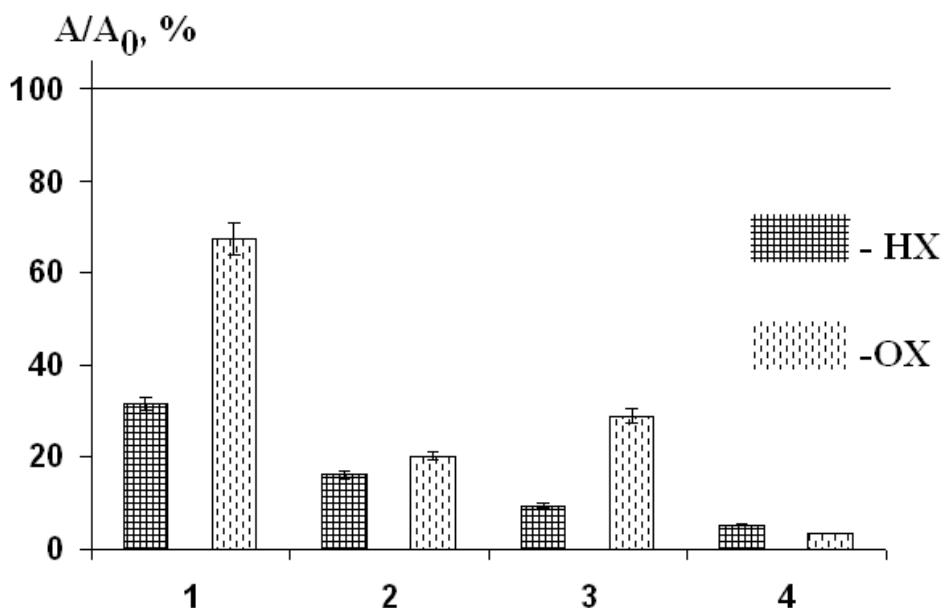


Рис. 3.48 Уміст карбоксильних похідних нейтрального (HX) і основного (OX) характеру в мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 25 під впливом NPAu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ОМБ у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMе (контроль).

На рисунку 3.49 наведені результати впливу NPMе на стан процесів ОМБ у мембранах клітин *E. coli* штаму 24.

У мембранних фракціях регідратованих клітин *E. coli* штаму 24 за взаємодії з NPAu розміру ~20, ~30 і ~45 нм (рис. 3.49, 1 – 3) рівень похідних ОМБ був також вірогідно зниженим у порівнянні з контрольним: HX у середньому – на 13,3; 26,5 і 45,4 %, ОХ – на 20,5 і 36,6 % відповідно, з NPAg (рис. 3.49, 4): HX і ОХ у середньому – на 52,0 і 39,3 % відповідно.

Дані, які відображено на рисунку 3.50, ілюструють також виражене гальмування утворення карбоксильних похідних ОМБ за умов взаємодії клітин *E. coli* штаму 20 з NPMе обох видів після ліофілізації/регідратації.

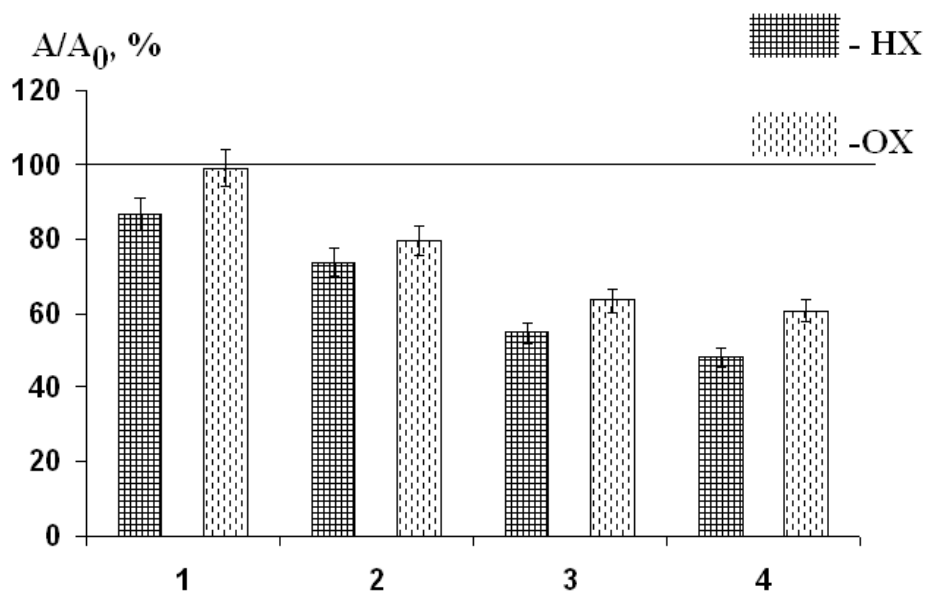


Рис. 3.49 Уміст карбоксильних похідних нейтрального (HX) і основного (OX) характеру в мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 24 під впливом NP Au розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NP Ag ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ОМБ у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NP Me (контроль).

Так, кратність зниження вмісту похідних HX і OX в СМФ клітин цього штаму за взаємодії з NP Au (рис. 3.50, 1 – 3) коливався у середньому в 3,9 і 3,2 разу ($P < 0,05$), а з NP Ag (рис. 3.50, 4) – у 13,4 і 9,0 разу ($P < 0,05$) щодо їх рівня після ліофілізації/регідратації (контроль, 100%).

За підсумком результатів досліджень щодо впливу процесів ліофілізації/регідратації на інтенсивність процесів ПОЛ і ОМБ у мембранах *E. coli* визначено штамову відмінність.

При визначенні впливу культивування дослідних зразків NP Me з клітинами *E. coli* обраних штамів на інтенсивність процесів окиснення, у цілому слід відзначити біосумісність та регуляторну дію NP Au і NP Ag у вивченому розмірному діапазоні щодо утворення їх продуктів і деградованих (модифікованих) похідних через переокиснення ліпідів і білків у мембранах клітин *E. coli* після ліофілізації/регідратації.

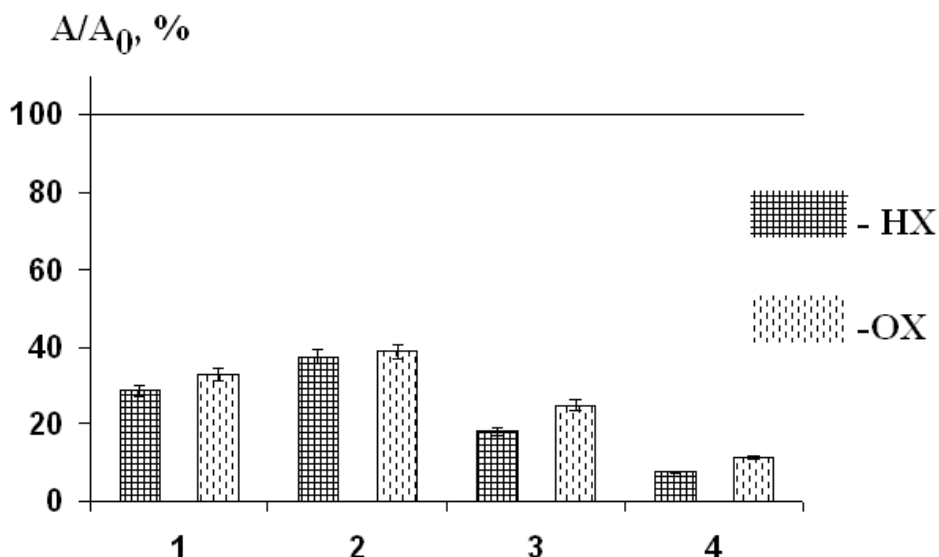


Рис. 3.50 Уміст карбоксильних похідних нейтрального (HX) і основного (OX) характеру в мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 20 під впливом NPAu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників ОМБ у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMе (контроль).

Отримані результати вказують на виражену мембранотропність NPAu і NPAg для клітин *E. coli* розміру ~30 нм і ~45 нм та на властивість регулювати інтенсивність процесів окиснення основних структурних складових біомембран прокаріотичних клітин. Але слід підкреслити, що даний ефект носить залежний від дискретного розміру NPMе характер та є індивідуальним для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізму.

У подальшому було визначено рівень показників, що характеризують стан АОС захисту мембран нативних клітин *E. coli* різних штамів та після ліофілізації/регідратації. Результати дослідження показників АОС у СМФ нативних клітин *E. coli* дослідних штамів до та після ліофілізації/регідратації наведені у таблиці 3.42.

Встановлено, що внаслідок ліофілізації/регідратації відбувалась виражена інгібіція активності каталази у СМФ клітин *E. coli* усіх обраних штамів. Вірогідне зниження величини її активності в мембранах

регідратованих клітин штамів 57; 25; 24 і 20 складало у середньому 3,2; 4,5; 1,8 і 1,5 разу відповідно відносно її контрольного рівня.

Таблиця 3.42

Рівень каталазної активності та загальної АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів до та після ліофілізації/регідратації (M±m; n=5)

СМФ бактеріальних клітин	Показники АОС			
	СМФ нативних клітин (контроль)		СМФ клітин після ліофілізації/регідратації	
	активність каталази, ммоль H ₂ O ₂ /сек мг білка	загальна АОА, % інгібіції	активність каталази, ммоль H ₂ O ₂ /сек мг білка	загальна АОА, % інгібіції
<i>E. coli</i> 57	17,44±2,00	24,40±1,25	5,76±0,40*	12,20±1,15*
<i>E. coli</i> 25	20,52±1,45	16,00±1,60	4,54±0,25*	10,67±0,80*
<i>E. coli</i> 24	6,64±0,30	34,40±1,60	3,76±0,18*	75,40±3,20*
<i>E. coli</i> 20	2,36±0,05	50,80±4,60	1,60±0,08*	83,60±5,50*

Примітка. * – різниця значень показника вірогідна при ($p \leq 0,05$) щодо значень такого показника в СМФ нативних клітин *E. coli* відповідного штаму (контроль).

Встановлено, що посилення інтенсивності процесів ПОЛ у клітинах *E. coli* штаму 24 та ОМБ – штамів 24 і 20 внаслідок ліофілізації/регідратації супроводжувалось збільшенням рівня загальної АОА, що складало у середньому 119,2 % та 64,6 % ($P < 0,05$) відносно його контрольного значення.

Але, для клітин *E. coli* штамів 57 і 25 після ліофілізації/регідратації визначене гальмування процесів ПОЛ супроводжувалось зниженням рівня загальної АОА у середньому на 50,0 і 33,3 % ($P < 0,05$) та величини активності каталази – в 3,0 і 4,5 разу ($P < 0,05$), що дозволяє стверджувати про слабку потужність біологічного потенціалу клітин цих штамів при зберіганні у ліофілізованому стані. Слід підкреслити, що в СМФ клітин штаму 57 реєстрували також гальмування інтенсивності процесів ОМБ (табл. 3.41).

На рисунку 3.51 наведено рівень показників АОС у мембранних фракціях *E. coli* штаму 57 за дії NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації.

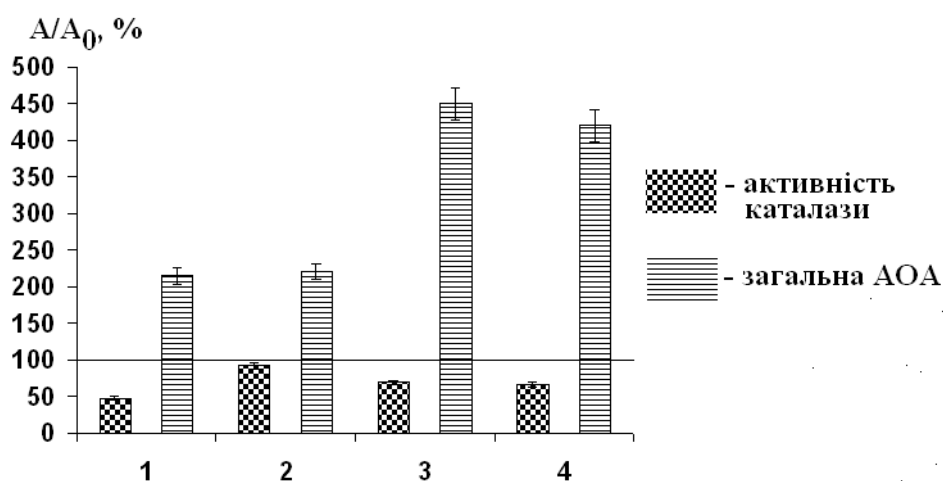


Рис. 3.51 Рівень активності каталази та загальної АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 57 під впливом NPAu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників АОС у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMe (контроль).

Так, внаслідок попереднього культивування клітин *E. coli* штаму 57 у присутності NPAu і NPAg обраного розмірного діапазону після ліофілізації/регідратації реєстрували вірогідне гальмування активності каталази та збільшення рівня загальної АОА, що складало у середньому 1,4–2,1 разу та 2,2–4,5 разу ($P < 0,05$) відносно їх контрольних значень.

Каталазна активність мембран клітин за умов впливу NPAu розміру ~30 нм (рис. 3.51, 2) набувала незначного зниження.

Характер змін активності каталази у СМФ клітин *E. coli* штаму 25 був іншим (рис. 3.52, 1 – 3): внаслідок преінкубації з NPAu у всьому розмірному діапазоні її величина збільшувалась від 1,6 до 4,9 разів ($P < 0,05$) щодо контрольного рівня ензиму.

Активність каталази в СМФ клітин цього штаму за взаємодії з NPАg розміру ~30 нм (рис. 3.52, 4), навпаки, знижувались відносно її контрольного рівня, що у середньому складало 1,8 разу ($P < 0,05$).

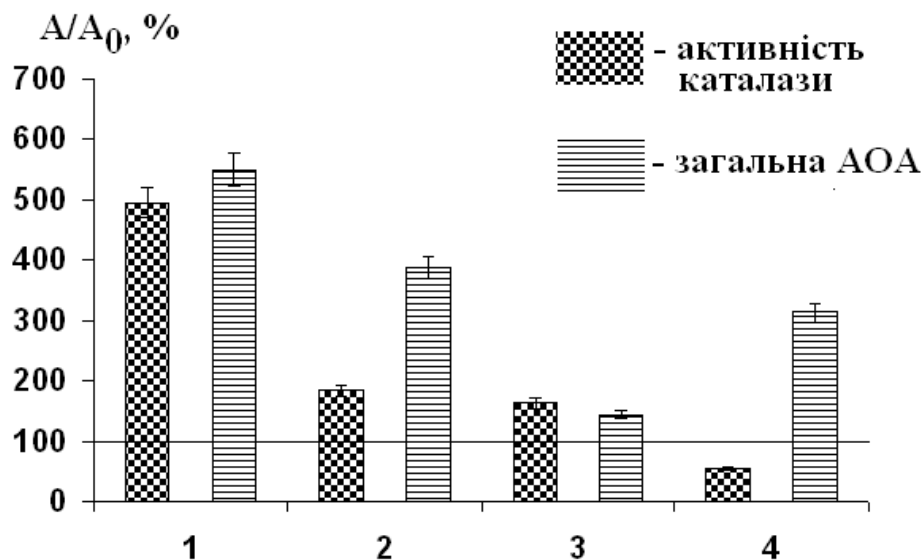


Рис. 3.52 Рівень активності каталази та загальної АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 25 під впливом NPАu розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPАg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників АОС у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMe (контроль).

Рівень показника загальної АОА у мембранах клітин штаму 25 внаслідок взаємодії з NPMe обох видів вірогідно зростав у середньому в 5,5 (рис. 3.52, 1), 3,9 (рис. 3.52, 2), 1,4 (рис. 3.52, 3) і 3,1 разу (рис. 3.52, 4) відповідно щодо контрольних значень показника.

На рисунку 3.53 відображено стан показників АОС у мембранах клітин клітин *E. coli* штаму 24 за попередньої інкубації з NPАu і NPАg та після ліофілізації/регідратації.

Слід відзначити, що за умов взаємодії NPАu розміру ~30 нм і ~45 нм (рис. 3.53, 2, 3) у СМФ регідратованих клітин спостерігали пригнічення ендогенних антиоксидантних ресурсів, а саме вірогідне зниження як

активності каталази, так й рівня загальної АОА відносно контрольних значень цих показників.

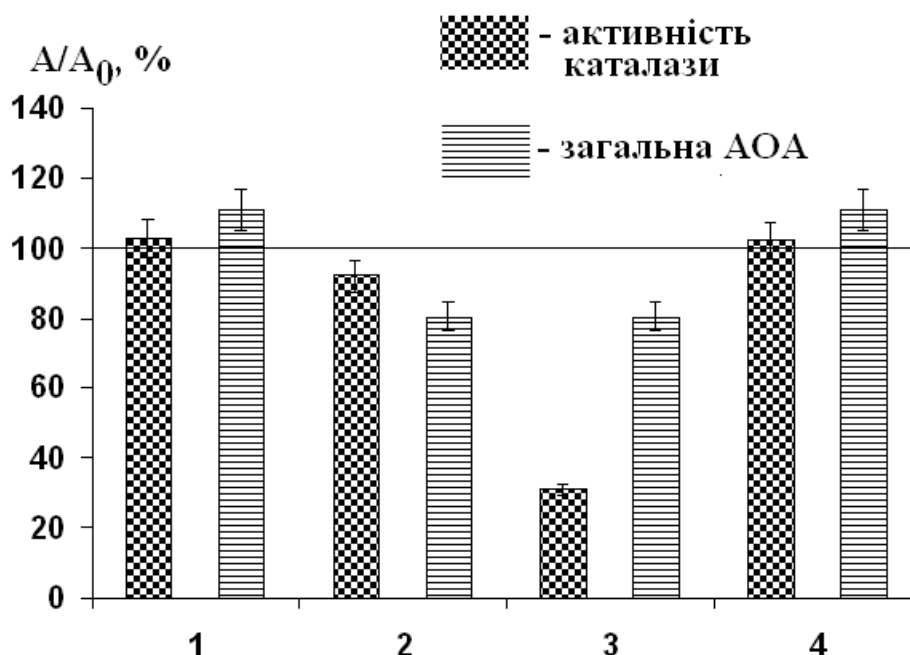


Рис. 3.53 Рівень активності каталази та загальної АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 24 під впливом NPAu середнього розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPAg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників АОС у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMе (контроль).

За умов використання в інкубаційній суміші NPAu розміру ~20 нм та NPAg ~30 нм (рис. 3.53, 1, 4) статистичних змін активності каталази в СМФ регідратованих клітин цього штаму не реєстрували на тлі підвищення рівня показника загальної АОА у середньому на 10,9 % ($P < 0,05$) відносно її контрольних значень.

На рисунку 3.54 відображено стан показників АОС у СМФ клітин *E. coli* штаму 20 за умов преінкубації з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації.

Так, внаслідок взаємодії NPAu розміру ~30 і ~45 нм (рис. 3.54, 2, 3) клітинами визначали зниження активності каталази, а розміру ~30 нм – зниження рівня показника загальної АОА ($P < 0,05$), відносно їх контрольних значень.

За культивування клітин *E. coli* цього штаму з NPАg розміру ~30 нм (рис. 3.54, 4) реєстрували, навпаки, посилення активності каталази у середньому в 3,1 разу на фоні зниження рівня загальної АОА – на 19,6 % ($P < 0,05$) відповідно.

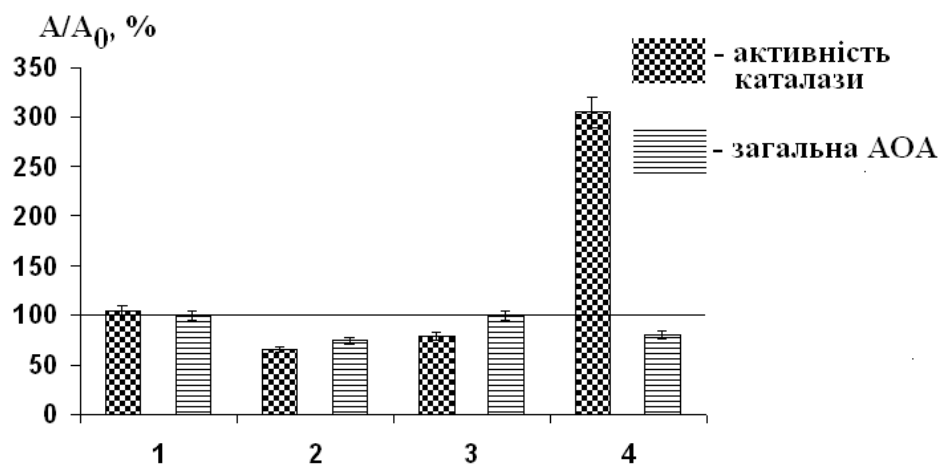


Рис. 3.54 Рівень активності каталази та загальної АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 20 під впливом NPАu середнього розміру ~20 нм (1), ~30 нм (2), ~45 нм (3), NPАg ~30 нм (4) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийнято значення рівня показників АОС у СМФ клітин *E. coli* відповідного штаму після ліофілізації/регідратації за відсутності впливу NPMe (контроль).

Підсумовуючи вищезазначене, слід підкреслити, що попередня інкубація клітин *E. coli* штамів 57 і 25 з NPАu в усьому розмірному діапазоні та штамів 57, 25 і 24 з NPАg розміру ~30 нм після їх ліофілізації/регідратації призводила до підвищення рівня загальної АОА у порівнянні з її контрольним значенням.

У цілому застосування NPMe обох видів у обраному розмірному діапазоні впливало гальмуючим чином на каталазну активність в мембранах *E. coli* дослідних штамів (за виключенням її індукції у СМФ *E. coli* штаму 20 – за впливу NPАg і штаму 25 – за впливу NPАu відповідно).

Таким чином, регуляторні механізми інтенсивності ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків у мембранах ліофілізованих/регідратованих клітин *E. coli* за впливу NPАu і NPАg

характеризувалися втручанням реакцій загальної АОА і витрачанням каталазної активності, що, очевидно, призводить до гальмування утворення токсичних продуктів ПОЛ (штами 57 і 25) і похідних ОМБ (штами 57; 25; 24 і 20), та може обумовлювати потужну кріорезистентність мікроорганізмів цих штамів. У цьому випадку NPAu і NPAg розміру ~30 нм можна вважати найбільш біосумісними.

Однак, дані щодо посилення інтенсивності процесів ПОЛ у *E. coli* штаму 57 за дії NPAu і NPAg розміру ~45 нм і ~30 нм та штамів 24 і 20 – за дії NPAu розміру ~30 нм, не дозволяють зробити однозначний висновок щодо безпечного характеру їх впливу на мембрани цих клітин. Виходячи з цього, можна припустити, що потенціалу ендогенної АОС ліофілізованих клітин *E. coli* цих штамів виявилось недостатнім для зберігання нативної структури мембран, проте, беззаперечним є факт індивідуального специфічного характеру впливу NPMe в межах одного таксономічного виду.

3.2.5 Рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації. Біосумісність дослідних зразків NPAu і NPAg оцінювали за визначенням рівня інтегральних показників енергетичного обміну бактеріальних клітин за умов ліофілізації/регідратації – питомої дихальної активності та мембранної H^+ -АТФ-ази. Результати впливу ліофілізації/регідратації на активність АТФ-ази клітин *E. coli* штамів 4; 19; 20; 24; 25 і 57 відображені на рисунку 3.55.

Встановлено, що у СМФ клітин *E. coli* штаму 4 спостерігали зниження значень питомої H^+ -АТФ-азної активності за впливу ліофілізації/регідратації у середньому на 34,6 % ($P < 0,05$) у порівнянні з її контрольним рівнем.

У СМФ клітин *E. coli* штамів 19 і 24 процеси ліофілізації/регідратації не викликали вірогідних змін величини питомої H^+ -АТФ-азної активності.

У СМФ клітин *E. coli* штамів 20; 25 і 57 рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності після їх ліофілізації/регідратації підвищувався в середньому в 3,9;

1,5 і 2,2 разу ($P < 0,05$) відповідно у порівнянні з контрольним показником ензиматичної активності.

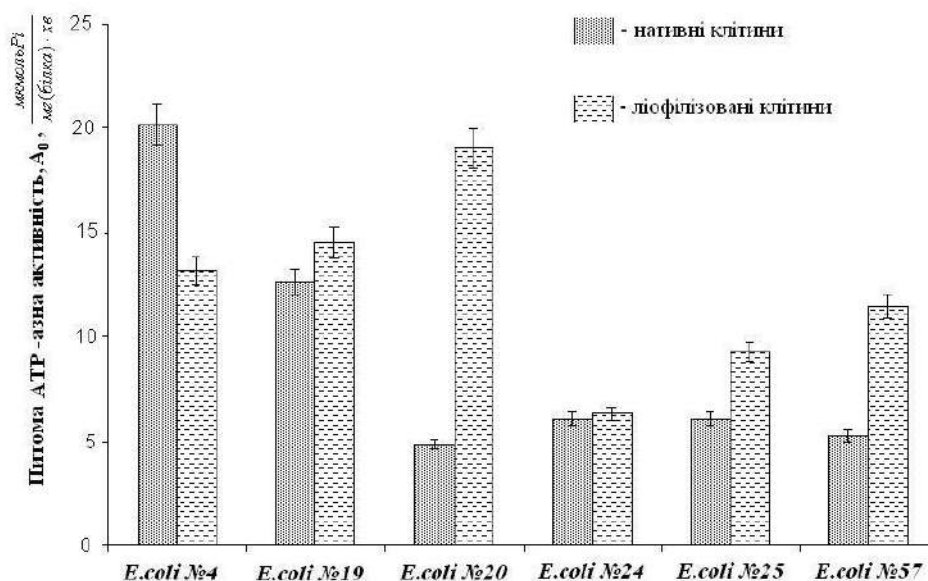


Рис. 3.55 Рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності (A_0) у мембранних фракціях нативних (контроль) клітин *E. coli* різних штамів та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Таким чином, наведені дані вказують на різноспрямованість впливу процесів ліофілізації/регідратації на стан клітин в межах одного виду мікроорганізмів.

Встановлено, що за впливу дослідних зразків NРМе обох видів рівень H^+ -АТФ-азної активності мембран клітин *E. coli* обраних штамів після ліофілізації/регідратації у цілому підвищувався відносно контрольного.

Найбільш виражений стимулюючий ефект щодо енергізації клітин *E. coli* дослідних штамів за підвищенням ензиматичної активності у цілому було зареєстровано за впливу NРАu розміру ~ 30 і ~ 45 нм (рис. 3.56, 3.57) та NРАg ~ 30 нм (рис. 3.59), що вказує на інтенсивний рівень гідролізу АТФ у клітинних мембранах.

Так, дані, які відображені на рисунку 3.56, ілюструють, що за впливу NРАu розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій 0,0125–1,16 мкг металу/мкг білка на клітин штамів 19; 20; 24; 25 і 57 величина мембранної H^+ -АТФ-азної

активності підвищується в середньому від 1,4 до 4,7 разів ($P < 0,05$) відносно її контрольних значень.

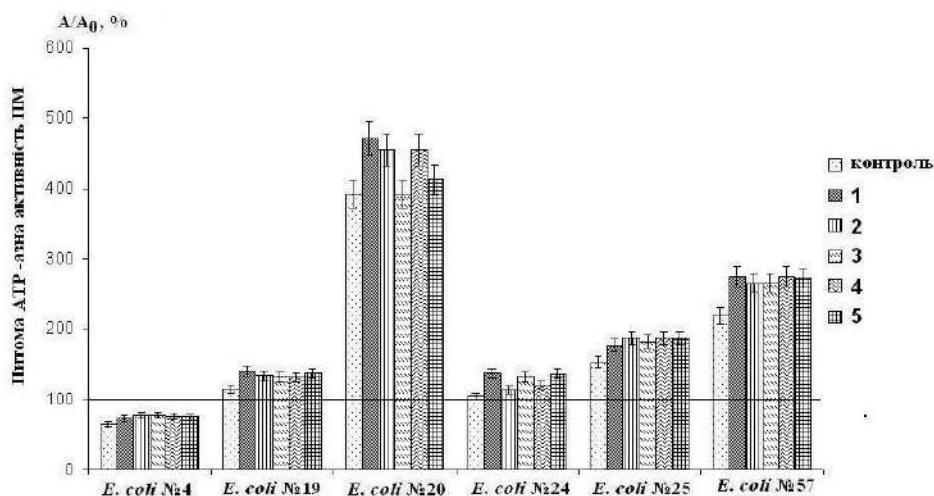


Рис. 3.56 Рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності в мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів під впливом NP_{Au} розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій: 1 – 0,0125; 2 – 0,025; 3 – 0,05; 4 – 0,10; 5 – 0,20; 6 – 1,16 мкг металу/мкг білка, після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийняте значення показника у СМФ клітин *E. coli* різних штамів за умов відсутності впливу NP_{Me} (контроль).

Встановлено, що виражений стимулюючий ефект щодо активності H^+ -АТФ-ази реєстрували у СМФ регідратованих клітин *E. coli* штамів 20 і 57 за підвищенням її величини у межах 3,9–4,7 і 2,3–2,7 разів ($P < 0,05$) щодо відносно контрольного рівня показника.

Децю нижчий відсоток збільшення активності ензиму визначали у СМФ регідратованих клітин штамів 19; 24 і 25, значення якого коливались від 20 % до 80 % ($P < 0,05$) відносно такого у контрольних зразках.

На рисунку 3.57 наведено зміни величини питомої H^+ -АТФ-азної активності мембран регідратованих клітин *E. coli* за умов попереднього культивування з додаванням NP_{Au} розміру ~ 45 нм у діапазоні концентрацій.

Отримані результати за спрямованістю змін ензиматичної активності за наданих умов впливу NP_{Au} розміру ~ 45 нм були подібними таким за їх впливу розміру ~ 30 нм у обраному діапазоні концентрацій. Так, значення

питомої H^+ -АТР-азної активності для СМФ клітин *E. coli* штаму 20 після ліофілізації/регідратації за дії NPAu перевищували контрольні значення показника у середньому в 5,0–6,0 разу ($P < 0,05$), штамів 19 і 24 – на 10–60 % та штамів 25 і 57 – в 0,5–3,3 разу ($P < 0,05$) відповідно.

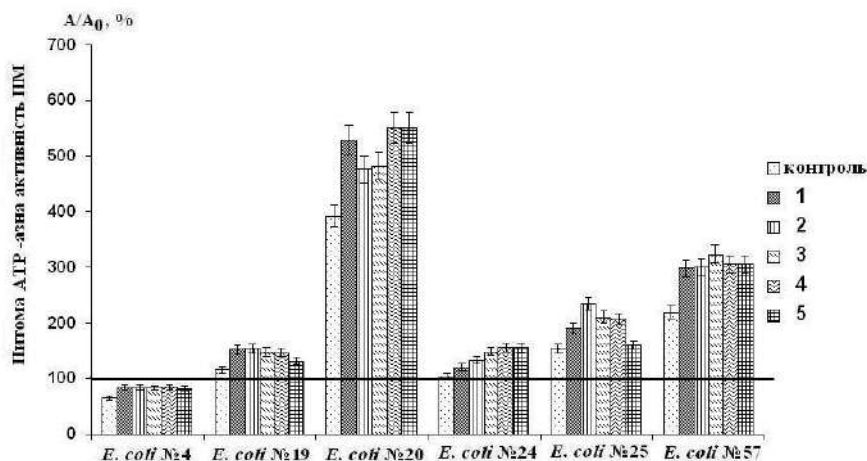


Рис. 3.57 Рівень питомої H^+ -АТР-азної активності в мембранних фракціях клітин *E. coli* різних штамів під впливом NPAu розміру ~ 45 нм у діапазоні концентрацій: 1 – 0,0125; 2 – 0,025; 3 – 0,05; 4 – 0,10; 5 – 0,20; 6 – 1,16 мкг металу/мкг білка, після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийняте значення показника у СМФ клітин *E. coli* різних штамів за умов відсутності впливу NPMe (контроль).

Встановлено, що за культивування клітин *E. coli* штаму 4 з NPAu розміру ~ 45 нм у діапазоні концентрацій відбувалось зниження активності АТР-ази у межах 10–25 % щодо контрольного рівня ензиму.

На рисунку 3.58 наведені результати дослідження активності H^+ -АТР-ази у мембранах регідратованих клітин *E. coli* обраних штамів за умов впливу NPAg розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій.

Значення питомої H^+ -АТР-азної активності в мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 20 після ліофілізації/регідратації під впливом NPAg перевищували контрольні у межах 3,8–6,2 разів ($P < 0,05$), штамів 19 і 24 – на 10–65 % та штамів 25 і 57 – у межах 1,4–3,5 разів ($P < 0,05$) відповідно (рис. 3.58).

Таким чином, визначено, що дослідні зразки NPАu розміру ~ 30 нм і ~ 45 нм та NPАg ~ 30 нм сприяють достовірно стимулюючу дію щодо питомої H^+ -АТР-азної активності мембран клітин *E. coli* штамів 19; 20; 24; 25 і 57 за умов ліофілізації/регідратації.

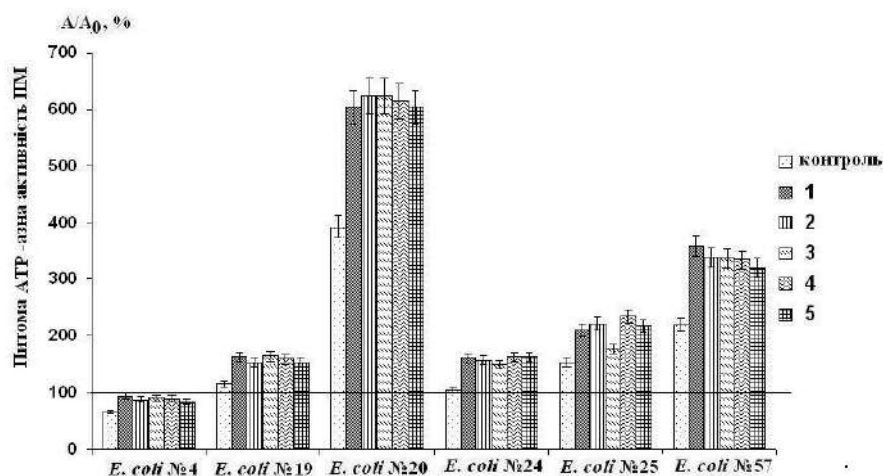


Рис. 3.58 Рівень питомої H^+ -АТР-азної активності в мембранних фракціях клітин *E. coli* різних штамів під впливом NPАg середнього розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій: 1 – 0,028; 2 – 0,055; 3 – 0,11; 4 – 0,23; 5 – 0,46; 6 – 2,59 мкг металу/мкг білка, після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За 100% прийняте значення показника у СМФ клітин *E. coli* різних штамів за умов відсутності впливу NPMe (контроль).

Вийняток складало визначене пригнічення H^+ -АТР-азної активності у мембранах клітин *E. coli* штаму 4 за впливу NPАu у вивченому діапазоні концентрацій та NPАg розміру ~ 30 нм – за нижчої та максимальної концентрацій (0,028 і 0,460 мкг металу/мкг білка), що складало у середньому 20–30 % порівняно з контрольним рівнем ензиматичної активності.

За проаналізованими особливостями інтенсивності накопичення біомаси клітин *Salmonella* spp. за умов культивування з NPMe (п. 3.2.3) є перспективними NPАu і NPАg у концентраціях 0,24–1,93 мкг/мл та 0,27–2,16 мкг/мл за металом відповідно. Тобто, при визначенні впливу NPMe на показники структурно-функціонального стану прокариотичних клітин за

ліофілізації/регідратації були обрані оптимальні їх концентрації – 1,16 мкг/мл (NPAu) і 2,59 мкг/мл (NPAg) за металом відповідно.

Результати визначення рівня питомої ДА бактеріальних клітин за умов культивування з NPAu і NPAg розміру ~30 нм після ліофілізації/регідратації наведені в таблиці 3.43.

Таблиця 3.43

**Рівень показника питомої дихальної активності клітин *Escherichia spp.*,
Pasteurella spp. і *Salmonella spp.* за впливу NPAu і NPAg
та після ліофілізації/регідратації (M±m; n=5)**

Клітини бактерій дослідних штамів	Питома ДА, $\frac{мгO_2}{л \cdot хв \cdot мг}$		
	Регідратовані клітини бактерій (контроль)	За умов попереднього впливу NPMе	
		NPAu, ~30 нм	NPAg, ~30 нм
<i>E. coli</i> 4	0,34±0,01	0,62±0,04*	0,46±0,05*
<i>E. coli</i> 20	0,31±0,01	0,56±0,03*	0,49±0,03*
<i>E. coli</i> 25	0,62±0,02	0,89±0,03*	0,83±0,02*
<i>E. coli</i> 57	0,69±0,03	0,86±0,05*	0,89±0,03*
<i>P. multocida</i> 5	0,72±0,02	0,79±0,03	0,83±0,05*
<i>P. multocida</i> 15	0,89±0,01	1,95±0,01*	3,68±0,13*
<i>P. multocida</i> 396	2,88±0,03	3,77±0,01*	3,38±0,08*
<i>P. multocida</i> 877	1,06±0,03	0,93±0,05	1,24±0,02*
<i>P. multocida</i> 1718	0,97±0,01	2,93±0,03*	2,67±0,03*
<i>P. multocida</i> 606	3,05±0,12	2,82±0,22	11,19±0,10*
<i>S. Enteritidis</i> 34	0,56±0,01	0,76± 0,01*	0,69± 0,06*
<i>S. Dublin</i> 12	1,18±0,01	1,42±0,02*	0,96±0,01
<i>S. Typhimurium</i> 16	0,940± 0,003	1,74±0,01*	0,90±0,02
<i>S. Enteritidis</i> M	1,17±0,08	1,56±0,08*	1,00±0,11

Примітка. * – різниця значень рівня показника бактеріальних клітин за впливу NPMе та після ліофілізації/регідратації вірогідна при $p \leq 0,05$ щодо його рівня для нативних клітин (контроль).

Дослідженнями встановлено (п. 3.2.3), що для регідратованих клітин *E. coli* штамів 4; 20 і 57 загалом можна зазначити, що попереднє додавання до середовища культивування NPAu сприяло стимуляції динаміки приросту їх біомаси, а додавання NPAg – для клітин штамів 20 і 57. Поряд з цим, за впливу NPAu рівень питомої ДА у регідратованих клітин *E. coli* штамів 4; 20;

25 і 57 вірогідно зростав у середньому на 82,4; 80,6; 43,5 і 24,6 % відповідно, а за впливу NPAg – на 35,3; 58,1; 33,9 і 29,0 % відповідно відносно контрольних значень показника.

За скринінгом зміни інтенсивності приросту біомаси регідратованих клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 при культивуванні з NPMe виявлено стимулюючу дію. Але зафіксовано, що NPАu сприяли індукції інтенсивності ендогенного дихання клітин *P. multocida* штамів 15; 396 і 1718 на відміну від клітин штамів 606 і 877, рівень показника питомої ДА для яких за значенням наближався до контрольного. Значення питомої ДА у клітин *P. multocida* штамів 15; 396 і 1718 після ліофілізації/регідратації перевищували її контрольний рівень у середньому на 119,1; 30,9 і 202,1 % ($P < 0,05$) відповідно.

Преінкубація біомаси клітин *P. multocida* з NPАg після ліофілізації/регідратації призводила до зростання показника ДА клітин усіх дослідних штамів у межах цього виду, максимум якого сягав 3,7 рази ($P < 0,05$).

Результати визначення активності мембранної АТР-ази бактеріальних клітин дослідних штамів за культивування з NPMe обох видів після ліофілізації/регідратації наведені в таблиці 3.44.

Виявлено, що за впливу NPАu на клітини *P. multocida* штамів 877; 1718 і 606 відбувається підвищення рівня ензиматичної активності в середньому на 52,6; 47,0 і 37,8 % ($P < 0,05$), штамів 15 і 396 – її зниження на 20,2 і 30,0 % ($P < 0,05$) відповідно відносно контрольних значень показника.

За преінкубації клітини *P. multocida* штамів 5; 877; 1718 і 606 з NPАg величина АТР-азної активності також вірогідно зростала, а клітин штамів 15 і 396 – знижувалась у порівнянні з її контрольними значеннями.

Також реєстрували позитивний вплив NPMe на фізіологічний потенціал регідратованих клітин *Salmonella* spp. Так, за впливу NPMe обох видів визначено інтенсивний приріст біомаси клітин штамів *S. Enteritidis* 34, *S. Typhimurium* 16 та *S. Dublin* 12, за впливу NPАg – клітин штаму *S. Enteritidis* М.

При визначенні рівня питомої ДА клітин штамів *S. Enteritidis* 34 і *M. S. Dublin* 12 та *S. Typhimurium* 16 дослідних штамів за взаємодії з NPMe були отримані наступні результати (табл. 3.43). Рівень показника у регідратованих клітин *Salmonella* spp. усіх дослідних штамів вірогідно зростав у межах 20,3–85,1 % щодо його контрольних значень.

Таблиця 3.44

Рівень питомої H⁺-АТФ-азної активності мембранної фракції клітин *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. за впливу NP Au і NP Ag та після ліофілізації/регідратації (M±m; n=5)

Клітини бактерій дослідних штамів	Активність H ⁺ -АТФ-ази, $\frac{\text{мкмольРi}}{\text{мг(білка)} \cdot \text{хв}}$		
	СМФ регідратованих клітин бактерій (контроль)	За умов попереднього впливу NPMe	
		NP Au, ~30 нм	NP Ag, ~30 нм
<i>P. multocida</i> 5	9,96±0,03	8,05±0,07	16,99±0,06*
<i>P. multocida</i> 15	34,6±0,23	27,6±0,31*	24,0±0,80*
<i>P. multocida</i> 396	85,44±0,96	59,81±0,06*	63,56±2,54*
<i>P. multocida</i> 877	10,55±0,05	16,10±0,16*	13,79±0,12*
<i>P. multocida</i> 1718	60,09±0,03	88,32±0,96*	72,40±1,06*
<i>P. multocida</i> 606	40,32±0,83	55,54±0,45*	46,80±0,92*
<i>S. Enteritidis</i> 34	22,53±0,04	15,19±0,04*	14,87±0,04*
<i>S. Dublin</i> 12	17,60±0,19	13,62±0,06*	12,18±0,05*
<i>S. Typhimurium</i> 16	15,45±0,08	11,16±0,06*	10,36±0,05*
<i>S. Enteritidis</i> M	30,23±2,20	23,48±1,26*	26,05±1,60*

Примітка. * – різниця значень рівня показника СМФ бактеріальних клітин за умов впливу NPMe та після ліофілізації/регідратації вірогідна при P<0,05 щодо його рівня для нативних клітин (контроль).

При цьому, за культивування клітин *Salmonella* spp. майже усіх штамів з NP Ag, навпаки, рівень питомої ДА після ліофілізації/регідратації статистично не змінювався відносно такого у контрольних зразках. Виняток складало вірогідне зростання рівня показника для регідратованих клітин штаму *S. Enteritidis* 34 у середньому на 23,2 %.

У цьому випадку визначений високий рівень приросту біомаси регідратованих клітин штамів *S. Enteritidis* 34, *S. Typhimurium* 16 та *S. Dublin*

12 супроводжувався зниженням мембранної H^+ -АТР-азної активності за культивування з NPАu і NPАg – на 24,0 і 27,6 % ($P < 0,05$) відносно контрольних значень цих показників (табл. 3.44).

Визначене гальмування H^+ -АТР-азної активності у мембранах клітин *Salmonella* spp. дослідних штамів на фоні фізіологічних значень показника питомої ДА за впливу NPMe може бути свідченням наявних структурно-функціональних ушкоджень клітинних мембран мікроорганізмів під час ліофілізації/регідратації.

Поряд з цим, одержані результати також вказують на відновлення показників обох ланок енергетичного обміну у регідратованих клітин *E. coli* штамів 4; 20 і 57, *P. multocida* штамів 5; 606; 877 і 1718 за попереднього культивування у присутності обраних NPMe, на що вказує підвищення рівня питомої H^+ -АТР-азної і дихальної активності ($P < 0,05$), та свідчить на інтенсивний гідроліз АТР у клітинних мембранах цих штамів. У даному випадку NPАu і NPАg можна розглядати як потенційні кріопротектори через їх біосумісність, що може знайти широке впровадження і використання при культивуванні та зберіганні культур мікроорганізмів у ліофілізованому стані.

У подальшому проводили вивчення впливу NPАu на інтенсивність накопичення біомаси та рівень показників енергетичного метаболізму інших за своєю біологією видів клітин прокаріотичних організмів, яким властиво утворювати спори – *Bacillus anthracis*.

3.2.6 Вивчення впливу NPАu на інтенсивність накопичення біомаси, рівень питомої H^+ -АТР-азної мембранної фракції та дихальної активності клітин вакцинного штаму *B. anthracis* Sterne 34F2. Збудник сибірської язви – антракс (*Bacillus anthracis*) – належить до числа аеробних спороутворюючих мікробів. Але, нинішні погляди науковців розглядають збудник антраксу в якості агентів, що застосовуються з метою біотероризму [537 – 539].

Так, при отриманні біомаси клітин вакцинного штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 в поживному середовищі застосовували NPАu розміру ~19,0 нм з

вихідною концентрацією 19,0 мкг/мл, а при визначенні біохімічних показників – NPAu розміру $\sim 30,0$ нм з вихідною концентрацією 38,6 мкг/мл та 77,2 мкг/мл за металом відповідно.

Встановлено, що при культивуванні в стандартному середовищі (контроль) рівень приросту біомаси клітин *B. anthracis* складав не більш ніж 10^9 проти 10^{15} КУО/мл за умов впливу NPAu відповідно.

Починаючи з розведення NPAu у середовищі культивування 1:8, осад мав більш інтенсивне (порівняно із розведенням 1:6), сірувато-синє забарвлення, визначали стимуляцію розмноження клітин, тобто збільшення приросту біомаси клітин *B. anthracis* сягало 2 lg (табл. 3.45).

Пластівців, ниток та поверхневої плівки не спостерігали. Бульйон залишався прозорим та за морфологічними, культуральними, біохімічними і гемолітичними властивостями відмінностей між культурами клітин, культивованими із додаванням NPAu та за класичною процедурою (контроль), не реєстрували [539].

З даних таблиці 3.45 виявляється, що додавання NPAu до середовища культивування у співвідношенні 1:10 вірогідно стимулювало рівень накопичення біомаси *B. anthracis* вже на 6 lg відповідно. Установлено, що максимум збільшення рівня приросту біомаси бактеріальних клітин у середовищі культивування зі вмістом NPAu у розведенні 1:8 ($1,90 \cdot 10^{-3}$ г/л) і 1:10 ($2,38 \cdot 10^{-3}$ г/л за металом) реєстрували при розведенні культури *B. anthracis* до 10^{-15} включно.

Збільшення кількості біомаси клітин *B. anthracis* за значенням КУО/мл на 2 і 6 lg перевищувало її кількість у контрольному зразку.

При культивуванні мікробної маси, починаючи з розведення 10^{-10} , в середовищі із вмістом NPAu у діапазоні співвідношення 1:2 – 1:6, 1:12 і 1:20, а також у стандартному поживному середовищі (контроль) фіксували затримку росту біомаси клітин *B. anthracis*.

**Рівень накопичення біомаси клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2
за умов культивування у присутності NPAu, lg (n=5)**

Розведення культури клітин	Умови культивування біомаси клітин <i>B. anthracis</i>							
	За умов додавання NPAu у співвідношенні							Стандартне середовище (контроль)
	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:20	
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁷	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁸	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁹	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻¹⁰	–	–	–	+	+	–	–	–
10 ⁻¹¹	–	–	–	+	+	–	–	–
10 ⁻¹²	–	–	–	–	+	–	–	–
10 ⁻¹³	–	–	–	–	+	–	–	–
10 ⁻¹⁴	–	–	–	–	+	–	–	–
10 ⁻¹⁵	–	–	–	–	+	–	–	–
10 ⁻¹⁶	–	–	–	–	–	–	–	–

Примітки: «+» – наявність приросту клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2; «–» – відсутній ріст будь-якої мікрофлори; стандартне середовище (контроль, без додавання NPAu).

Таким чином, аналіз результатів досліджень дозволяє стверджувати на наявність активної кумуляції дослідних NPAu клітинами *B. anthracis* у всіх досліджуваних варіаціях, однак, за рівнем накопичення біомаси клітин та результатами мікроскопічних досліджень (рис. 3.27, 3.28) неможливо остаточно встановити механізм цієї контактної взаємодії. Отже, можна припустити, що цей механізм може визначатися як пасивною локалізацією NPAu на поверхні *B. anthracis*, так й метаболізм-залежною їх акумуляцією, що властива тільки активно метаболізуючим енергію клітинам. Тому, у подальшому визначали величину активності питомої H⁺-АТФ-ази мембранної фракції та дихальної активності клітин *B. anthracis* за впливу NPAu.

На рисунку 3.59 відображено рівень H^+ -АТР-азної активності мембран клітин *B. anthracis* за впливу NPAu розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій.

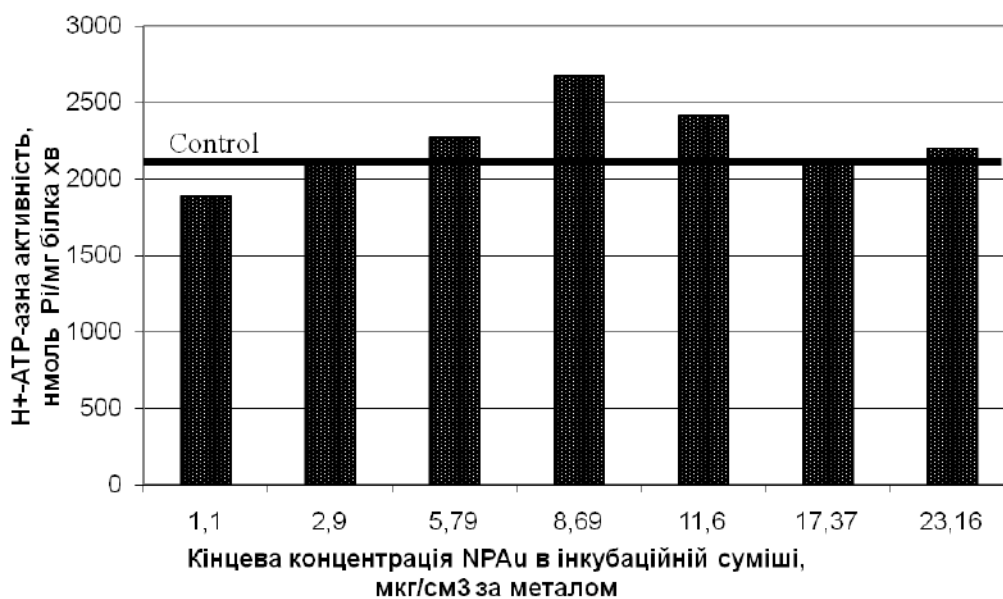


Рис. 3.59 Рівень питомої H^+ -АТР-азної активності мембранної фракції клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 під впливом NPAu розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій 1,1–23,16 мкг/мл за металом ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За контроль прийнято значення показника у СМФ клітин за культивування без додавання NPMe.

Встановлено, що найбільш виражений вплив на величину ензиматичної активності (за її збільшенням до 30 %; $P < 0,05$) у мембранах клітин, у порівнянні з її контрольним значенням спостерігали за впливу NPAu у концентрації 8,69 мкг/мл за металом.

Слід відзначити, що за взаємодії клітин *B. anthracis* з NPAu у діапазоні концентрацій 2,90–23,16 мкг/мл у цілому значення H^+ -АТР-азної активності були близьким до контрольних, а у діапазоні концентрацій – 5,69–11,16 мкг/мл за металом вірогідно зростали, що вказує на індукцію швидкості гідролізу АТР у мембранах цих клітин.

За умов додавання NPAu до середовища екльтивування клітин *B. anthracis* визначали також значну стимуляцію показника питомої ДА (рис. 3.60). Встановлено, що за впливу NPAu у діапазоні концентрацій 0,39–7,70 мкг/мл за металом збільшення рівня питомої ДА в середньому складало 74 % ($P < 0,05$) порівняно з її контрольним значенням.

При цьому концентраційну залежність динаміки значень показника від концентрації NP Au не встановлювали.

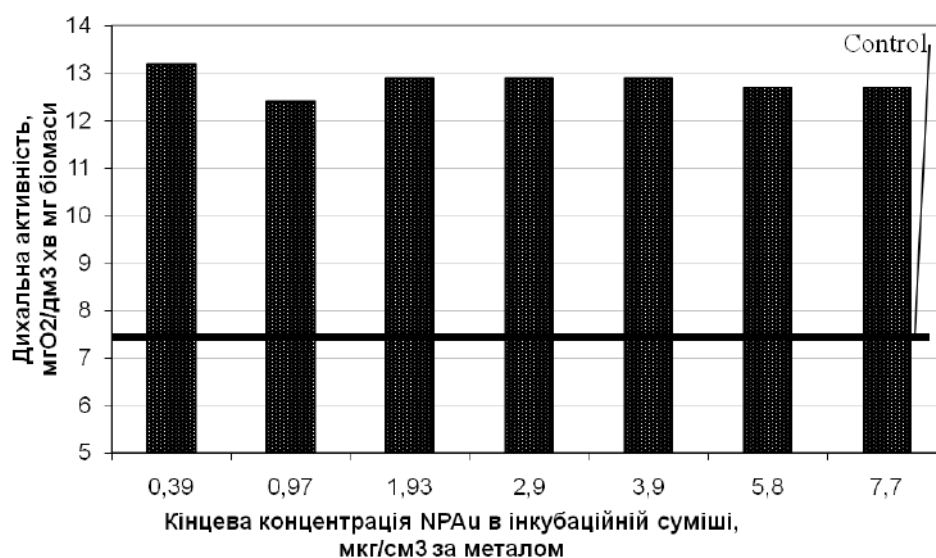


Рис. 3.60 Рівень питомої дихальної активності клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 під впливом NP Au розміру ~30 нм у діапазоні концентрацій 0,39–7,70 мкг/мл за металом ($M \pm m$; $n=5$).

Примітка. За контроль прийнято значення показника клітин за культивування без додавання NP Me.

За характером змін мембранної H⁺-АТФ-ази та показника питомої ДА під час культивування клітин, можна стверджувати про значну біосумісність та безпечність NP Au у концентраціях 2,90–11,60 мкг/мл за металом та експериментально обґрунтувати їх застосування при отриманні біомаси вакцинного штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 з високим рівнем енергізації клітин.

Наукову новизну способу застосування NP Au при отриманні біомаси клітин *B. anthracis* підтверджено і захищено патентом України на корисну модель (Додаток К) [540]. Результати підрозділу опубліковано в наукових працях (Додаток Л) [541 – 565]. Методичні рішення та результати експериментальних досліджень по визначенню біохімічної і токсикологічної характеристики колоїдних дисперсій NP Me у діапазоні розмірів і концентрацій увійшли до двох монографій [564, 565].

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Новим інноваційним сегментом сучасних біотехнологій являються продукти нанотехнологій. Наночастинки металів займають основне місце серед наноматеріалів. Більш за все привертають увагу дослідників та є перспективними наночастинки металів, які легко утворюються під час синтезу, характеризуються високою хімічною стабільністю та біодоступністю, прояви якої залежать від концентрації, розміру, шляхів і тривалості введення, від біологічної моделі, до якої вони прикладені, та яка за механізмомінша, ніж для металів у макророзмірному стані [41, 8, 81, 213, 238, 446].

У зв'язку з цим, у спеціальній літературі останніх років велика увага приділяється дослідженню потенційних факторів ризику наноматеріалів у біотехнологіях та медицині [14, 28, 40, 59, 75, 80, 81, 88, 109 – 113, 130, 146, 158, 161, 193, 201, 233, 261, 409]. Такі дослідження можуть бути адекватними лише за послідовного використання біомаркерів – ключових системних характеристик живого організму (цитологічних, фізіологічних, біохімічних, імунологічних, тощо).

Відомі наукові роботи присвячені уявленню цитотоксичної дії NPMe або лише на рівні культур клітин [256, 275, 426, 455 – 457, 459, 466], або стосовно інших видів наночастинок за своїм походженням, наприклад, карбонових нанотрубок, фулеренів, модифікованих наноалмазів, ліпосом тощо [47, 139 – 141, 413, 416, 460, 465, 470].

Але системна відповідь цілісного організму загалом на дію NPMe може значно відрізнятись від результатів, отриманих у дослідах на ізольованих клітинах [567], тому актуальність досліджень токсичної дії чистих

(немодифікованих) NPMe на клітинному, органному та рівні організму не викликає сумнівів.

У доступній літературі дослідженнями в експериментах на клітинах еукаріотичних і прокаріотичних організмів доведено, що цитотоксичність наноматеріалів, зокрема NPMe, зумовлена гено- і мутагенними ефектами [31, 83, 258, 289, 291, 309, 345, 458, 466, 469, 470].

У нашій роботі спочатку проводили дослідження в експериментах *in vitro* по визначенню безпечності (потенційної токсичності) дослідних зразків NPMe, які за фізико-хімічним походженням являють собою колоїдні дисперсії, мають певний розмір і сферичну геометрію, на моделі еукаріотичних і прокаріотичних організмів за системними біомаркерами генотоксичності, мутагенності та біохімічними маркерами цитотоксичності (за тестуванням ензиматичної активності).

Вивчення генотоксичності має бути обов'язковим елементом встановлення цитотоксичності наноматеріалів, зокрема це стосується наночастинок металів. Встановлено, що колоїдні дисперсії NPAu розміру ~20 і ~30 нм, NPAg – ~20 і ~30 нм, NPFe – ~100 нм, NPCu – ~70 нм та NPMnO₂ – ~50 нм у діапазоні концентрацій 0,22–1061,00 мкг/мл за металом не чинять токсичну дію на генетичний апарат клітин лінії CHO-K1, мутагенну – на апікальні меристеми *Allium cepa* відповідно. Тобто, дослідні зразки колоїдних дисперсій NPAu, NPAg, NPFe, NPCu і NPMnO₂ певного розміру та у діапазоні концентрацій можна вважати безпечними щодо генетичного апарату еукаріотичних тест-клітин.

Слід відзначити, що встановлена відсутність генотоксичної дії NPAu розміру ~20 і ~30 нм у діапазоні концентрацій $11,06 \cdot 10^{-5}$ – 38,6 мкг/мл за металом узгоджується з поглядами таких дослідників, які вважають ці наночастинки нетоксичними у розмірному діапазоні 0,5–100,0 нм та пояснюють цей факт інертністю саме Ауруму [266, 309 – 311]. Але іншими авторами [568] доведено, що NPAu розміру ~10 нм здатні міцно зв'язуватися з ДНК, спричинюючи конформаційні зміни молекули і, як наслідок,

зумовлюють генотоксичність і пригнічують транскрипцію. Припускається, що спорідненість ДНК-полімерази до ДНК зменшується, можливо, внаслідок переваг наночастинок у зв'язуванні з ДНК [134].

Результати щодо відсутності генотоксичної та мутагенної дії NPAg розміру ~ 20 і ~ 30 нм у мінімальній ($86,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл) і максимальній (86,0 мкг/мл за металом) концентраціях та навіть за використання системи метаболічної активації S9, навпаки, суперечать очевидній токсичності останніх через відому біоцидну дію Аргентуму [82, 171, 243, 249 – 252, 255 – 265] та генотоксичну – NPAg у концентраціях 1 і 25 мкг/л за впливу на рибу медаку [256]. Однак, є поодинокі повідомлення щодо відносно низької токсичності наночастинок цього металу для ссавців, особливо у водорозчинній формі [458].

Не зважаючи на це, інформація про генотоксичність, мутагенну і тератогенну активність наночастинок цих біометалів є обмеженою, поряд з цим бракує досліджень в системі *in vivo*.

Встановлено, що дослідні зразки NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] і NPZn розміру ~ 100 нм у діапазоні концентрації 0,12–830,00 мкг/мл за металом, навпаки, справляють генотоксичну (наявність первинних ДНК-пошкоджень, утворення апоптичних ДНК-комет з моментом «хвоста» і збільшення рівня $I_{\text{ДНК}}$) та промутагенну (зниження рівня $I_{\text{міт}}$ у межах 2,4–4,6 разу та збільшення утворення аберантних клітин у 3,9–10,0 разів) ($P < 0,05$) відповідно.

Доведено, що генотоксичний вплив дослідних колоїдів NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] та NPZn на тест-клітини не носить дозозалежний характер за тестування у діапазоні концентрацій. Отримані результати узгоджуються з визнаною властивістю високоочищених вуглецевих нанотрубок у діапазоні концентрації 1 – 50 мкг/мл чинить ушкодження ДНК Т-лімфоцитів людини, зниження життєздатності Т-лімфоцитів [569] та інгібіцію проліферації В-лімфоцитів [570], генотоксичністю NPZnO розміру 71 нм на культурі клітин бронхоальвеолярної карциноми людини поряд із зниженням життєздатності [56] та пов'язано з пригніченням метаболічної активності тест-клітин. У цих

випадках встановлені цитотоксичні ефекти не залежать від дози або концентрації дослідних наночастинок.

Але низкою авторів при оцінюванні цитотоксичності наночастинок диоксидів металів за умов *in vitro* доведено, що за дії NP_{Co} і NP_{Ni} – на культурі ендотеліальних клітин людини [459], карбонових нанотрубок – на макрофагах щурів і клітинах легень людини [447], суспензії фулеренів C₆₀ – щодо клітин лімфоцитів людини [571, 572] виявлено дозозалежне зниження життєздатності тест-клітин при реєстрації в тетразолієвому тесті та наявність ушкоджень ДНК з формуванням ковалентних адуктів.

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що методи «ДНК-комет» (лужного гель-електрофорезу) та «*Allium-test*», використані у роботі, доповнюючи один одного, є придатними при цитогенетичному доклінічному тестуванні NP_{Me} у вигляді колоїдних дисперсій та є альтернативними тестам у системі *in vivo*. Анафазний метод підрахунку хромосомних аберацій в клітинах апікальної меристеми *Alliumcepa* дозволяє реєструвати мутації типу делецій та транслокацій, наслідком яких є утворення мостів та фрагментів у ана- та телофазі [487 – 491]. Утворення мікроядер є свідченням потенційної цитогенетичної активності тестованих речовин. Мікроядра — це невеликі утворення ДНК, які складаються з ацентричних фрагментів хромосом чи хромосом, які відстали на стадії ана-телофази.

Відомо, що цитотоксичні ефекти наноматеріалів мають значні відмінності щодо різних клітинних ліній [573]. З іншого боку – за наявності структурних і функціональних ушкоджень клітини, очевидно, що зміни в неї на метаболічному рівні будуть суттєвими. Припускається, що пошкодження ДНК і некроз клітин за дії наноматеріалів різного походження [31, 83, 266, 289, 291, 309, 345, 416, 458, 465, 466, 469, 470] викликані порушенням цілісності плазматичної мембрани та її функцій [147, 274, 286, 328, 462 – 464, 467, 468, 574, 575].

Відомо, що АТР-аза є одним з ключових ферментів енергетичного метаболізму клітини, завдяки якому відбувається формування різниці електрхімічного потенціалу на її мембрані [220, 222, 353, 503]. Фермент локалізується у плазматичній мембрані таким чином, що його суб'єдиниці експоновані як до цитоплазми, так і до зовнішнього середовища, тому його активність може бути використана як індикатор будь-якого стресорного впливу.

Поряд з десятьма цитозольними ензимами, які містяться на перетині анаеробного та аеробного енергозабезпечення клітини, перетворюючи глюкозу до пірувату, ЛДГ-азі у тому числі властиво забезпечувати синтез АТР за відсутності Оксигену, за анаеробних умов [503, 576]. При цьому акцептором Гідрогену слугує піровиноградна кислота, яка перетворюється в лактат, що виконує функцію накопичувача, резервуара відновлених еквівалентів.

Тому, у подальшому було визначено цитотоксичність дослідних зразків NРМе за біохімічними маркерами – величиною мембранної Na^+ , K^+ -АТР-ази та цитозольної ЛДГ-ази на моделі субклітинних фракцій еукаріотичних тест-клітин.

Так, на моделі ізольованих субклітинних фракцій культури лінії СНО-К1 встановлено, що за впливу NРАg розміру ~ 30 нм, NРFe – ~ 100 нм, NРCu – ~ 70 нм та NРMnO₂ – ~ 50 нм у вихідних концентраціях вірогідних змін величин мембранної Na^+ , K^+ -АТР-азної та цитозольної ЛДГ-азної активності не реєстрували відносно контрольних значень ензимів.

Але, за умов впливу NРCo, NРCo[Fe(CN)₆] та NРZn, навпаки, зареєстровано зниження рівня мембранної Na^+ , K^+ -АТР-ази в середньому на 22,3, 26,1 і 10,8 % ($P < 0,05$), а за впливу NРCo[Fe(CN)₆] у вихідних концентраціях – збільшення величини цитозольної ЛДГ-азної активності на 10,8 % ($P < 0,05$) тест-клітин відносно контрольних значень ензимів.

При визначенні впливу дослідних NРАu на активність мембранної Na^+ , K^+ -АТР-ази клітин лінії U937 було встановлено розмірно-залежні зміни

її величини: частинки розміру ~ 10 нм призводили до інгібіції ензиматичної активності до 70 %, а розміру ~ 30 нм і ~ 45 нм – сприяли її індукції в межах 20–40 % ($p \leq 0,05$) відповідно відносно контрольного рівня показника.

За умов впливу NP_{Au} розміру ~ 10 , ~ 20 і ~ 30 нм реєстрували індукцію цитозольної ЛДГ-ази клітин лінії U937, підвищення значень якої дорівнювало у межах 1,5–4,5 разів, а розміру ~ 45 нм – її пригнічення в 5,0 разів ($P < 0,05$) відносно контрольного рівня ензиматичної активності.

Тобто, за динамікою ензиматичної активності у субклітинних фракціях різних еукаріотичних організмів доведено відсутність мембранотоксичного впливу NP_{Au} розміру ~ 20 і ~ 30 нм, NP_{Ag} – ~ 30 нм, NP_{Fe} – ~ 100 нм, NP_{Cu} – ~ 70 нм та NP_{MnO₂} – ~ 50 нм щодо тест-клітин ліній CHO-K1 і U937, що дозволяє вважати їх біосумісними.

Отже, результати тестування Na⁺, K⁺-АТФ-азної і ЛДГ-азної активності еукаріотичних організмів вказують на мембранотоксичні ефекти NP_{Co}, NP_{Co}[Fe(CN)₆] і NP_{Zn} розміру ~ 100 нм та NP_{Au} – ~ 10 і ~ 45 нм відповідно за можливої інтенсивної акумуляції та є ознакою структурних пошкоджень субклітинних фракцій.

Інший рівень організації прокаріотичних клітин у порівнянні з еукаріотичними знаходить свій вираз у органній спеціалізації їх метаболічних процесів, через яку вони можуть активно контактувати з металами та бути модельною системою для вивчення взаємовідносин між мікробною клітиною та наночастинок металів [220, 222, 282, 353, 407, 503].

При цьому, механічні сили взаємодії NP_{Me} з клітинами, очевидно, будуть змінювати не тільки цитологічні, але й їх фізіолого-біохімічні реакції у останніх, тому така взаємодія не завжди буде корисною. Відомо, що цитоплазматична мембрана клітин ушкоджується у першу чергу, так як вона слугує бар'єром між поза- та внутрішньоклітинним оточенням, що забезпечує селективний транспорт речовин [381]. Більшість авторів вважає, що головним механізмом цитотоксичних ефектів різних наноматеріалів полягає у викликаному ними пероксидному окисненні ліпідів, завдяки якому

формується оксидативний стрес [30, 56, 78, 305, 443, 458, 461 – 464, 467, 468, 600 – 604]. Виходячи з цього, висунута гіпотеза щодо участі метаболізм-залежних механізмів цитотоксичної дії NPMe може бути з'ясована через визначення інтенсивності окиснення основних структурних компонентів біомембран – ліпідів і білків, рівня показників антиокиснювальної системи та енергетичного метаболізму прокариотичних клітин.

При дослідженні впливу NPAu розміру ~20 нм, ~30 нм і ~45 нм і NPAg – ~30 нм на ізолювані СМФ однодобових культур клітин *E. coli* виробничих штамів 57, 25, 24, 20 і 4 та клітин штамів *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16, *S. Enteritidis* 34 і М виявлено певні дискретні значення розмірів дослідних зразків NPMe.

Так, нами було визначено, що NPAu і NPAg розміру ~30 нм за дії на мембранні фракції клітин *E. coli* дослідних штамів у цілому сприяли уповільненню та/або утриманню на фізіологічному рівні інтенсивності процесів окиснення ліпідів (штами 25, 24 і 20) та окисної деструкції білків (штами 57, 25, 24 і 20) через втручання реакцій ендогенної АОС, що супроводжується зниженням утворення токсичних метаболітів – дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду та карбоксильних похідних нейтрального і основного характеру, підвищенням рівня загальної АОА та змінами активності каталази ($p \leq 0,05$); дає змогу стверджувати про мембранотропні властивості таких NPMe та вказує на біосумісність щодо СМФ бактеріальних клітин дослідних штамів, які залежать від значень їх розмірів і концентрацій.

У випадку контактної взаємодії NPAu розміру ~20 і ~45 нм та NPAg – ~30 нм з СМФ клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NPAu розміру ~20 нм з клітинами штаму 20 – лише інтенсивності процесів ОМБ відповідно, що вказує на прооксидантну і мембранотоксичну дію NPAu і NPAg саме у цих розмірах.

Виняток складала також відсутність вірогідних змін рівня утворення карбоксильних похідних у СМФ клітин штаму 25 за взаємодії з NPAu

середнього розміру ~30 нм і ~45 нм, у цьому випадку інтенсивність процесів ОМБ за рівнем їх утворення наближалась до такої у інтактних СМФ клітин цього штаму.

Каталаза – один із найважливіших ензимів антиоксидантної системи, який вже при мінімальних кількостях перекису гідрогену проявляє свою активність і таким чином захищає клітину від розвитку окисного стресу [577 – 579].

Встановлено, що зміна активності каталази за умов впливу дослідних зразків NPM_e на СМФ клітин *E. coli* дослідних штамів носить різноспрямований характер. Так, у мембранних фракціях клітин штаму 25 рівень активності ензиму за преінкубації з NPAu у всьому розмірному діапазоні вірогідно знижувався, а у клітин штаму 20, навпаки, – підвищувався ($P < 0,05$) відносно його контрольних значень.

У СМФ штамів 57 і 24 за умов преінкубації з NPAu розміру ~30 нм і ~45 нм активність каталази також знижувалась ($P < 0,05$) відносно її контрольного рівня. Встановлено тенденцію щодо збільшення ензиматичної активності у СМФ клітин штаму 57 у випадку взаємодії з NPAu розміру ~20 нм, яке для клітин штаму 24 було вірогідним ($P < 0,05$) відповідно.

Рівень активності каталази за умов преінкубації NPAg розміру ~30 нм з СМФ клітин штаму 25 суттєво знижувався за значенням, а штамів 57, 24 і 20 – підвищувався ($P < 0,05$) відповідно відносно рівня ензиматичної активності у контрольних пробах.

Відомо, що каталаза стійка до зовнішніх впливів і першою вступає в реакцію знешкодження перекису. Її активність залежить від концентрації ТБК-активних продуктів [580], тому автори розглядають каталазу разом із супероксиддисмутазою та непротеїновими тіолами цитоплазми як єдине окисно-відновне середовище клітини.

Так, визначене нами збільшення вмісту продуктів ліпопероксидації ДК і МДА та карбоксильних похідних НХ і ОХ у мембранних фракціях клітин *E. coli* штаму 57, 24 і 20 за взаємодії NPAu розміру ~20 і ~45 нм та NPAg

розміру ~ 30 нм, яке супроводжувалось активацією каталази від 1,3 до 2,2 разу ($P < 0,05$), вказує на розвиток адаптаційних реакцій щодо підвищеної інтенсивності катаболічних, деструктивних і протеолітичних процесів [580] та пояснює ефект пристосування системи антиоксидантного захисту прокаріотичної клітини щодо пероксидного стресу.

Але, під час зниження рівня утворення токсичних продуктів ліпопероксидації та карбоксильних поїдних окисної деструкції білків у клітинних мембранах *E. coli* за взаємодії з NP_{Au} (штам 20) та NP_{Ag} (штами 24 і 20) розміру ~ 30 нм активність ензиму залишалась вищою від його контрольних значень, що ілюструє включення компенсаторних реакцій АОС клітини у процесі відновлення вихідного стану основних субстратів ендогенної пероксидації та метаболізму протеїнів як компонентів біомембран.

Співавторами [580] доведено, що активність каталази зменшується на тлі збільшення концентрації непротеїнових тіолів (головним чином представлених глутатіоном).

Так, рівень показника загальної АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* за взаємодії з NP_{Au} та NP_{Ag} у вивченому діапазоні розмірів збільшувався для штамів 25, 24 і 20, що варіювало у межах 1,3–3,0 та 1,7–3,0 разів ($P < 0,05$) відповідно відносно контрольних значень показника. Визначений ефект є також підтвердженням адаптаційного включення додаткового захисного механізму за дії інтенсивної взаємодії NP_{Me} з клітинними мембранами та потенційну високу пристосованість клітин *E. coli* до розвитку оксидативного стресу, викликаного активацією процесів ПОЛ (штами 25, 24 і 20) та/або процесів ОМБ (штами 57, 25, 24 і 20).

Доведено, що наночастинки різного хімічного походження можуть виступати як в ролі прооксидантів через мембранотоксичну дію [600 – 604], так і антиоксидантів [208, 284, 304, 605 – 610]. Дійсно, біологічна дія NP_{Me} пов'язана з регуляторним впливом на систему антиокиснювального захисту мембран бактеріальних клітин.

Визначене нами збільшення рівня показника загальної АОА на тлі зміни величини каталазної активності, як складової ферментативної ланки АОС, можна розглядати як індукцію структурних ендogenous антиоксидантів (аскорбат, SH-групи, GSH, церулоплазмін, цитохром, металотіонеїни тощо). При цьому витрачання потужності антиоксидантних ензимів може частково компенсуватися пулом неферментативної ланки АОС.

Отже, встановлений фізіологічний рівень або уповільнення інтенсивності процесів окиснення ліпідів та окисної деструкції білків у СМФ клітин *E. coli* певних штамів за взаємодії з NPAu та з NPAg розміру ~30 нм може вказувати на значну біосумісність та мембранотропність таких наночастинок через їх антиоксидантний вплив. Як опосередковано, так й напряду через процеси нормалізації вільнорадикального окиснення ліпідів активно блокується цитолітичний синдром, у цьому випадку NPAu і NPAg саме у цьому розмірі можуть виступати як антиоксиданти – «пастки» радикалів.

У випадку контактної взаємодії NPAu розміру ~20 і ~45 нм та NPAg – ~30 нм з СМФ клітин штаму 57 реєстрували посилення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ, а за взаємодії NPAu розміру ~20 нм із СМФ штаму 20 – процесів ОМБ відповідно. Отже, прооксидантний вплив NPAu меншого (~20 нм) і більшого (~45 нм) розміру ілюструє очевидну мембранотоксичну дію дослідних наночастинок металів у таких розмірах.

Одним з факторів, що спричинює інгібіцію клітинної активності та ушкодження цілісності мембран агресивними агентами докільля є їх дія на активність енергеперетворюючих систем мікробної клітини, насамперед – мембранної H^+ -АТР-ази та ендogenous дихання [220, 223, 503], які являються інтегральними параметрами рівня енергізації бактеріальної клітини.

Нами встановлено, що NPAu та NPAg у всьому розмірно-концентраційному діапазоні в цілому здатні впливати на величину питомої H^+ -АТР-азної активності мембранної фракції клітин *Escherichia spp.*

дослідних штамів. Так, дослідним зразкам NPАu розміру ~30 і ~45 нм і NPАg – ~30 нм у діапазоні концентрацій 0,07–1,16 і 0,16–2,59 мкг/мл за металом властиво посилювати Н⁺-АТР-азну активність у СМФ клітин *E. coli* штамів 57, 25, 24, 20 і 4 у межах 15,5–33,0 % (P<0,05) щодо контрольних значень ензиму.

За взаємодії NPАu і NPАg розміру ~30 нм у діапазоні концентрацій 0,24–0,97 і 0,54–2,16 мкг/мкг білка за металом із СМФ клітин штамів *S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* 34 і М також визначали збільшення величини Н⁺-АТР-азної активності у межах 14,2–76,9 % (P<0,05) відносно її значень у контрольних зразках. Поряд з цим, при вимірюванні ендogenous дихання клітин цих штамів встановлено, що за інкубації NPMe обох видів у вивченому діапазоні концентрацій з суспензією клітин *Salmonella* spp. відбувалось підвищення рівня питомої ДА лише у штамів *S. Dublin* і *S. Enteritidis* 34 (P<0,05) відносно контрольних значень показника.

За цих умов рівень показника у клітин штамів *S. Typhimurium* і *S. Enteritidis* М статистично не відрізнявся від його контрольних значень, тобто, отримані результати дозволяють припустити, що у формуванні величини різниці електрохімічного потенціалу на мембрані клітин таких штамів визначальна роль відводиться Н⁺-АТР-азній активності.

У цілому, отримані результати свідчать про спроможність колоїдних дисперсій NPАu і NPАg впливати на інтенсивність процесів окиснення основних структурних складових біомембран та рівень показників енергетичного метаболізму клітин *Escherichia* spp. та *Salmonella* spp. та за впливу у розмірі ~30 нм – вважати їх безпечними та біосумісними. З іншого боку – результати щодо активного впливу NPАu і NPАg на рівень біохімічних показників прокаріотичних клітин під час контактної взаємодії ілюструють метаболізм-залежну акумуляцію NPMe останніми, яка властива тільки активно метаболізуючим клітинам (наприклад, за визначальною роллю активності показників енергетичного метаболізму).

Цей факт можна пояснити тим, що міцела NPMe має сорбційну оболонку, що визначає їх значну біодоступність та адсорбційну активність до різного роду метаболітів як токсичних, так й корисних біологічно активних сполук. Наявність таких ефектів щодо інтенсивності метаболічних реакцій найбільш імовірно зумовлена унікальними фізико-хімічними властивостями NPMe, перш за все, їх здатністю проявляти каталітичну реактивність відносно біохімічних реакцій через добре розвинену активну поверхню [28, 59, 165, 166, 209, 220 – 222, 223, 303]. При цьому каталітична дія NPMe може бути реалізована через безпосередній вплив на саме фермент (взаємодія з функціональними зарядженими групами білкової молекули, що призводить до певних конформаційних змін).

Але, феномен тропності NPMe до біологічних молекул різної молекулярної маси, шляхи їх трансмембранного переносу всередину клітини, біотрансформації та біодеградації мають геометрично- та розмірно-залежний характер [31, 96, 147, 213, 219], що визначає варіабельність характеру їх біологічної дії – від токсичності до біосумісності.

Підсумовуючи вищесказане, слід зауважити, що потенційна небезпечність та біосумісність дослідних зразків колоїдних дисперсій NPMe носить залежний від їх дискретного розміру характер та є індивідуальною для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів, з іншого боку – конкретні механізми біосумісності або цитотоксичної дії NPMe виокремити складно, бо вони можуть сильно відрізнятись навіть у межах одного класу наноматеріалів, тому це питання поки ще має дискусійний характер.

Отримані результати за цим фрагментом досліджень по тестуванню цитотоксичної дії колоїдних дисперсій дослідних зразків NPMe у системі *in vitro* зумовлюють відповідний підхід щодо доцільності використання NPCo, NPCo[Fe(CN)₆], NPZn розміру ~100 нм та NPAu – ~10, ~20 і ~45 нм в експериментах *in vivo*.

Доведена в експериментах *in vitro* біосумісність NP_{Au} і NP_{Ag} розміру ~30 нм, NP_{Fe} – ~100 нм, NP_{Cu} – ~70 нм та NP_{MnO₂} – ~50 нм підлягає подальшому вивченню їх потенційного впливу керованим чином на метаболічні реакції клітин.

Це ускладнюється тим, що системна відповідь організму загалом може значно відрізнитись від результатів, отриманих в експериментах на ізольованих клітинах, тому дослідження повинні ґрунтуватися на більшій кількості досліджень, включаючи доклінічні випробування на тваринах із застосуванням комплексу системних маркерів (фізіологічних, біохімічних, імунологічних тощо), у тому числі, тривалих за часом (хронічних).

На сьогодні бракує досліджень щодо з'ясування токсико-біохімічного характеру дії колоїдних дисперсій наночастинок есенційних металів в експериментах *in vivo*. Погляди деяких вчених свідчать [28, 39, 41, 75, 446], що головною особливістю NP_{Me} є їх менша токсичність порівняно з традиційно використовуваними солями відповідних металів.

Отже, в подальшому, на підставі одержаних результатів за умов *in vitro* щодо безпечності NP_{Ag}, NP_{Fe}, NP_{Cu} і NP_{MnO₂} було складено суміш NP_{Me} та визначено її вплив на організм білих щурів у гострому та хронічному токсикологічних експериментах.

Клінічні спостереження за щурами протягом 14 діб показали, що загальний стан організму тварин за одноразового введення суміші солей металів у дозі 0,3 мг/кг (II група) та суміші NP_{Me} у дозах 0,3; 1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла (I; III; IV і V групи) був задовільний: тварини були рухливі, адекватно реагували на зовнішні подразники. Загибелі тварин за весь термін спостереження не фіксували.

При визначенні коефіцієнтів маси внутрішніх органів дослідних щурів встановлено, що «органами-мішенями» за впливу NP_{Me} виявились селезінка та легені, опосередковано – серце, печінка і нирки, а за впливу солей металів – серце і селезінка; «органами-концентраторами» для NP_{Me} за збільшенням вмісту Cu є нирки і печінка, Fe – селезінка і легені та Mn – печінка щурів

($P < 0,05$) порівняно з їх іонною формою, що пов'язано з необхідністю даних елементів у функціонуванні цих органів.

Біохімічними дослідженнями встановлено, що за одноразового введення білим щурам суміш NPMe у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла проявляла токсичну дію, яка виражалась на початкових строках досліджень (3-тя і 7-ма доба) – у гіперглікемії на тлі посилення сечовиноутворення (за підвищенням вмісту глюкози і сечовини на 26,8 і 28,3 %) та починаючи з 3-ї та до 14-ї доби включно – у гіперферментемії АсАТ і ГГТП (на 61,0 і 53,0 %) та гіпоферментемії АлАТ і ЛФ (на 29,9 і 21,7 %), альбумінемії (до 17,0 %) на тлі фізіологічного рівня загального білка, розвитку лейкоцитозу поряд із еритроцитопенією (за зростання кількості лейкоцитів на 34,3 % та зменшення еритроцитів на 38,2 %), індукції активності каталази та зниження рівня показника загальної АОА (на 115,9 та на 45,7 %); зниження вмісту ДК і МДА (на 17,9 і 31,5 %) на фоні надмірного утворення цитотоксичних маркерів – карбоксильних похідних модифікованих білків НХ і ОХ (на 16,8 і 22,3 %), ЦК середньої молекулярної маси та білків гострої фази (серомукоїдів) (на 50,8 і на 30,5 %) ($P < 0,05$) у крові тварин.

Визначено, що для NPMe у дозі 0,3 мг/кг переважає функціональна кумуляція (за нижчим вмістом Cu, Fe і Mn в печінці, ($P < 0,05$)), тоді як у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – матеріальна з пролонгованою дією до 14 діб (за збільшенням вмісту Cu, Fe і Mn у більшості органів, ($P < 0,05$)), але у формі солей – метали всмоктуються раніше за часом (на 3-тю добу), в більшій кількості та нетривалий час.

Тобто, результати гострого токсикологічного експерименту свідчать, що суміш NPMe у дозах 0,3 мг/кг маси тіла має високу біодоступність та є біосумісною. Але отримані дані не можуть остаточно ілюструвати потенційну токсичність NPMe, оскільки деякі клініко-біохімічні показники крові щурів не приходили до фізіологічного рівня наприкінці досліду. Отже, вони стали передумовою для проведення експерименту за визначенням

хронічного впливу суміші NPMe у біотичній та максимальній дозах (0,3 та 4,0 мг/кг маси тіла) на білих щурах.

Механізми впливу NPMe у хронічному експерименті під час 90-добового надходження порівняно з іонною формою відповідних металів за характером прояву були подібними таким за умов їх одноразового введення у гострому токсикологічному експерименті.

На розвиток імуносупресії в організмі щурів внаслідок хронічного впливу NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла вказують поступе зростання кількості лейкоцитів (до 27,5 %) поряд із зниженням кількості еритроцитів (до 21,9 %), починаючи з 15-ї по 60-ту добу включно та вмісту гемоглобіну (на 22,5 %; $P < 0,05$) – з 30-ї доби дослідів відповідно.

У сукупності із змінами морфометричного складу крові у тварин цієї групи реєстрували зниження вмісту загального білка на 60-ту та 90-ту добу (на 11,2 та на 15,7 %) поряд із рівнем кількості фракцій загальних глобулінів (в межах 18,6–29,9 %; $P < 0,05$) – з 30-ї доби дослідів відповідно. При цьому у плазмі крові цих тварин реєстрували збільшення рівня утворення ЦК середньої молекулярної маси та білків гострої фази серомукоїдів (на 36,1 та на 62,8 %; $P < 0,05$) – з 30-ї та 15-ї доби відповідно від такого в контрольних щурів.

У плазмі крові щурів, які одержували суміш NPMe та солей відповідних металів у дозі 0,3 мг/кг маси тіла (I і II групи) статистичних змін гематологічних показників і показників стану неспецифічної резистентності впродовж експерименту не встановлювали, за винятком збільшення вмісту загального білка поряд із кількістю загальних глобулінів (на 13,0 і на 30,2 %; $P < 0,05$) – за введення суміші NPMe (II група), яке залишалось таким й на 60-ту добу експерименту.

Вважають, що розвиток імуносупресії, особливо протягом хронічного впливу будь-якого фактору, свідчить про несприятливий прогноз.

Визначена еритроцитопенія поряд із зниженням рівня гемоглобіну лише в крові тварин, що одержували у вищій дозі суміш NPMe (4,0 мг/кг

маси тіла), пояснюється порушенням перенесення Оксигену від легень до тканин, які функціонують за умов підвищеного навантаження наночастинками, пов'язано з необхідністю їх забезпечення Оксигеном для відтворення процесів нейтралізації та виділення останніх та вказує на дозозалежну їх тропність до селезінці. При цьому селезінка, очевидно, не спроможна забезпечити баланс між достатньою кількістю еритроцитів та їх утилізацією. Це підтверджується динамікою рівня гемоглобіну в крові та вмісту Феруму в селезінці щурів за гострого і хронічного надходження NPMe у дозах 1,0 мг/кг і 4,0 мг/кг маси тіла.

Аналогічна динаміка гематологічних показників показана за впливу більшості токсикантів, а зниження рівня гемоглобіну є ознакою анемії, яка є наслідком руйнування еритроцитів або зниження їх утворення, гемоделюції тощо [581].

Динаміка кількості еритроцитів та наповнення їх гемом за умов введення суміші NPMe щурам у меншій дозі (0,3 мг/кг маси тіла) можна пояснити тим, що утилізований Ферум із NPMe метаболічним шляхом входить до гему еритроцитів, та узгоджується з даними, які описані в роботах [328, 329, 437]. Так, результати досліджень на щурах із ЗДА аліментарного походження засвідчили, що у разі застосування препарату на основі NPOFe, рівень гематокриту сягав нормального за 7 діб [328].

Оскільки печінка є основним органом синтезу сироваткових протеїнів, будь-яка токсична дія, порушуючи функціонування органу, не може не впливати на рівень цього показника. Отримані результати щодо зниження рівня загального білка та його фракцій за впливу NPMe у вищій дозі свідчать про депонування металів та їх вплив на печінку і нирки, викликаючи зрушення білкового обміну, а також посилення утворення ліпопротеїдів, які є необхідними для відновлення уражених клітинних мембран [582]. Зниження показника у плазмі крові дослідних щурів наприкінці експерименту дозволяє припустити про перевагу катаболічних процесів над анаболічними та

послаблення гуморальної ланки неспецифічного імунітету в організмі тварин за тривалої дії NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла.

У крові постійно циркулюють імунні комплекси, які є важливою складовою механізму підтримання імунного гомеостазу, а їх елімінація відбувається клітинами PEC [583]. Слід зазначити, що поступове надмірне утворення імунних комплексів – фізіологічних продуктів реакції «антиген» – «антитіло», яке було визначено за впливу NPMe у підвищених дозах і сягало максимуму на 90-ту добу їх надходження, свідчить про утворення максимальної кількості метаболітів, що зв'язуються антитілами з наступним утворенням ЦК, та відображає фази розвитку запального процесу і перебігу патології [498, 499].

Але, встановлене нами зниження утворення ЦК середньої молекулярної маси та посилення активності лізоциму на фоні відновлення рівня показників гемопоезу до фізіологічних значень за впливу суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла можна розглядати як значну індукцію клітинної і гуморальної ланок імунітету разом, очевидно, через активацію системи комплементу та В-лімфоцитів.

Хронічне надходження з кормом суміші металів у різних дисперсних формах викликало у крові дослідних щурів різноспрямовані зміни показників інтенсивності процесів ПОЛ у динаміці експерименту.

Відомо, що утворені в клітині АМК у великих концентраціях можуть модифікувати макромолекули та приводити до деструктивних змін їх важливих компонентів – білків і ліпідів мембран, а в низьких – їм властиво виконувати сигнальні функції. Тому, навіть відносно невеликі кількості АМК будуть впливати на експресію генів, репараційні, метаболічні та біосинтетичні процеси [395 – 401]. Так, внаслідок окиснення гемоглобіну, порушується структурна організація мембран еритроцитів, інтенсивність чого залежить від внутрішньоклітинного рівня відновленого глутатіону та здатності клітин генерувати його відновлення із окисненої форми.

Так, у щурів, які отримували суміш солей металів, визначали поступове зростання вмісту ДК і МДА (на 29,9 і 34,8 % та на 50,3 і 28,0 %) у плазмі крові на 60-ту та 90-ту добу дослідів відносно їх контрольних рівнів.

У плазмі тварин, що отримували суміш NPMе у дозі 0,3 мг/кг (II група), на 90-ту добу визначали зниження рівня лише ДК у середньому на 15,9 %, а у дозі 4,0 мг/кг маси тіла (III група), починаючи з 30-ї доби дослідів, вмісту ДК і МДА (на 30,0 і 30,4 %; $P < 0,05$) відповідно щодо їх контрольних значень.

На фоні відсутності надлишкового утворення продуктів ПОЛ у плазмі крові тварин III групи на 15-ту добу дослідів визначали підвищення вмісту карбоксильних похідних НХ і ОХ у середньому на 22,3 % і 41,6 % починаючи з 30-ї доби дослідів, вмісту ДК і МДА – на 30,0 % і 30,4 % ($P < 0,05$) відповідно відносно їх значень в плазмі контрольних тварин.

У плазмі крові щурів I і II груп вірогідних змін інтенсивності процесів ОМБ впродовж експерименту не спостерігали.

Стабільний рівень продуктів ліпопероксидації в крові щурів дослідних груп можна пояснити тим, що окиснювальні форми білків модифікуються за рахунок продуктів ПОЛ через протеолітичні системи та індукцію фактору транскрипції в Т-лімфоцитах [402, 403]. Надлишкове утворення продуктів ліпопероксидації та похідних ОМБ відображає зрушення збалансування ферментативної та неферментативної ланок АОС, тому саме їй відводиться визначальна регуляторна та прогностична роль в захисті мембран клітин [405, 406].

При дослідженні рівня показників АОС встановлено: за впливу суміші металів у обох дисперсних формах у дозі 0,3 мг/кг маси тіла реєстрували індукцію каталазної активності: більш виражено та на усіх термінах досліджень у щурів, які одержували солі металів (від 25,3 до 49,2 %), та за введення суміші NPMе на 60-ту добу – на 10,0 % ($P < 0,05$) відносно контрольних рівнів ензиму. У даному випадку, враховуючи зниження інтенсивності процесів ПОЛ, визначена активація каталази є адаптивною

реакцією пристосування клітин до підвищення в організмі дослідних тварин інтенсивності катаболічних процесів [577, 580].

За впливу суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла ензиматична активність, навпаки, з часом знижувалась, що в середньому складало через 15; 30 та 60 діб – 18,3; 25,9 та 22,9 % ($P < 0,05$) відповідно щодо контролю, що слугує ознакою розвитку деструктивних протеолітичних процесів в організмі тварин цієї групи та дозволяє припустити деструктивний вплив наночастинок у надмірній дозі. Поряд з цим, про поступове витрачання ресурсів не ферментативної ланки ендогенної АОС в організмі щурів за впливу суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла вказує зниження рівня показника загальної АОА плазми крові, починаючи з 30-ї та до 90-ї доби включно відносно його контрольних значень.

Очевидно, що у тварин цієї групи не вдається призупинити пошкодження у клітинних мембранах через компенсаторні реакції, тому відбувається розвиток окисного стресу через інтенсифікацію процесів окисної модифікації білків на фоні фізіологічного рівня процесів ПОЛ, що носить руйнівний характер [286].

У експериментах на тваринах також показано, що частинки з процесів горіння, силікати, діоксид титану, фулерени і вуглецеві нанотрубки спричинюють підвищений рівень продуктів ПОЛ і пошкодження ДНК, завдяки більшій електричній провідності порівняно з мембраною і проникненню у ліпідний бішар унаслідок пасивної дифузії [28, 200, 213, 220, 305, 463, 466 – 471].

Але у щурів, які одержували суміш металів у іонній формі в дозі 0,3 мг/кг маси тіла реєстрували тенденцію щодо зростання рівня загальної АОА у плазмі крові на 60-ту добу, а за впливу у нанодисперсній формі – вірогідне на 15-ту та 30-ту добу (на 9,0 та 18,1 %; $P < 0,05$) відповідно від значень показника у контрольній групі. Це вказує на потенційну можливість суміші колоїдних дисперсій NPMe справляти антиоксидантний вплив через індукцію ендогенної АОС за рівнем показника загальної АОА на тлі

відсутності вірогідних змін інтенсивності процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків у крові тварин щодо їх контрольних значень.

Відомо, що ураження або інгібіція активності природної АОС, функція якої полягає у запобіганні спонтанного окиснення, призводить через ушкодження біомембран до змін важливих метаболічних процесів – інактивації ензимів та розладу головних систем детоксикації [584 – 586].

Поряд із гальмуванням каталазної активності, на гепатотоксичний вплив NPMе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла (ІІІ група) вказує визначена поступова активація ензимів АлАТ і ЛФ у плазмі крові щурів упродовж усього досліджу, найбільшу вираженість якої реєстрували на 60-ту добу (на 96,8 і 69,1 %; $P < 0,05$) відповідно. На цей час у плазмі крові щурів визначали найвищі значення посилення активності АсАТ і ГГТП, що в середньому складає 14,8 і 22,3 % ($P < 0,05$) відносно контрольних рівнів ензимів та безпосередньо вказує на цитолітичне ураження клітинних мембран гепатоцитів.

У щурів, яким задавали суміш солей металів (І група), на 60-ту і 90-ту добу досліджу встановлювали також підвищення активності АлАТ, АсАТ, ГГТП та на 90-ту добу – активності ЛФ ($P < 0,05$) відносно значень активності цих ензимів у контрольних тварин.

У щурів, які одержували суміш NPMе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, на 60-ту і 90-ту добу досліджу визначали незначну активацію АсАТ і ГГТП (на 11,0 і 7,2 %) відповідно.

Вважають, що величина індукції активності гепатоспецифічних ферментів у крові є пропорційною ступеню руйнування гепатоцитів і активності патологічного процесу [584, 585].

Визначена гіперферментемія АсАТ у гострому та хронічному експериментах за впливу суміші NPMе у підвищених дозах (1,0; 2,0, і 4,0 мг/кг маси тіла) можна розглядати як наслідок ураження паренхіматозних клітин та додаткове токсичне навантаження на міокард. Аспарагінова трансаміназа локалізована окрім цитоплазми у мітохондріях, мембрана яких

дещо стабільніша ніж плазмолема, на відміну від аланінової, яка міститься лише у цитоплазмі [586]. Дійсно, мітохондрії є мішенню для руйнівного впливу токсичних продуктів переокиснення через дезорганізацію їх мембрани, підвищення її проникності за рахунок або формування пор, або ініціації розкриття тимчасових пор проникності [587, 588], що може бути запуском механізмом провокації апоптичних процесів у клітинах.

Динаміку рівня активності ЛФ у плазмі крові щурів за впливу добавок суміші металів у різних дисперсних формах можна пояснити величиною дозового навантаження та терміном впливу. За умов гострого експерименту пригнічення ензиматичної активності носить, очевидно, компенсаторний характер внаслідок розвитку протеолітичних процесів у організмі дослідних щурів, за хронічного – її посилення – адаптаційний. Лужну фосфатазу вважають одним із характерних ензиматичних маркерів печінкового холестазу, активність якого залежить від метаболізму кальціотропних гормонів [589, 590].

Один із ензимів, що бере участь у транспорті амінокислот до клітин – γ -глутамілтранспептидаза. Визначене у обох експериментах поступове підвищення активності ГГТП за впливу NPMe у підвищених дозах, за літературних даних [591, 592] відображає динаміку відновних процесів у клітинах і розцінюється як загальна ознака розвитку цитотоксичних процесів та патологічний стан.

Визначене зниження активності АлАТ за одноразового впливу суміші NPMe у підвищених дозах пояснюється, насамперед, розвитком протеолітичних процесів, які підтверджено даними щодо зниження альбумінової фракції протеїнів і збільшення рівня сечовини, а за хронічного впливу збільшення активності цього ензиму – вказує на збільшення концентрації недоокиснених продуктів, а саме пірувату, тому одним із шляхів його перетворення стає утворення або аланіну, або лактату. Отже, отримані дані свідчать не лише про пере направлення метаболічних процесів, а й про порушення енергетичних процесів у організмі щурів під час

біотрансформації металів. При цьому, АсАТ також бере участь у забезпеченні цитоплазми субстратами для глюконеогенезу при перетворенні пірувату до глюкози.

Встановлено, що уміст глюкози у плазмі крові щурів, що одержували вищу дозу NРМе, підвищувався з 15-ї до 60-ї доби дослідження включно, а за впливу суміші металів у обох розмірних формах – на 60-ту добу ($P < 0,05$) відповідно. Відомо, що у вищих хребетних стрес ініціює викид глюкостероїдів і катехоламінів, які викликають посилення процесів глюконеогенезу [593]. Визначена глікемія на цих строках дослідження свідчить на активізацію процесів детоксикації та відповідно на підвищення енергетичних затрат, які спрямовані на очевидну інтенсифікацію елімінації елементів з організму дослідних тварин.

На прикінці експерименту (90-та доба) рівень глюкози у плазмі крові дослідних щурів наближається до її контрольних значень, що вказує на адаптацію тварин щодо дії металів та пов'язано з їх інтенсивним виведенням з організму. Поряд з цим, надходження суміші NРМе у максимальній дозі та солей металів призводило до збільшення вмісту кінцевих продуктів білкового розкладу в плазмі крові щурів – сечовини (на 75,8 та на 21,2 %), починаючи з 15-ї, та креатиніну (на 14,8 та на 17,6 %; $P < 0,05$) – з 30-ї до 90-ї доби дослідження включно щодо контрольних значень показників. Це вказує на посилення протеолітичних процесів та інтенсивності клубочкової фільтрації у нирках дослідних щурів, а також ілюструє, залежність швидкості елімінації металів у різних дисперсних формах від часу надходження.

Так, при вивченні біодоступності металів із суміші NРМе та солей відповідних металів встановлено, що вищу біодоступність мають NРМе у порівнянні з їх іонною формою у дозі 0,3 мг/кг маси тіла.

На характер тропності NРМе вказує підвищення на 60-ту добу дослідження їх умісту в шлунку, тонкому кишечнику і плазмі крові (Cu, Fe і Mn) та зниження – у товстому кишечнику (Mn), печінці та нирках (Cu, Fe і Mn)

дослідних щурів ($P < 0,05$), та свідчить про роль цих органів у депонуванні металів.

На 90-ту добу досліду за збільшенням вмісту металів ($P < 0,05$) у органах і плазмі крові дослідних щурів визначено, що у складі суміші солей і суміші наночастинок у біотичній дозі вони елімінуються через товстий кишечник та нирки.

Доведено, що метали, які вивільнюються в організмі тварин із суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла, накопичуються у м'язах і селезінці (Cu, Fe), у шкірі з шерстю (Cu, Fe і Mn) і печінці (Mn), що свідчить про вищу активність наночастинок і значну роль цих органів у їх депонуванні та підтверджується визначеною динамікою гематологічних і показників функціонального стану печінки у крові дослідних щурів.

Визначено, що для металів у формі солей «органіями-мішенями» є серце та селезінка. Так, вже на 90-ту добу експерименту були визначені вірогідні зміни коефіцієнтів маси серця, селезінки та нирок у щурів, які отримували розчин солей відповідних металів.

Аналізуючи результати щодо динаміки вмісту Cu, Fe і Mn у плазмі крові можна підкреслити дозозалежне їх надходження із ШКТ, що пояснює всмоктування NPMe у всіх його відділах. У щурів за надходження суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла вміст усіх металів був вищим ($P < 0,05$) у порівнянні з тваринами, які отримували їх іонну форму, що вказує на кращу біодоступність наночастинок. Зниження вмісту Mn у плазмі крові дослідних щурів на прикінці досліду можна пов'язати з підвищенням вмісту його антагоністу – Fe ($P < 0,05$) відповідно.

Аналізуючи результати визначення вмісту металів у печінці можна зауважити наступне. Для NPMe при введенні у дозі 0,3 мг/кг переважає функціональна кумуляція, про що свідчить у цілому зниження вмісту Cu, Fe і Mn, а у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – матеріальна, про що свідчить у цілому підвищення вмісту цих металів у печінці щурів ($P < 0,05$) протягом досліду порівняно з контролем та їх іонною формою.

Аналізуючи результати визначення динаміки вмісту металів у селезінці можна зауважити, що накопичення Cu ($P < 0,05$) за введення суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла на 90-ту добу дослідів, негативно впливає на імунну систему (селезінка виконує функцію утворення еритроцитів та продукування і секреції антитіл) та узгоджується з визначеною динамікою гематологічних і біохімічних показників у крові дослідних щурів, що відбувається, очевидно, за рахунок зниження вмісту його антагоністу – Цинку. За введення солей металів відбувається підвищення Fe в селезінці ($p \leq 0,05$) порівняно з NPMe, можливо, за рахунок руйнування більшої кількості еритроцитів або зменшення терміну їх життя.

Аналіз результатів динаміки умісту металів у серці можна зауважити, що при введенні суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла реєстрували накопичення Fe ($P < 0,05$), який є більш доступним, ніж відповідна іонна форма, та навпаки, зниження вмісту Mn ($P < 0,05$), що можна пояснити антагонізмом цих елементів.

Аналіз результатів динаміки вмісту металів у легенях вказує про елімінацію ними Cu та Mn за підвищеним вмістом ($P < 0,05$) при введенні суміші NPMe, а також на дозозалежне накопичення Cu, Fe і Mn ($P < 0,05$) та, можливо, біотрансформацію NPMe.

При дослідженні умісту металів у нирках дослідних щурів встановлено, що за умов введення солей металів підвищується екскреція елементів за підвищенням вмісту Fe і Mn ($P < 0,05$), причому Cu – у першій половині дослідів; за введення суміші NPMe в обох дозах, навпаки, знижується;

Тобто, на підставі отриманих результатів слід зробити висновок, що вищу біодоступність мають NPMe, ніж метали у іонній формі, що узгоджується з думкою низки дослідників [28, 39, 41, 75, 76, 78, 448], що NPMe у вигляді колоїдних дисперсій – є однією з найбільш біодоступних форм металів, головною особливістю яких є їх менша токсичність у порівнянні із традиційно використовуваними солями відповідних металів.

Отже, за результатами клініко-біохімічних досліджень максимальну вираженість токсичної дії суміші солей металів у дозі 0,3 мг/кг та суміші NPMе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла в організмі щурів встановлювали на 30-ту добу досліду. Під час гострого та хронічного введення суміші NPMе у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла зміни активності більшості ензимів і рівень певних метаболітів (маркерів гепато-, кардіо- і нефротоксичності), а також порівняльний вміст Cu, Fe і Mn у плазмі крові і органах дослідних щурів характеризують прояв токсичної дії металів у нанодисперсній (починаючи з 3-ї та 30-ї доби експериментів) та іонній формах (на більш пізніх строках, починаючи з 7-ї та 60-ї доби відповідно). Визначені зміни напрямків метаболічних процесів та динаміка розподілення та накопичення металів у організмі дослідних щурів є залежними від часу їх надходження та узгоджуються з характером змін коефіцієнтів маси органів тварин.

Механізм токсичної дії суміші NPMе та солей металів (за хронічного введення) у організмі щурів характеризується розвитком імуносупресії та запальних реакцій, зміною напрямків метаболічних реакцій, превалювання катаболічних процесів над анаболічними, підвищенням інтенсивності деструктивних процесів через розвиток окисного стресу та зрушенням цілісності мембран гепатоцитів з ознаками цитолізу та адаптаційною мобілізацією ресурсів біоенергетичного і пуринового обміну, що вказує на очевидну інтенсифікацію елімінації металів та ілюструє вибірккову дозову тропність металів у нанодисперсній формі.

У роботі [594] доведено, що за тривалої 56-добової дії мікронізованих фулеренів C₆₀ за концентрації 0,5–2,0 г/кг маси тіла не реєстрували змін морфологічних показників печінки мишей, незважаючи на активацію клітин HSC на ранніх строках інтраперитонеального введення. У подальшому кількість активованих HSC зменшувалась без трансформації у міофібробластоподібні клітини, що, можливо, зумовлено здатністю молекул C₆₀ знешкоджувати ВР.

Але, упродовж 3 тижнів після інтраперитонеального введення щурам водної суспензії фулеренів C_{60} за концентрації 0,5–2,0 г/кг маси тіла не виявляли гострої або над гострої токсичності за гістопатологічними даними паренхімальної структури печінки без ознак запалення або фіброзу [595]. При цьому концентрація акумульованого фулерену C_{60} у гепатоцитах з часом зменшувалась, що вказує на їх здатність виводитися з печінки щурів. Інтраперитонеальне введення щурам водної суспензії фулеренів C_{60} за концентрації 2,0 мг/кг маси тіла впродовж 3, 7 та 14 діб перед отруєнням CCl_4 навпаки, викликали гепатопротекторну дію. Припускається, що цей ефект фулеренів C_{60} обумовлений запобіганням розвитку оксидативного стресу внаслідок елімінації ними ВР.

Тобто, потенційна токсичність наноматеріалів залежить не лише від величини розміру, концентрації або дози, тривалості введення (контакту), а й його хімічного стану та чистоти (модифікації).

Нами встановлено, що в щурів, які отримували суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, значення досліджених маркерів залишалися в межах їх контрольного рівня з невеликою амплітудою відхилень або відновлювались. За результатами регуляції показників неспецифічної резистентності та ендогенної АОС в організмі щурів можна стверджувати про біосумісність та адаптогенну дію суміші NPMe у цієї дозі з оптимальним терміном задавання не більше 30 діб, вважати її біотичною порівняно з солями металів. Загальна опірність макроорганізму, його метаболізм та імунний статус, загалом багато в чому визначається наявністю певних металів, тому запропонована суміш NPMe за своєю біосумісністю та адаптогенним впливом є прототипом субстанцій лікарських засобів і компонентів кормових добавок.

Адаптогенний вплив суміші NPMe у формі колоїдної дисперсії можна пояснити їх біосумісністю завдяки та значною біодоступністю в організмі дослідних щурів, що узгоджується з відомими фармакологічними ефектами саме NPCu, NPAg і NPFe.

Біосумісність NPCu , наприклад, пояснюють [78, 242, 282, 422 – 424] здатністю металу регулювати в організмі рівень холестерину і сечової кислоти крові, підтримувати баланс мікрофлори кишківника через гальмування росту дріжджових мікроорганізмів; стимулювати імунітет, впливаючи на первинні та вторинні імунні реакції; виявляти гіпоглікемічний ефект, підсилюючи дію інсуліну; зменшувати швидкість розпаду глікогену в печінці тощо.

Відома властивість NPCu каталізувати реакції з участю VP , наприклад, саме реакції галогенвуглеводнів, обрані як модельні процеси для вивчення каталітичних властивостей стабільних NPMe у міцелярних середовищах [202].

Встановлено, що солі металічного Купруму, його наночастинок, як і NPAg , мають антибактеріальні та протигрибкові властивості [42, 78, 104, 111, 255 – 259, 275 – 277, 282], а також сприяють регенерації тканин, беруть участь у ряді синтетичних процесів, зокрема у синтезі мієліну, колагену, еластину та поліпшують засвоєння деяких вітамінів, тощо [18, 28, 242, 283, 422 – 424].

Досліджень *in vivo* стосовно впливу NPAg обмаль, але відомі його значні біоцидні властивості. Оскільки клітини ссавців мають мембрану абсолютно іншого типу, ніж прокаріоти та інші організми без клітинної стінки, та яка не містить пептидаміногліканів, тому метал на них не справляє токсичної дії [40, 202, 255 – 259].

Існують дані щодо імуномодулюючих властивостей високодисперсних металевих NPAg . Так, доведено посилення макрофагальної активності, стимуляцію стовбурових клітин і гуморальних імунних реакцій на фоні зникнення молодих форм нейтрофілів, збільшення кількості лімфоцитів і моноцитів, еритроцитів і загального гемоглобіну, уповільнення швидкості осідання еритроцитів, що свідчить про специфічний захист організму [109, 194, 273, 274]. Зареєстровано стимулюючу дію NPAg на кровотворні органи з посиленням окиснювальних процесів у головному мозку в 2 рази, що

покращує його функції, та утворенням імуноглобулінів класів А, М і G і абсолютної кількості Т-лімфоцитів.

Відомо, що NPAg бере участь у синтезі ряду ферментів, гормонів і вітамінів [28, 194], залежно від концентрації катіони металу можуть як стимулювати, так і пригнічувати активність деяких ферментів.

Також підвищену каталітичну реактивність, яка залежить від кількості атомів металу в кластері, мають NPFe [52, 314]. Фізичні, біологічні, відповідно й фармакологічні властивості NPFe і NPOFe залежать від їх розміру: частинки більшого розміру краще захоплюються макрофагами [334 – 336, 436, 437], проте менші, як правило, довше циркулюють у кровоносному руслі, добре проникають через капілярну стінку [339, 340]. Властивості NPOFe свідчать про потенційні можливості їх застосування при детоксикації біологічних рідин, у антимікробній терапії, тканинній регенерації, тощо [282, 347].

Ферум є необхідним субстратом для синтезу гемоглобіну, задіяний в синтезі ДНК, входить до складу низки ензимів і білків, бере участь у багатьох окисно-відновних реакціях, а також у процесах детоксикації отруйних речовин у печінці [596].

Є спроби учених використати у складі нанонутрицевтиків NPZn та NPMn [278].

Вважають, молекулярні механізми посилення реактивності клітин крові за впливу NPMe проявляється у вивільненні внутрішньоклітинного Ca^{2+} , активації Src-кіназ, фосфорилуванні внутрішньоклітинних білків [147]. Припускається, що висока гемосумісність графену зумовлена поєднанням його гідрофільних властивостей з екрануванням негативного заряду гідроксильних і карбоксильних груп, за цитотоксичної дії – збільшується гідрофільна взаємодія, наслідком якої є активна акумуляція наночастинок на клітинній мембрані та порушення її цілісності.

Тому, отримані результати щодо визначення біосумісності та біодоступності дослідного зразка суміші NPMe порівняно з їх іонною

формою можуть бути базою для алгоритму проведення доклінічного випробування NPMe із застосуванням системних біохімічних маркерів у токсикологічних експериментах у системі *in vivo*.

Результати визначення цитологічних і біохімічних параметрів біосумісності NPMe, одержані у експериментах *in vitro* та *in vivo*, стали підґрунтям щодо з'ясування їх протективної дії через регуляторний вплив на структурно-функціональний стан прокаріотичних клітин за різних умов культивування.

З'ясування механізмів взаємодії NPMe з клітинними мембранами дозволить розширити фундаментальні знання не лише стосовно їх цитотоксичної дії, а й біосумісності в клітинах, а також прикладні аспекти, пов'язані з їх використанням у сучасних біотехнологіях.

Зберігання життєздатності та стабілізації біологічних властивостей мікроорганізмів – важливіші задачі прикладної біотехнології. Їх рішення в основному пов'язано зі з'ясуванням природи зворотної затримки життєдіяльності клітин за умов глибокого сублімаційного заморожування та висушування – ліофілізації [379, 380, 533 – 535]. Однак проблема створення ефективної технології сублімаційного консервування бактеріальних культур ще далека від свого розв'язання. Велике значення має розвиток адаптаційних біохімічних і фізіологічних реакцій бактерій за умов впливу стрес фактору, а також залежність взаємодії клітинних біополімерів з компонентами захисних середовищ від типу культивування.

Основним напрямком у технології одержання активованих форм мікроорганізмів є оптимізація та модифікування умов їх культивування шляхом уведення речовин, які вибірково стимулюють ріст та інші показники біологічної активності клітин як на стадії промислового виробництва імунобіологічних засобів, так й при підтриманні та довготривалому зберіганні бактеріальних клітин у життєздатному стані.

Оскільки активність усіх процесів у живій клітині залежить від стану її мембрани, то стресорні фактори, що впливають на останню, будуть

змінювати стаціонарність її метаболізму. Існуюча структурно-метаболічна теорія розглядає стресорні ефекти, як можливу подію, що виникає в результаті змін не тільки структур макромолекул, а й метаболізму стресованої клітини [353, 354, 356 – 359, 383 – 388, 402 – 404]. Тому, мікроорганізми є адекватною модельною системою для вивчення взаємовідносин біологічного об'єкту та стресорами середовища, яка доступна та добре відпрацьована у біотехнологічних експериментах і промислового виробництва.

Ураження білків і ліпідів як структурних елементів біомембран приводить до порушення регуляції хімізму та проникності живої клітини, а в подальшому – до її загибелі. Так, зміна вмісту ненасичених жирних кислот у мембрані впливає на ступінь текучості її бішарів, у подальшому порушуючи балансуювання мембраноз'язаних біосинтетичних процесів, що включає інгібіцію ензиматичної активності, активацію пероксидації по вільнорадикальному ланцюгу та втрату енергетичних ресурсів з подальшим гальмуванням репродуктивної активності клітин під час підтримання життєздатності їх популяцій за умов впливу стресорних чинників, наприклад, температурної та іншої дії [380, 397 – 400, 463, 466 – 468, 533 – 535].

Виходячи з цього, висунута гіпотеза щодо переваги метаболізм-залежної акумуляції NPMе клітиною над пасивною може бути підтверджена через визначення не лише їх потенційної токсичності (безпечності), а й біосумісності за рівнем відпрацьованих нами цитологічних і біохімічних маркерів (п. 3.1.2) на моделі прокаріотичних клітин промислово значущих штамів.

Тому, спочатку ми намагались оцінити рівень фізіолого-біохімічних показників функціональної активності бактеріальних клітин різних таксономічних видів, які зберігаються у ліофілізованому стані понад 10 років. Як експериментальні моделі використовували періодичні культури клітин прокаріотичних організмів: *E. coli* штамів 19, 20, 24 і 25; *P. multocida* – штамів 2, 5, 16, 550 і «Смол»; штамів *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16,

S. Enteritidis 34, *M. orale* ATCC 23714, *M. arginini* G 230, *M. gallisepticum* ATCC 19610 і *Ach. laidlawii* ATCC 23206 до та після їх ліофілізації/регідратації.

Дослідженнями встановлено, що кінетичні криві приросту біомаси до (контроль) та після ліофілізації/регідратації клітин родів *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Pasteurella* spp. та *Mycoplasma* spp. дослідних штамів впродовж 24 та 80 год культивування за характером кривизни є подібними та класичними для швидкозростаючих мікроорганізмів та мікоплазм відповідно [351 – 354, 381].

Але, за довготривалого зберігання культур мікроорганізмів у ліофілізованому стані визначено гальмування інтенсивності приросту біомаси клітин майже усіх дослідних штамів. У процесі відновлення життєздатності регідратованих клітин *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. та *Mycoplasma* spp. у стандартних до кожного виду мікроорганізмів середовищах, реєстрували значно нижчий рівень утворення біомаси за показником КУО/мл (у 1,9; 1,7 і 1,8 рази; $P < 0,05$), тривалість лаг-фази (адаптації) за часом була довшою, лог-фази (експоненціального росту) – меншою, а початок стаціонарної фази їх розвитку відстрочився за часом ($p \leq 0,05$) у порівнянні з таким у контрольних зразках (нативні клітини). Максимум накопичення біомаси нативних клітин досліджених штамів у цілому наступав раніше за часом, ніж біомаси регідратованих клітин відповідно.

Відомо [374], що клітини *E. coli* у експоненційній фазі росту є більш стійкими до високих концентрацій оксидативних агентів, ніж такі в лаг-фазі, тобто зменшення тривалості лог-фази росту може пояснювати індукцію стресу.

Отже, за рівнем утворення колоній регідратовані клітини штаму *Ach. laidlawii* ATCC 23206 та *P. multocida* усіх дослідних штамів як до, так й після регідратації, були однаковими, тобто їх можна вважати більш резистентними (стабільними) щодо температурного впливу, але розвиток

популяцій цих клітин відрізнявся за тривалістю фаз від таких у нативних клітин.

За аналізом результатів досліджень показника питомої ДА встановлено, що більш чутливими до процесів ліофілізації за витрачанням рівня ендогенного дихання виявились регідратовані клітини *P. multocida* штамів 5 і «Смол», *E. coli* – штамів 20 і 25, штамів *S. Enteritidis* 34 і *S. Typhimurium* 16 відповідно.

Рівень абсолютної мембранної H^+ -АТР-азної активності регідратованих клітин *E. coli* штамів 19, 20, 24 і 25 знижувався (у 1,3 – 5,3 разу; $P < 0,05$) відносно її контрольних значень, що вказує на гальмування швидкості гідролізу АТР у клітин цих штамів.

Але процеси ліофілізації/регідратації, навпаки, сприяли посиленню ензиматичної активності у клітинних мембранах *P. multocida* штамів 5, 16 і 550 (у межах 66,0–143,9 %), усіх штамів *Salmonella* spp. та *Mycoplasma* spp. (у межах 194,1–284,0 % та 3,1–13,2 разу; $P < 0,05$) відповідно щодо її контрольних значень.

На фоні цього рівень ендогенної ДА регідратованих клітин штамів *M. arginini*, *M. gallisepticum* і *A. laidlawii* також підвищувався відносно контрольного (у 2,1–3,2 разу; $P < 0,05$). Слід відзначити, що додаткова енергізація середовища інкубації не викликала вірогідних змін інтенсивності процесів дихання для клітин цих штамів, що вказує про витрачання їх фізіологічного потенціалу внаслідок впливу ліофілізації/регідратації.

За підсумком результатів можна припустити, що формування трансмембранного потенціалу на мембранах регідратованих клітин *P. multocida* штамів 5, 16 і 550, клітин усіх штамів *Salmonella* spp. та *Mycoplasma* spp. у процесі відтворення їх життєздатності забезпечується потужністю ферментної системи АТР-ази, кінетика якої є основним молекулярним механізмом генерації його величини, та яка знаходиться у більш активному функціональному стані, ніж у нативних клітин цих штамів до ліофілізації.

Але слід відзначити, що під час ліофілізації/регідратації енергозабезпечення клітин *P. multocida* штаму 2 та *E. coli* штамів 19 і 24, навпаки, відбувається лише за рахунок їх дихальної активності.

Про участь обох ланок енергетичного метаболізму клітин штамів *M. arginini* G 230, *M. gallisepticum* ATCC 19610 і *A. laidlawii* ATCC 23206 вказує посилення питомої ДА у сукупності з високими значеннями величини мембранної H^+ -АТР-азної активності, що, очевидно, забезпечує стабільність їх функціональної активності [213, 219 – 223] за умов їх ліофілізації/регідратації.

Отже, клітини *E. coli* штамів 19 і 24, *P. multocida* – 16 і 550 та усіх штамів *Salmonella* spp. лише частково проявляли кріорезистентність щодо ліофілізації/регідратації, але за рахунок витрачання власних фізіологічних ресурсів, що не може не відобразитися на стані структурно-функціональних показників функціонального стану під час їх відновлення.

Дослідниками визначена наявність ламаності кривих Арреніуса для АТР-азної активності мембран *Ach. laidlawii* *M. mycooides* var. *capri* за температури, яка відповідає фазовим переходам у ліпідній фазі даних мембран [597, 598]. У літературі описані ефекти змінення ліпідного складу мембран мікоплазм контролюючим чином [597], що автори пов'язують із загальною або частковою нездатністю даних організмів щодо синтезу жирних кислот із довгим ланцюгом і холестерину. У зв'язку з цим, можна припустити, що ліпіди мембран клітин досліджуваних нами штамів мікоплазм будуть у певному ступені більш резистентними до стресорних чинників, у тому числі до ліофілізації.

Отже, отримані результати спонукають до наукового пошуку речовин, здатних справляти протекторну дію через їх вплив на функціональний стан клітин мікроорганізмів при культивуванні через метаболічні перебудови, що дозволить підвищити їх кріорезистентність у послідовних стадіях технологій отримання імунобіологічних засобів.

На сьогодні вже існують наукові підходи щодо можливого контролювання та/або управління інтенсивністю фізіолого-біохімічних реакцій мікроорганізмів металами [186, 204 – 207]. Існуюча гіпотеза щодо механізмів взаємодії металів у різних хімічних формах із клітинами мікроорганізмів [210 – 213, 218 – 220] відкриває можливості використання NPMe при їх культивуванні. Особливий інтерес становить вивчення тих NPMe, фізіолого-біохімічна роль яких до цього часу остаточно не з'ясована або суперечлива, наприклад, наночастинок Ауруму і Аргентуму [208 – 214, 256].

Перший механізм, який визначає природу взаємодії NPMe з біологічним об'єктом, полягає у пасивній локалізації металів бактеріальною клітиною та ґрунтується на фізико-хімічному їх зв'язуванні структурними компонентами клітинної мембрани [147, 213, 256, 310].

Так, за даними трансмісійної електронної мікроскопії нами визначено високу електронну щільність зображень взаємодії клітин штамів *E. coli*, *S. Typhimurium* 16, *S. Enteritidis* 34 і *B. anthracis* з колоїдними дисперсіями NPAu і NPAg розміру ~20 і ~30 нм, які свідчать про здатність бактеріальних клітин активно концентрувати NPMe як на поверхні, так і всередині, вже через 10 – 30 хв спочатку контакту.

Показано [310], що з використанням конфокальної мікроскопії виявлено значну акумуляцію чистого графену на клітинних мембранах. Відсутність механічного пошкодження плазматичної мембрани за акумуляції наночастинок, як можливого чинника некрозу, оцінювали за низкими показниками ЛДГ-ази навіть за високої концентрації графену 300 мкг/мл.

Отже, природа цього явища може бути зумовленана не лише пасивною фізико-хімічною кумуляцією, а й реакціями метаболізм-залежних механізмів, відповідальних за взаємодію з NPMe. Можна припустити, що дослідні зразки NPAu і NPAg взаємодіють з частково зануреними у клітинну мембрану білками шляхом утворення водневих зв'язків, а потім, під час подальшого транс клітинного ендцитозу – з внутрішньоклітинними структурами, що

співпадає з думкою щодо характеру взаємодії деяких протекторів з біополімерами клітин [213, 310, 537].

Одержані нами результати мікроскопічних досліджень контактної взаємодії прокаріотичних клітин з дослідними зразками за взаємодію з NPMe. Можна припустити, що дослідні зразки NPAu і NPAg можуть бути свідченням існування такого роду структур, відповідальних за селективне зв'язування колоїдних наночастинок через водневі, дисульфідні і ковалентні зв'язки, та впливає на розташування гідрофільних і гідрофобних ділянок, їх кількісне розподілення та доступність для NPMe. За думкою [147, 599] це визначає у подальшому ступінь цитотоксичних ефектів наноматеріалів, пов'язаних із гідрофобними взаємодіями, наслідком яких є зрушення клітинної мембрани завдяки генерації АМК, блокування Ca^{2+} каналів та зниження транспорту поживних речовин у клітині.

Тому нами було у подальшому розглянуто інший механізм контакту NPMe з мікроорганізмами, якій стосується метаболізм-залежної акумуляції металів, яка притаманна лише біологічним об'єктам і пов'язана з функціонуванням реакцій обміну речовин бактеріальних клітин.

Так, при визначенні впливу NPMe на інтенсивність накопичення біомаси бактеріальних клітин дослідних штамів після ліофілізації/регідратації було встановлено, що введення NPAu до середовища культивування у кінцевій концентрації 1,16 мкг/мл за металом викликало виражене збільшення показника КУО/мл для клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 та *E. coli* штамів 4; 20 і 57 у середньому на 22,2 і 8,0 % та на 42,0; 21,7 і 22,8 %; $P < 0,05$); а за введення NPAg у кінцевій концентрації 2,59 мкг/мл за металом – на 11,6 і 61,5 % та на 36,4 і 8,1 % ($P < 0,05$) порівняно з його контрольним рівнем.

За відновленням інтенсивності приросту біомаси регідратованих клітин штаму *S. Dublin* 12 виявились перспективними NPAu і NPAg у діапазоні концентрацій 1,01 мкг/мл і 0,29 мкг/мл (на 41,7 і 34,3 %), *S. Typhimurium* 16 – 0,12–1,93 і 0,54–4,32 мкг/мл (на 25,4 і 15,2 %), *S. Enteritidis* 34 – 0,12–1,93 і

0,14–1,08 мкг/мл (на 19,7 і 16,5 %) та *S. Enteritidis* М – у концентрації 0,24 мкг/мл і 0,27–2,16 мкг/мл за металом (на 13,5 і 14,7 %; $P < 0,05$) відповідно.

Але слід відзначити, що NPMe за більш низьких або надвисоких концентрацій проявляли бактеріостатичні ефекти щодо приросту біомаси клітин *Salmonella* spp., а саме: за впливу NPAu у концентрації, нижчій за 0,12 мкг/мл та починаючи з 1,93 мкг/мл за металом, NPAg – нижчій за 0,14 мкг/мл та починаючи з 4,32 мкг/мл за металом відповідно.

За умов культивування біомаси *P. multocida* штаму 5 та *E. coli* 25 з NPAg також реєстрували зниження кількості утворення регідратованих клітин на 24,7 та 9,0 % ($P < 0,05$) відповідно у порівнянні з контрольним рівнем показника.

При визначенні впливу NPAu на інтенсивність накопичення біомаси клітин вакцинного штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 встановлено, що максимум збільшення рівня КУО/мл реєстрували у середовищі культивування з умістом NPMe $1,90 \cdot 10^{-3}$ г/л і $2,38 \cdot 10^{-3}$ г/л (1:8 і 1:10) за металом, що складало 2 і 6 Іg відповідно відносно значень показника за культивування у стандартизованому середовищі.

При культивуванні мікробної маси в середовищі з умістом NPAu у діапазоні співвідношення 1:2–1:6, 1:12 і 1:20, а також у стандартизованому середовищі (контроль), фіксували затримку росту біомаси клітин *B. anthracis* дослідного штаму.

Таким чином, отримані результати дозволяють стверджувати про наявну активну акумуляцію NPAu клітинами *B. anthracis*, однак, за рівнем накопичення біомаси клітин та мікроскопічною візуалізацією (рис. 3.27, 3.28) не можливо остаточно встановити механізм цієї контактної взаємодії.

При цьому разом із співавторами визначено [539, 540], що відбувається слабка акумуляція клітинами *B. anthracis* NPAu у низьких концентраціях 1,1–5,5 мкг/мл: кількість зв'язаного металу в середньому не перевищує 50 %, а виражена – в діапазоні концентрацій 8,3–22,0 мкг/мл, що становить в

середньому 90 % (з максимумом акумуляції 98 % – за концентрації 11,0 мкг/мл за металом) відповідно.

Отже, відпрацьовані регламенти культивування клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp. та *B. anthracis* промислово значимих штамів із додаванням до поживного середовища NPAu та NPAg розміру ~30 нм дозволяють стверджувати про властивість таких NPMe справляти як стимулюючий, так й бактеріостатичний вплив на інтенсивність накопичення біомаси мікроорганізмів, що може знайти широке впровадження як при підтриманні функціональної активності клітин, так й при виготовленні імунобіологічних та дезінфікуючих засобів.

Відомо, що ефективність ліофілізації/регідратації значною мірою залежить не тільки від умов проведення процесу. Важливу роль при цьому відіграє вихідний стан структурних компонентів біомембран, а також функціональний статус клітини в цілому [534, 535]. Вважають, що саме надмірне утворення токсичних продуктів ліпопероксидації та деградованих білків є первинним маркером їх окиснення [382, 396 – 401, 611, 612].

Так, за підсумком результатів досліджень впливу процесів ліофілізації/регідратації на інтенсивність процесів окиснення ліпідів і модифікації білків у мембранах клітин *E. coli* було визначено штамову відмінність. По-перше, кріоконсервування клітин з подальшою регідратацією впливало гальмуючим чином на інтенсивність ПОЛ у мембранах клітин штамів 57, 25 і 20 та індукуючим – штаму 24 відповідно.

Але, характер змін інтенсивності процесів ОМБ у мембранах регідратованих клітин *E. coli* був іншим між штамми: збільшення рівня утворення карбоксильних похідних НХ і ОХ реєстрували для клітин штамів 25, 24 і 20, а зниження – штаму 57 відповідно.

Окиснювальну деградацію протеїнів еукаріотичних і прокаріотичних клітин пов'язують з їх денатурацією, гідрофобністю і посиленням протеолітичної чутливості, які підвищуються на початкових стадіях процесів ОМБ і фактично розглядаються як «сигнал» для внутрішньоклітинного

протеолізу окиснювальних протеїнів [611, 612]. Доведено, що при багатьох патологічних станах саме процеси ОМБ, а не ліпідів і нуклеїнових кислот, є одним з ранніх та надійних маркерів окиснювального стресу [405].

Встановлено, що внаслідок ліофілізації/регідратації відбувалась виражене зниження каталазної активності у мембранах регідратованих клітин *E. coli* усіх обраних штамів (у межах 1,5–3,2 разу; $P < 0,05$) відповідно, що свідчить про денатурацію ензиму [580] токсичними продуктами переокиснення ліпідів та карбоксильними похідними деструкції протеїнів, що утворилися внаслідок температурного стресу. При цьому, підвищення інтенсивності процесів ПОЛ у мембранах регідратованих клітин *E. coli* штаму 24 та процесів ОМБ – штамів 24 і 20 супроводжувалось збільшенням рівня показника загальної АОА ($P < 0,05$) відповідно відносно його контрольних значень. Одержані нами результати узгоджуються з даними [406] щодо надмірного утворення карбонільних похідних на фоні різкого падіння активності каталази та зростання рівня активності супероксиддисмутази.

Для регідратованих клітин *E. coli* визначене гальмування інтенсивності процесів ПОЛ (штамів 57 і 25) і процесів ОМБ (штам 57), навпаки, супроводжувалось зниженням рівня показника загальної АОА та величини каталазної активності ($P < 0,05$), що підтверджує компенсаторну роль ферментативної та неферментативної ланок АОС [373 – 376, 608 – 617] внаслідок дії уражуючого чинника.

Доведено, що летальні рівні АМК як стресорів середовища, можуть індукувати у *S. Typhimurium* синтез продуктів деяких генів, а саме бактерії витримують низкі концентрації H_2O_2 (60 мкМ), та при цьому індукується синтез білків, які дозволяють виживати за умов високих концентрацій H_2O_2 (15 мМ) [372].

Доведено, що адаптивна резистентність до оксидативного стресору у клітин *S. typhimurium* і *E. coli* складається з двох регулонів – один для H_2O_2 , інший – для O_2^- , кожен з яких, індукований відповідно до сублетальних доз

оксидативного агенту, забезпечує синтез від 30 до 40 білків, частка з яких – загальна для обох регулонів. Функції індукованого білка OxyR – це транскрипційний активатор генів ферментів: каталази, глутатіон-редуктази і NADPH-залежної алкіл-гідропероксидази. Клітини *S.typhimurium* і *E.coli* мають 2 ізомери каталази: KatE і KatG, які перетворюють H_2O_2 до O_2 і H_2O [373]. Вважають, що глутатіон-редуктаза захищає проти оксидативного стресору еукаріотичні організми, грамнегативні та грампозитивні бактерії шляхом підтримання пулу відновленого глутатіону, який, в свою чергу, утримує в редукованому стані клітинні білки [373].

Фаза експоненційного росту *E.coli* за аеробних умов пов'язана з ризиком виникнення ендogenous оксидативного стресу в зв'язку з можливим 10-кратним зростанням швидкості утворення H_2O_2 . Визначено регуляцію внутрішньоклітинної концентрації H_2O_2 в *E.coli* [374].

Інші автори стверджують [375], що клітини *E.coli* штаму K-12 у експоненційній фазі росту були більш стійкими до високих концентрацій оксидативних агентів, ніж такі в лаг-фазі, тобто їх дія залежить від фази росту, при якій було індуковано стрес та встановлено індукцію стресорних білків. Для виживання в макрофагах у патогенних мікобактерій спрацьовують механізми захисту від стресорної дії токсичного O_2 через змінювання активності детоксикаційних ферментів, таких як каталаза, гідропероксидаза і алкіл-гідропероксидаза [376].

Аналіз характеру впливу NP Au та NP Ag на рівень утворення продуктів ПОЛ у мембранах клітин *E. coli* дозволив виявити певні дискретні значення їх розмірів. Встановлено, що за преінкубації NP Au і NP Ag розміру ~30 нм з клітинами *E. coli* штамів 57, 25, 24 і 20 після ліофілізації/регідратації встановлювали нормалізацію рівня інтенсивності процесів ПОЛ за рівнем утворення його продуктів.

За умов преінкубації NP Au розміру ~45 нм і NP Ag ~30 нм з клітинами *E. coli* штаму 57 після ліофілізації/регідратації реєстрували посилення інтенсивності ліпопероксидації за підвищенням рівня у мембранних

фракціях. Тобто, регідратовані клітини штаму 57 виявились резистентними щодо впливу NPAu і NPAg у цих розмірах, а штамів 20 і 24 – щодо впливу NPAu розміру ~30 нм відповідно.

Необхідно підкреслити, що застосування обох видів NPMe у всьому вивченому розмірному діапазоні приводило до вірогідного зниження рівня карбоксильних похідних НХ і ОХ у клітинних мембранах *E. coli* усіх обраних штамів (у межах 1,5–19,0 і 0,5–30,0 разу; $P < 0,05$) відповідно щодо контрольних значень показників.

Слід зауважити, що регуляторна дія NPMe щодо інтенсивності процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків у мембранах регідратованих клітин *E. coli* за попередньої інкубації з NPAu (штами 57 і 25) та NPAg (штами 57, 25 і 24) розміру ~30 нм характеризувалися в цілому за підвищенням рівня показника загальної АОА (у середньому на 91,9 %) та гальмуванням каталазної активності (у межах 1,5–4,5 разу; $P < 0,05$), що, очевидно, й призводило до уповільнення накопичення токсичних продуктів ПОЛ і карбоксильних похідних ОМБ, та може обумовлювати потужність резистентності бактеріальних клітин цих штамів під час ліофілізації/регідратації.

У даному випадку, колоїдні дисперсії NPAu і NPAg розміру ~30 нм проявляють найбільшу біосумісність та регуляторну дію щодо інтенсивності мембранно-зв'язаних процесів переокиснення та деструкції біополімерів, але слід підкреслити, що даний ефект носить залежний від дискретного розміру NPMe характер та є індивідуальним для різних штамів у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів.

Так, прооксидантні ефекти NPAu і NPAg розміру ~45 нм і ~30 нм та штамів 24 і 20 – з NPAu розміру ~30 нм за умов взаємодії з клітинами *E. coli* штаму 57 не дозволяють зробити однозначний висновок щодо безпечності NPMe у таких розмірах та вказують на мембраннотоксичний вплив щодо клітин саме цього штаму.

Дійсно, біологічна дія NPMe пов'язана з регуляторним впливом на систему антиокиснювального захисту мембран бактеріальних клітин. Але, визначене нами збільшення рівня загальної АОА на тлі змін каталазної активності, яка належить до ферментативної ланки АОС, можна розглядати як індукцію структурних ендогенних антиоксидантів (аскорбат, SH-групи, GSH, церулоплазмін, цитохром, металотіонеїни тощо). При цьому витрачання потужності антиоксидантних ензимів може частково компенсуватися пулом неферментативної ланки АОС. Відомо, що через високий вміст сульфгідрильних нуклеофільних груп металотіонеїни здатні реагувати з електорофільними субстанціями, такими як іони металів і вільні радикали [605, 608, 609].

Можна припустити, що в результаті зв'язування з функціональними групами металотіонеїнів іонів металів, які в процесі біотрансформації вивільнилися із міцели колоїдної наночастинки, гіпотетично токсичність цих металів зменшується, тоді як незв'язані – можуть вступати в інші взаємодії та акумулюватися клітинами та їх структурами, які визначають їх біосумісність (у даному випадку – антиоксидантні властивості) або токсичність (прооксидантні властивості).

Визначений фізіологічний рівень або уповільнення інтенсивності процесів ПОЛ і ОМБ у мембранах регідратованих клітин за попередньої взаємодії з NP Au та NP Ag розміру ~30 нм може вказувати на значну біосумісність таких наночастинок саме у цьому розмірі через їх антиоксидантний вплив. Як опосередковано, так й напряду через процеси нормалізації вільнорадикального окиснення блокується цитолітичний синдром.

У роботах [195, 210, 218, 237, 598, 616] доведено здатність деяких інтактних мікроорганізмів селективно концентрувати NP Au розміру ~20 і ~30 нм на поверхні клітин, яка дозволяє здійснювати ресуспендування останніх у розчин, при цьому зі збільшенням часу контакту наночастинок і клітини фізична адгезія на поверхні клітин переходить у хімічну взаємодію

за участі функціональних груп на поверхні клітинної мембрани, зокрема карбоксильних COOH^- та тіолових SH^- [210, 211].

Поряд із можливим зв'язуванням іонів металів з функціональними групами металотіонеїнів, які в процесі біотрансформації вивільнилися із міцели колоїдної наночастинки, інші автори [222, 223] зазначають, що при дослідженні взаємодії NP Au з металофільними клітинами *Bacillus spp.* в їх оболонках був виділений глікопротеїд з $M. m. 50 \text{ кДа}$, який характеризувався здатністю активно зв'язувати NP Me завдяки наявності в своїй структурі позитивно заряджених аміногруп NH_2^+ .

Такі структурні компоненти можуть виступати як своєрідні клітинні рецептори, що сприяють процесу специфічної взаємодії клітини з наночастинками цього металу.

Феномен тропності NP Me до біологічних молекул різної молекулярної маси, шляхи їх трансмембранного переносу всередину клітини, біотрансформації та біодеградації мають геометрично- та розмірно залежний характер [96, 219, 297, 337, 439, 601], що визначає варіабельність характеру їх біологічної дії – від токсичності до біосумісності. Цей феномен значною мірою залежить від розміру та форми наночастинок, що пов'язано з площею поверхні та квантумними ефектами. Так, зменшення розміру наночастинок призводить до того, що, порівняно із внутрішнім вмістом, значно більша частина атомів-складових наночастинок знаходиться на поверхні.

Низькою авторів доведено, що зі зміною розміру колоїдних NP Me з невеликим кроком, особливо які мають сферичну геометрію, площа їх питомої поверхні збільшується в геометричній прогресії (на порядки разів) через зростання співвідношення площі поверхні до маси частинки, що пояснює обернено пропорційну залежність прояву токсичності наночастинки від її розміру – чим менше за розміром частинка, тим більше агресивна (біодоступна) [213].

Але більшим за розміром наночастинкам властиво утворювати токсичні (агресивні) конгломерати як між собою, так і з гідрофільним

ліпідним бішаром та аміногрупами білкових молекул мембрани і плазмалеми, в результаті чого на їх поверхні збільшується кількість гідрофобних залишків, утворюються міжмолекулярні ковалентні зшивки, які вбудовуються у внутрішній гідрофобний прошарок, підвищуючи його специфічну провідність і ємність та додатково штучно ініціюючи каскад ланцюгових реакцій за вільнорадикальним типом [610, 616, 617]. Механізми цитотоксичної дії наночастинок у подальшому полягають у їх внутрішньоклітинному трансцитозі, який активує внутрішньоклітинний оксидативний стрес і експресію гена, інгібіцію ферментів дихального ланцюга, роз'єднання процесів пероксидації і окиснювального фосфорилування, що призводить до загибелі клітини [171, 172, 200, 201, 256, 566].

Так, дійсно, доведений прооксидантний вплив NPAu розміру ~20 і ~45 нм та NPAg розміру ~30 нм щодо бактеріальних клітин штамів 57 і 20 відповідно. Очевидно, потенціалу власних антиоксидантних ресурсів у клітинних мембранах таких штамів виявилось недостатнім, тому є беззаперечним фактом індивідуального характеру впливу NPMe на функціональний стан клітин в межах одного таксономічного виду. У даному випадку прооксидантна дія NPAu меншого (~20 нм) і більшого (~45 нм) розміру ілюструє очевидну мембранотоксичну дію наночастинок металу.

Описано, що NPAu розміру 1,4 і 5,0 нм викликали значно сильніший оксидний стрес ніж частинки металу більшого розміру [602, 617].

У двостулкового морського моллюска *Scrobicularia plana* за інкубації з NPAu розміром ~5, ~15 і ~40 нм спостерігалась акумуляція Ауруму в тканинах, яка поєднувалась з активацією антиоксидантних ензимів – каталази (~15 і ~40 нм), супероксиддисмутази (~40 нм) та глутатіон-S-трансферази (~5, ~15 і ~40 нм). При визначенні біосумісності комплексу NPAu з хітозаном встановлено антиоксидантний ефект у дезактивації ВР, та активації переносу електронів у окисно-відновних реакціях [304].

Встановлено, що NPAu розміру ~ 15 нм інактивують нітроксильні ВР шляхом окиснення до карбоксильних похідних [307].

При цьому, за дії NPAg розміру ~ 30 нм на клітини *E. coli* штаму 57 реєстрували активацію процесів ліпопероксидації на фоні відсутності ознак окисного ураження протеїнів, що дозволяє припустити сигнальний характер окисного стресу. За дії NPAu розміру ~ 20 нм на клітини штаму 20, навпаки, відбувалась активація процесів ОМБ на тлі фізіологічного рівня процесів ПОЛ, що є ознакою руйнівного характеру стресу. Так, деградовані протеїни можуть знаходитися в клітинах годинами і навіть днями, а продукти ПОЛ піддаються детоксикації вже через декілька хвилин [401]. Одержані дані дозволяють розглядати окиснювання білків як відносно стабільні показники окиснювального стресу, що має величезне значення для дослідницької практики. Слід зазначити також, що важливим аспектом з'ясування впливу наночастинок металів на функціонування АОС є встановлення залежності її реакції від вихідного редокс-статусу саме клітини.

Мембранно-зв'язані ензими, в першу чергу, енергоперетворюючі, до яких відносять АТР-азний комплекс поряд із рівнем ендогенної дихальної активності – однієї з основних фізіологічних реакцій мікроорганізмів [213, 219 – 223, 505], також доцільно використовувати як маркери контролювання стабільності функціональної активності бактеріальної клітини.

Результати впливу ліофілізації/регідратації на активність мембранної H^+ -АТР-ази клітин *E. coli* штамів 4, 19, 20, 24, 25 і 57 свідчать також про різноманітність ефектів між клітинами різних штамів: у мембранах штаму 4 визначали зниження рівня питомої H^+ -АТР-азної активності; штамів 20, 25 і 57 – його підвищення ($P < 0,05$), а штамів 19 і 24 – відсутність статистичних змін величини ензиму порівняно з контрольним показником.

Встановлено, що за впливу дослідних зразків NPMe обох видів рівень H^+ -АТР-азної активності регідратованих клітин *E. coli* обраних штамів у цілому підвищувався відносно контрольних значень: найбільш виражений стимулюючий ефект щодо підвищення рівня гідролізу АТР у клітинних

мембранах було зареєстровано за дії NPAu розміру ~ 30 нм (у межах 1,4–4,7 разу) і ~ 45 нм (у межах 0,5–6,0 рази) та NPAg розміру ~ 30 нм (у межах 0,65–6,20 разу; $P < 0,05$) відповідно.

Поряд з цим, за умов культивування клітин *E. coli* з NPAu і NPAg також відбувалось збільшення іншого показника енергетичного метаболізму – рівня питомої ДА: у клітин штамів 4, 20, 25 і 57 її значення вірогідно зростали у межах 24,6–82,4 % відповідно відносно такого у контрольних зразках.

Найбільш виражений вплив на величину H^+ -АТР-азної активності (до 30 %; $P < 0,05$) у мембранах клітин *B. anthracis* спостерігали за впливу NPAu у діапазоні концентрацій 5,69–11,16 мкг/мл за металом. У всьому концентраційному діапазоні NPAu також реєстрували підвищення рівня питомої ДА (до 74 %; $P < 0,05$) у порівнянні з контрольним рівнем показника.

Отже, інтенсифікація приросту біомаси регідратованих клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 за впливу NPAu та NPAg забезпечується активацією мембранної H^+ -АТР-ази, а клітин штамів *S. Enteritidis* 34, *S. Typhimurium* 16 та *S. Dublin* 12, навпаки, її пригніченням на тлі посилення ендогенного дихання клітин. Це може бути прогностичною ознакою наявних структурно-функціональних ушкоджень клітинних мембран мікроорганізмів під час ліофілізації/регідратації.

За дії NPAu і NPAg розміру ~ 30 нм на клітини *E. coli* під час ліофілізації/регідратації визначено підвищення приросту їх біомаси, зниження у клітинних мембранах вмісту продуктів ПОЛ і карбоксильних похідних окиснювальної модифікації білків на фоні збільшення рівня загальної АОА, гальмування каталазної активності, підвищення питомої H^+ -АТР-азної та дихальної активності. У даному випадку NPMe можна вважати біосумісними щодо мембран прокаріотичних клітин (за винятком штаму 57) через їх антиоксидантний вплив.

За культивування клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 у поживному середовищі з вмістом NPAu встановлено стимуляцію приросту біомаси

клітин з високим енергетичним потенціалом, на що вказує підвищення ключових показників обміну – величини питомої H^+ -АТР-азної та дихальної активності, та свідчить про індукцію гідролізу АТР у клітинних мембранах.

Результати щодо активації показників енергетичного обміну та відновлення метаболічних показників у клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp. та клітин *B. anthracis* виробничих штамів можуть бути прогностичною ознакою набагато менш виражених структурно-функціональних їх ушкоджень під час ліофілізації/регідратації, а також при отриманні біомаси як сировини для виготовлення імунобіологічних засобів.

За відсутності змін у інтенсивності накопичення біомаси регідратованих клітин *P. multocida* штамів 5, 15 і 396 та *E. coli* штаму 57 за впливу NРМе на фоні зниження величини мембранної H^+ -АТР-ази та збільшення питомої ДА, можна стверджувати про наявну енергетичну залежність репараційних процесів від рівня мембранно-зв'язаних процесів переокиснення структурних компонентів мембран клітин під час ліофілізації. Відомо [380, 381, 384 – 387, 389, 392, 575], що низькі температури здатні ушкоджувати мембранні АТР-ази клітин, при цьому може спостерігатись значне зростання рівня гідролізу АТР. У цьому випадку, посилення ендогенного дихання в таких клітин у процесі регідратації може бути свідченням активного відновлення їх фізіологічного стану в зв'язку із наявністю мінімальних пошкоджень під час ліофілізації, а витрачання пулу мембранної H^+ -АТР-ази є підтвердженням протективної дії NРМе.

Встановлену протективну здатність колоїдних дисперсій NРМе щодо зберігання або відновлення метаболічних показників функціональної активності бактеріальних клітин можна пояснити властивостями наночастинок обраних металів: каталітичною активністю NРAg, коли метал може працювати і як реагент (переважно у вигляді іонів і комплексів), і як каталізатор (у вигляді наночастинок) [28, 165, 166, 193, 194]; активною абсорбцією металу клітинною оболонкою, через яку відбувається або виражена стимуляція усіх показників життєдіяльності клітин мікроорганізму,

або є наявним значне пригнічення функціональної активності із вираженим бактерицидним ефектом [82, 198 – 201], та має залежний розмірно-концентраційний характер.

У роботах [187, 204, 206, 209, 407], що NPАu розміру 30 нм підвищують рівень активності Н⁺-АТР-ази мембранних фракцій штамів-пробіонтів *E. coli* та *E. faecalis* та у концентрації 1,10 мкг/мл за металом стабілізують їх клітинну оболонку. Характер впливу NPMe на стимуляцію репродуктивної активності клітин або їх виражена бактериостатична дія залежать від їх виду, концентрації, часу дії на культуру бактеріальних клітин [82, 171, 202, 203, 243, 249 – 252, 255 – 259]. Згідно даних [204, 209], підтверджується залежність інтенсивності приросту *E. coli* штаму 1257 від концентрації NPАu розміру 15–20 нм: у концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл за металом спостерігається стимуляція приросту біомаси клітин у середньому на 15 % щодо контролю.

Ефективність бактерицидної дії NPАg у менших розмірах (до 25 нм) пояснюється їх здатністю пригнічувати ензиматичну активність, функціонуванням якої забезпечується кисневий обмін у мікроорганізмів [248, 251, 257, 273]. У випадку, коли клітина залишається життєздатною, але при цьому порушуються її функції, наприклад, ділення, визначають як бактериостатичні ефекти. Але внаслідок проникнення сорбованих поверхнею клітини NPАg всередину інгібуються ферменти дихального ланцюга, роз'єднуються процеси окиснення і окиснювального фосфорилування, вона гине [171, 200, 249, 273]. Для NPАu також описана здатність інгібувати різні ферменти, зокрема лізосомальні ензими. Так, відомо, що Аурум накопичується у лізосомах, а його солі модулюють деякі макрофагальні функції імунної системи [287].

Завдяки здатності посилювати активність ензимів [204, 205, 207, 213, 221 – 223, 303] та виявляти антиокиснювальні властивості [208, 304, 598, 605 – 607] NPMe є потенційно новим класом речовин, які можуть слугувати високоефективними кріопротекторами і стимуляторами фізіолого-

біохімічних показників клітин мікроорганізмів за впливу стресорних чинників, у тому числі біотехнологічного походження. Регуляторний вплив NPMe щодо ензиматичної активності у клітинних мембранах може бути надзвичайно корисним при використанні останніх у біологічних системах для внутрішньоклітинної доставки їх вмісту. Це, у свою чергу, збільшує ефективність препаратів, що піддаються біодеструкції в біологічних рідинах.

Так, наші результати узгоджуються з тим, що NPAg у низьких концентраціях стимулюють відновлювальні процеси у клітинах мікроорганізмів через нормалізацію енергетичного обміну [161, 166, 171, 194, 248 – 253, 256 – 259].

Отримані результати можуть слугувати науковим підґрунтям подальшого пошуку в напрямку обрання колоїдних дисперсій NPAu в якості ад'юванту при конструюванні вакцинних засобів. Літературні дані підтверджують, що NPMe здатні справляти ад'ювантні властивості, а їх введення до складу вакцин забезпечує презентацію антигену безпосередньо до «клітин-мішенів», мінімізуючи можливі ризики, та наробку антитіл навіть на не імуногенні молекули [128 – 132]. Зокрема, окремі NPAu або у вигляді кон'югатів з органічними молекулами мають величезний потенціал застосування в наноімунології і нанобіотехнології [128, 299 – 303].

Отже, переважним механізмом взаємодії NPMe з прокаріотичними клітинами є метаболізм-залежна їх акумуляція, де визначальну роль відіграє вихідний стан структурних компонентів мембран – ліпідів і білків, та залежність від ресурсів енергетичного обміну клітин.

На підставі результатів визначення потенційної цитотоксичності та біосумісності дослідних NPMe можна підкреслити, що використані нами системні біомаркери – генотоксичність, мутагенність, фізіологічні (інтенсивність утворення біомаси, ендогенне дихання клітин) та біохімічні (активність мембранозв'язаних ферментів, інтенсивність окиснення ліпідів і окисної деструкції білків, антиоксидантні показники) на моделі клітин

евкаріотичних і прокаріотичних організмів є адекватними та високопрогностичними.

Характер змін цитологічних і фізіолого-біохімічних показників клітин залежить від дискретного розміру наночастинок металів, їх дози (концентрації), тривалості впливу (на тваринах) та є індивідуальним на рівні окремої клітини, цілісного організму та навіть штаму в межах одного таксономічного виду мікроорганізмів, тому може значно відрізнятись у межах одного класу наноматеріалів.

З'ясування біохімічної і токсикологічної характеристики дії колоїдних дисперсій дослідних наночастинок металів дозволило теоретично обґрунтувати безпечні регламенти їх використання при культивуванні та як кріопротекторів при зберіганні клітин прокаріотичних організмів у ліофілізованому стані.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі експериментально-теоретично розв'язано наукове завдання, що полягало у вивченні біохімічної і токсикологічної дії наночастинок металів на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів. Для вирішення цієї мети визначено цитологічні та біохімічні маркери токсичної дії і біосумісності NPMe (Au, Ag, Cu, MnO₂, Fe, Co[Fe(CN)₆], Co, Zn) на еукаріотичні клітини, біохімічні маркери мембранотоксичної дії NPAu і NPAg – на прокаріотичні клітини та біосумісність суміші NPMe (Ag, Cu, Fe, MnO₂) – на організм білих щурів. З'ясовано провідну роль інтенсивності мембранозв'язаних оксидативних процесів, показників АОС та енергетичного метаболізму прокаріотичних клітин у розвитку цитотоксичних або протективних ефектів за впливу NPAu і NPAg, які є розмірною залежними та індивідуальними для штамів мікроорганізмів у межах одного таксономічного виду. За результатами проведених досліджень зроблено такі висновки:

1. На моделі клітин еукаріотичних організмів ліній CHO-K1 і U937 визначено, що NPAu розміру ~30 нм, NPAg ~30 нм, NPFe ~100 нм, NPCu ~70 нм та NPMnO₂ ~50 нм у концентрації 0,22–1061,00 мкг/мл за металом є безпечними (біосумісними). Ці NPMe не чинять генотоксичної дії на тест-клітини лінії CHO-K1, мутагенної – на апікальну меристему *Allium cepa* і мембранотоксичної – на клітини ліній CHO-K1 і U937 (підвищення питомої мембранної Na⁺, K⁺-АТФ-азної на 20–40 % й цитозольної ЛДГ-азної активності у 1,5–4,5 разу; P<0,05) відповідно.

2. Дослідні зразки NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] і NPZn розміру ~100 нм у концентрації 0,12–830,00 мкг/мл за металом призводять до генотоксичної (утворення моменту «хвоста» ДНК-комет із збільшенням рівня I_{днк}), промутагенної (зниження рівня I_{мпт} і збільшення кількості утворених аберантних клітин у 2,4–4,6 і 3,9–10,0 разів) і мембранотоксичної дії (зниження мембранної Na⁺, K⁺-АТФ-азної активності на 19,7 %; P<0,05).

3. За характером змін ензиматичної активності тест-клітин лінії U937 доведено розмірну залежність мембранотоксичної дії NPAu: за розміру ~10 нм виявляли інгібіцію мембранної Na^+ , K^+ -АТР-азної активності до 70 %, а ~30 і ~45 нм – її індукцію на 20–40 % ($P < 0,05$). NPAu розміру ~10, ~20 і ~30 нм індукували цитозольну ЛДГ-азну активність у 1,5–4,5 разу, а ~45 нм – її пригнічення в 5,0 разів ($P < 0,05$) щодо контрольного рівня. Отже, частинки NPAu розміру ~30 нм є біосумісними для клітин еукаріотичних організмів.

4. За впливу NPMe розміру ~30 нм на мембранні фракції клітин *Esherichia* spp. і *Salmonella* spp. підвищується рівень показника загальної АОА у середньому в 2,0 і 2,2 разу, знижується активність каталази до 50,0 % (за дії NPAu) і підвищується до 57,0 % (за дії NPAg), зростає питома H^+ -АТР-азна та дихальна активність у межах 15,5–33,0 % та 10,7–32,6 % ($P < 0,05$) відповідно. Це сприяє регуляторному впливу щодо рівня утворення мембранотоксичних продуктів ПОЛ і карбоксильних похідних ОМБ.

5. Токсична дія суміші NPMe (Ag, Cu, Fe, MnO_2) за хронічного надходження у дозі 4,0 мг/кг маси тіла в організмі білих щурів призводить до: цитолітичних ушкоджень мембран гепатоцитів (зростання активності АсАТ, ГГТП, АлАТ і ЛФ у середньому на 14,8; 22,3; 96,8 і 69,1 %), імуносупресії і запальних реакцій (підвищення кількості лейкоцитів на тлі зниження еритроцитів і гемоглобіну, гіпопротеїнемія (на 13,5 %), надмірне утворення ЦК і гострофазних білків серомукоїдів (на 36,1 і 62,8 %) через оксидативний стрес (зниження каталазної активності і рівня загальної АОА (на 22,6 і 38,0 %), уповільнення утворення продуктів ліпопероксидації поряд із нагромадженням карбоксильних похідних модифікованих білків; $P < 0,05$) відповідно.

6. Виявлене збільшення вмісту глюкози, сечовини і креатиніну (на 36,1; 75,8 і 14,8 %) у плазмі крові узгоджується з динамікою вмісту Cu, Fe і Mn ($P < 0,05$) в органах щурів за впливу металів у обох дисперсних формах і свідчить про інтенсифікацію їх елімінації залежно від часу надходження та енергетичного забезпечення тварин.

7. Доведено вищу біодоступність NPMe порівняно з солями металів, на що вказує підвищення вмісту Cu, Fe і Mn на 60-ту добу дослідів у шлунку, тонкому кишечнику і плазмі крові та зниження Mn – у товстому кишечнику, Cu, Fe і Mn – у печінці та нирках щурів ($P < 0,05$) та свідчить про роль цих органів у депонуванні металів.

8. За збільшенням умісту Cu, Fe і Mn ($P < 0,05$) у органах і плазмі крові дослідних щурів на 90-ту добу хронічного дослідів показано, що у складі суміші солей і наночастинок у дозі 0,3 мг/кг маси тіла метали видаляються через товстий кишечник і нирки, а у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – депонуються у м'язах і селезінці (Cu, Fe), у шкірі з шерстю (Cu, Fe і Mn) та печінці (Mn). Це свідчить про перевагу функціональної кумуляції NPMe у дозі 0,3 мг/кг, тоді як у дозі 4,0 мг/кг маси тіла – зафіксовано фізичну, у формі солей – метали всмоктуються раніше за часом та в більшій кількості.

9. За результатами регуляції показників неспецифічної резистентності та ендогенної АОС в організмі щурів виявлено адаптогенну дію суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла порівняно з дією солей відповідних металів з оптимальним терміном застосування не більше 30 діб.

10. При відновленні із ліофілізованого стану клітин *Pasteurella* spp., *Escherichia* spp. та *Salmonella* spp. дослідних штамів виявлено стимулювальний вплив NP Au і NP Ag щодо інтенсивності приросту біомаси за збільшенням рівня показника КУО/мл у середньому на 15,1 і 36,6 %, на 28,8 і 22,3 % та на 25,1 і 20,2 % ($P < 0,05$) відповідно щодо значень показника за стандартних умов культивування.

11. Інтенсифікація приросту біомаси регідратованих клітин *E. coli* за дії NP Au і NP Ag розміру ~30 нм супроводжується зниженням у клітинних мембранах умісту продуктів ПОЛ (штами 57 і 25) і карбоксильних похідних окиснювальної модифікації білків (штами 57, 25, 24 і 20) на тлі підвищення рівня загальної АОА на 91,9 % і гальмування каталазної активності у 1,5–4,5 разу, активації питомої мембранної H^+ -АТФ-ази у 3,2 разу та дихальної активності на 53,5 % ($P < 0,05$). Ці NPMe, завдяки їх

антиоксидантному впливу, можна вважати біосумісними щодо клітинних мембран прокариот.

12. Інтенсифікація приросту біомаси регідратованих клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 за дії NPAu та NPAg супроводжується посиленням мембранної H⁺-АТР-ази (на 52,6 %), штамів 15, 396 і 1718 – активацією обома показниками енергетичного метаболізму (P<0,05). У штамів *S. Enteritidis* 34, *S. Typhimurium* 16 та *S. Dublin* 12, навпаки, відбувається пригнічення ензиматичної активності (на 25,8 %) на тлі посилення ендогенного дихання клітин (на 42,6 %; P<0,05), що є ознакою структурно-функціональних ушкоджень клітинних мембран цих штамів під час ліофілізації/регідратації.

13. Культивування штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 у поживному середовищі з умістом NPAu у концентрації 2,9–11,6 мкг/мл за металом сприяє стимуляції приросту біомаси клітин, підвищенню рівня питомої H⁺-АТР-азної та дихальної активності (до 30 і 74 %; P<0,05), що вказує на індукцію гідролізу АТР у мембранах, високий енергетичний потенціал і функціональну активність клітин.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Рекомендовано використовувати NPAu та NPAg розміру ~30 нм у концентраціях 1,16 та 2,59 мкг/мл за металом під час культивування клітин *Pasteurella* spp. та *Escherichia* spp. перед етапом ліофілізації. Це дасть змогу підвищити утворення біомаси клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 у середньому на 25,9 та 36,6 %, а клітин *E. coli* штамів 4, 20 і 57 – на 28,8 та 22,2 % ($P < 0,05$) відповідно порівняно з контрольним рівнем показника (стандартне середовище).

2. Рекомендовано використовувати NPAu та NPAg розміру ~30 нм у діапазоні концентрацій 0,24–1,93 та 0,27–2,16 мкг/мл за металом під час культивування клітин *Salmonella* spp. перед етапом ліофілізації. Завдяки цьому підвищується утворення біомаси клітин штамів *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16, *S. Enteritidis* 34 і M у середньому на 25,1 та 20,2 % ($P < 0,05$) відповідно порівняно з контрольним рівнем показника (стандартне середовище).

3. Рекомендовано додавати до складу поживного середовища NPAu розміру ~19 нм у діапазоні концентрацій 2,9–11,6 мкг/мл за металом. Це дасть змогу збільшити рівень приросту біомаси клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 на 2 і 6 lg порівняно з його контрольним значенням (стандартне середовище).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Feynman R. P. There's plenty of room at the bottom. An invitation to enter a new field of physics. *Caltech Eng. Sci.* 1960. Vol. 23, No. 5. P. 22–36. URL : <http://calteches.library.caltech.edu/47/2/1960Bottom.pdf>. (переклад рос. мовою А. В. Хачояна дивись : Фейнман Р. Ф. Внизу полным полно места: приглашение в новый мир физики. *Рос. хим. ж.* 2002. Т. XLVI, № 5. С. 4–6. URL : <http://www.chem.msu.su/rus/jvho/2002-5/4.pdf>).
2. Taniguchi N. On the basic concept of «nano-technology». *Proc. Int. Conf. Prod. Eng.* Tokyo : Jap. Soc. Precision Eng., 1974. Pt. II. P. 18–23.
3. Drexler K. E. Engines of creation: the coming era of nanotechnology. New York : Anchor Books, 1986. 320 pp.
4. Drexler K. E. Nanotechnology: the past and the future. *Science*. 1992. Vol. 255, No. 5042. P. 268–269.
5. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties / The Royal Society and The Royal Academy of Engineering. Cardiff, UK : Clyvedon Press, 2004. 116 pp.
6. Ратнер М., Ратнер Д. Нанотехнология: простое объяснение очередной гениальной идеи. М. : Вильямс, 2004. С. 20–22.
7. Игами М. Библиометрические индикаторы: исследования в области нанонауки. *Форсайт*. 2008. № 2(6). С. 36–45.
8. Игами М., Оказаки Т. Современное состояние сферы нанотехнологий: анализ патентов. *Форсайт*. 2008. № 3(7). С. 32–43.
9. Кизим М. О. Перспективи розвитку і комерціалізації нанотехнологій в економіках країн світу та України / М. О. Кизим, І. Ю. Матюшенко; НАН України, Наук.-дослід. Центр індустр. проблем розвитку. Харків : ІНЖЕК, 2011. 389 с.

10. Huang C., Notten A., Rasters N. Nanoscience and technology publications and patents: a review of social sciences and strategies. *J. Technol. Transf.* 2011. Vol. 36, No. 2. P. 145–172.
11. Miyazaki K., Islam N. Nanotechnology systems of innovation — an analysis of industry and academia research activities. *Technovation.* 2007. Vol. 27, No. 11. P. 661–675.
12. Bernard D. Are specific regulations for nanomaterials efficient? / D. Bernard. International conference on safe production and use of nanomaterials «Nanosafe – 2012»: Abstract Book. Grenoble, France, 2012.
13. Сергієва А. Становлення термінології нанонауки. *Всеукр. наук. конф. «Історичні регіони України: минуле та сучасність» (Харків, 28–29 лист. 2013 р.)*. Харків, 2013. С. 11–113.
14. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / І. С. Чекман, З. Р. Ульберг, В. О. Маланчук та ін. Київ : Поліграф плюс, 2012. – 327 с.
15. Рыбалкина М. Нанотехнологии для всех. Большое в малом. М. : Nanotechnology News Network, 2005. 434 с.
16. Фостер Л. Нанотехнологии. Наука, инновации и возможности : пер. с англ. / Л. Фостер. М. : Техносфера, 2008. 349 с.
17. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. М. : Бином. Лаборатория знаний, 2007. С. 134.
18. Чекман І. С., Горчакова Н. О., Озейчук О. Ю. Наноматеріали і наночастинки: класифікація. *Вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*. 2009. № 2. С. 188–201.
19. Наночастинки: впровадження у медичну практику / І. С. Чекман та ін. *Вісн. фармакології та фармацевції*. 2010. № 10. С. 2–11.
20. Рамбиди Н. Г. Нанотехнологии и молекулярные компьютеры. М. : Физматлит, 2007. 256 с.
21. Большая книга о малом мире / В. И. Ляшенко, И. В. Жихарев, К. В. Павлов, Т. Ф. Бережная ; НАН Украины. Ин-т экономики промышленности. Луганск: Альма-матер, 2008. 531 с.

22. Заячук Д.М. Нанотехнології і наноструктури : навч. посібник / Д.М. Заячук ; Нац. ун-т «Львів. політехніка». Львів, 2009. 580 с.
23. Харрис П. Углеродные нанотрубки и родственные структуры. Новые материалы XXI века / под ред. Л. А. Чернозатонского. М. : Техносфера, 2003. 336 с.
24. Рит М. Наноконструирование в науке и технике. Введение в мир нанорасчёта. М. ; Ижевск : НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2005. 160 с.
25. Singer P. Nanotechnology. *Semiconductor International*. 2007. Vol. 30, No. 1. P. 36–40.
26. Нанохімія. Наносистеми. Наноматеріали /С. В. Волков та ін. Київ : Наук. думка, 2008. 422 с.
27. Shulenburg M. Nanotechnology: Innovation for tomorrow's world. Luxembourg: Office Off. Publ. Eur. Commun., 2004. 60 pp.
28. Баранов Д. А., Губин С. П. Магнитные наночастицы: достижения и проблемы химического синтеза. *Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии*. 2009. № 1–2. С. 129–147.
29. Чекман І. С. Нанофармакологія. Київ : Задруга, 2011. 424 с.
30. Пул Ч., Оуенс Ф. Нанотехнологии. 2-е изд., доп. М. : Техносфера, 2006. 336 с.
31. Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005. Vol. 113, No. 7. P. 823–839.
32. Гусев А. И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. 2-е изд., испр. М. : Физматлит, 2007. 416 с.
33. Елементи фізики поверхні, наноструктур і технологій / В.В. Погосов, Ю.А. Куницький, А.В. Бабіч, А.В. Коротун ; Запоріз. нац. техн. ун-т НАН України. Запоріжжя, 2010. 366 с.

34. Наноразмерные системы и наноматериалы : исследования в Украине / Л. Ю. Авдеева, Е. А. Авраменко, Е. В. Аксененко и др. ; НАН Украины. Киев : Академперіодика, 2014. 766 с.
35. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications / S. Laurent et al. *Chem. Rev.* 2008. Vol. 108, No. 6. P. 2064–2110.
36. Liu M., Guyot-Sionnest P. Synthesis and optical characterization of Au/Ag core/shell nanorods. *J. of Physical Chemistry B.* 2004. Vol. 108. P. 5882–5888.
37. Boisselier E., Didier A. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Ch. Society Reviews.* 2009. Vol. 38. P. 1759–1782.
38. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent / J. F. Hainfeld et al. *Br. J. Radiol.* 2006. Vol. 79, No. 939. P. 248–253.
39. Магнітні наночастиці: методи отримання, будова, властивості / С. П. Губин і др. *Науч. сессія МІФІ.* 2007. Т. 9. С. 210–395.
40. Борисевич В. Б. Нанотехнологія у ветеринарній медицині (впровадження інноваційних технологій). Київ : ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології», 2009. 232 с.
41. Токсиколого-гигиенические аспекты проблемы безопасности производства продукции на основе наночастиц золота / Б. Н. Филатов и др. *Токсикол. вестн.* 2010. № 3. С. 30–33.
42. Ковтун Г. П. Наноматериалы: технологии и материаловедение / Г. П. Ковтун, А. А. Веревкин ; Харьков. физ.-техн. институт. Харьков, 2010. 73 с.
43. Наносеребро: технологии получения, фармакологические свойства, показания к применению / И. С. Чекман, Б. А. Мовчан, М. И. Загородный и др. *Мистецтво лікування.* 2008. № 5(51). С. 32–40.
44. Дизайн наноразмерных биоконкомпозитов серебра для создания новых антимикробных средств / Г. П. Александрова и др. *Второй Санкт-*

Петербургский междунар. экол. форум «Окружающая среда и здоровье человека». СПб., 2008. С. 6.

45. Получение и применение наночастиц, содержащих медь и серебро/ К. Г. Лопатько и др. *Тр. ин-та пробл. материаловедения им. И. Н. Францевича*. 2010. № 1. С. 232–243.

46. *In vivo* magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction/ D. L. Kraitchman et al. *Circulation*. 2003. Vol. 107.No. 18. P. 2290–2293.

47. Егорова Е. М. Наночастицы металлов в растворах. Биохимический синтез, свойства и применение. *Нанотехника*. 2004. № 1. С. 15–27.

48. Фуллерены— основа материалов будущего / В. И. Трефилов и др. Киев : Адеф, 2010. 148 с.

49. Allsopp M., Walters A., Santillo D. Nanotechnologies and nanomaterials in electrical and electronic goods: a review of uses and health concerns. *Greenpeace Res. Lab. Tech. Note*. 2007. Vol. 9.P. 1–22.

50. Method determining nanoparticle core weight / F. Reynolds et al. *Anal. Chem*. 2005. Vol. 77. No. 3. P. 814–817.

51. Генералов М. Б. Криохимическая нанотехнология: учеб. пособ. для вузов. М. : Академкнига, 2006. 325 с.

52. Сергеев Г. Б. Нанохимия. 2-е изд., испр. и доп. М. : Изд-во МГУ, 2007. 336 с.

53. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery/ J. Panyam et al. *FASEB J*. 2002. Vol. 16. No. 10. P. 1217–1226.

54. Гусева А. И., Ремпель А. А. Нанокристаллические материалы. М.: Физматлит, 2001. 224 с.

55. Chen P. C., Mwakwari S. C., Oyelere A. K. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing. *Nanotech. Sci. Appl*. 2008. No. 1. P. 45–66.

56. Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine*. 2007. Vol. 3.No. 1. P. 20–31.
57. Application of gold nanoparticles in cancer nanotechnology / W. Cai et al. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2008. No. 1. P. 17–32.
58. Hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) modified gold nanoparticles as an intracellular tracking and delivery agent / W. Fu et al. *NSTI-Nanotech*. 2005. Vol. 1. P. 324–327.
59. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування / за ред. Р. С. Стойки. Київ : Наукова думка, 2017. 361 с.
60. Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for X-ray computed tomography in mice / Q. Y. Cai et al. *Invest. Radiol.* 2007. Vol. 42. No. 12. P. 797–806.
61. Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003. Vol. 55. No. 3. P. 403–419.
62. Electrochemical immunosensor based on polythionine/gold nanoparticles for the detection of aflatoxin B₁/ J. Owino et al. *Sensors (Basel)*. 2008. Vol. 8, No. 12. P. 8262–8274.
63. Xu C., Tung G. A., Sun S. Size and concentration effect of gold nanoparticles on X-ray attenuation as measured on computed tomography. *Chem. Mater.* 2008. Vol. 20. No. 13. P. 4167–4169.
64. Jähnen-Dechent W., Simon U. Function follows form: shape complementarity and nanoparticle toxicity. *Nanomedicine (Lond.)*. 2008. Vol. 3. No. 5. P. 601–603.
65. Pissuwan D., Valenzuela S. M., Cortie M. B. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2006. Vol. 24. No. 2. P. 62–67.

66. Troutman T. S., Barton J. K., Romanowski M. Optical coherence tomography with plasmon resonant nanorods of gold. *Opt. Lett.* 2007. Vol. 32. No. 11. P. 1438–1440.
67. Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles / J. Cardinal et al. *Surgery.* 2008. Vol. 144. No. 2. P. 125–132.
68. Gold nanoparticles designed for combining dual modality imaging and radiotherapy / C. Alric et al. *Gold Bull.* 2008. Vol. 41. No. 2. P. 90–97.
69. Jain K. K. Nanotechnology-based drug delivery for cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2005. Vol. 4. No. 4. P. 407–416.
70. Kumar K. S., Selvaraj V., Alagar M. Synthesis of PET-PLA/drug nanoparticles and their effect with gold nanoparticles for controlled drug release in cancer chemotherapy. *Res. Lett. Nanotech.* 2008. Vol. 2008. Art. ID 389512. P. 1–4. URL: <http://doi.org/10.1155/2008/389512>.
71. A whole blood immunoassay using gold nanoshells / L. R. Hirsch et al. *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. No. 10. P. 2377–2381.
72. Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles / J. C. Y. Kah et al. *Int. J. Nanomedicine.* 2007. Vol. 2. No. 4. P. 785–798.
73. Yan F., Chen J., Ju H. Immobilization and electrochemical behavior of gold nanoparticles modified leukemia K562 cells and application in drug sensitivity test. *Electrochem. Commun.* 2007. Vol. 9. No. 2. P. 293–298.
74. Silva G. A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg. Neurol.* 2004. Vol. 61. No. 3. P. 216–220.
75. Наноматериалы и нанокompозиты в медицине, биологии и экологии / под ред. А. П. Шпака, В. П. Чехуна. Киев: Наукова думка, 2011. 444 с.
76. Bawa R. Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey. *Nanotechnol. Law Business.* 2008. Vol. 5. No. 2. P. 135–155.

77. Kabanov A. V. Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58, No. 15. P. 1597–1621.
78. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo* / Z. Chen et al. *Toxicol. Lett.* 2006. Vol. 163. No. 2. P. 109–120.
79. Kagan V.E., Bayir H., Shvedova A.A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. *Nanomedicine*. 2005. Vol. 1. No. 4. P. 313–316.
80. МУ 1.2.2520-09. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов: метод. указания. М. : Федер. центр гигиены и эпидемиол. Роспотребнадзора, 2009. 35 с.
81. Глушкова А.В., Радиллов А.С., Рембовский В. Р. Нанотехнологии и нанотоксикология — взгляд на проблему. *Токсикол. вестн.* 2007. № 6. С. 4–8.
82. An *in vitro* assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement / V. Alt et al. *Biomaterials*. 2004. Vol. 25. No. 18. P. 4383–4391.
83. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 2008. Vol. 4. No. 1. P. 26–49.
84. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part VI: Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation/ K. W. Powers et al. *Toxicol. Sci.* 2006. Vol. 90. No. 2. P. 296–303.
85. Functionalized fibrils for bio-nanotechnology / S. L. Gras et al. 2006 *Int. Conf. Nanosci. Nanotechnol. (Brisbane, Australia, 3–7 July 2006): proc.* Brisbane, 2006. Vol. 1. P. 265–267.
86. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery/ I. Roy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102. No. 2. P. 279–284.
87. Processing and *in vitro* assembly of viruslike particles/ D. L. Lipin et al. 2006 *Int. Conf. Nanosci. Nanotechnol. (Brisbane, Australia, 3–7 July 2006): proc.* Brisbane, 2006. Vol. 1. P. 1–3.

88. Tsuji J. S., Maynard A. D. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV : Risk assessment of nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2006. Vol. 89. No. 1. P. 42–50.
89. Systemic interactions between inhaled ultrafine particles and endotoxin/ A. C. P. Elder et al. *Ann. Occup. Hyg.* 2002. Vol. 46. Suppl. 1. P. 231–234.
90. Systemic effects of inhaled ultrafine particles in two compromised, aged rat strains / A. C. P. Elder et al. *Inhal. Toxicol.* 2004. Vol. 16. No. 6–7. P. 461–471.
91. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century / I. Lynch et al. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2007. Vol. 134–135. P. 167–174.
92. Adsorbed proteins influence biological activity and molecular targeting of nanomaterials/ D. Dutta et al. *Toxicol. Sci.* 2007. Vol. 100. No. 1. P. 303–315.
93. Stimuli-responsive nanoparticles, hydrogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems / M. Motornov, Y. Roiter, I. Tokarev, S. Minko. *Progress in Polymer Science.* 2010. Vol. 35. P. 174–211.
94. Knowles D., Li H., Pastoret P.-P. Chapter 1.1.7. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine development. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. 6th ed. Paris : OIE, 2008. P. 66–89.
95. Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples/ P. V. Baptista et al. *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52. No. 7. P. 1433–1434.
96. Nanoparticles-mediated cellular response in size-dependent / W. Jiang et al. *Nat. Nanotechnol.* 2008. Vol. 3, No. 3. P. 145–150.
97. In vitro and in vivo study of solid lipid nanoparticles loaded with superparamagnetic iron oxide / E. Peira, P. Marzola, V. Podio et al. *J. of Drug Targeting.* 2003. Vol. 11. P. 19–24.

98. Gorelik E., Galili U., Raz A. On the role of cell surface carbogidrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*2001. Vol. 20. No. 3–4. P. 245–277.
99. Feraheme: package insert. Lexington, MA: AMAG Pharma, Inc., 2009.
100. Jun Y.-W., Seo J.-W., Cheon J. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Acc. Chem. Res.*2008. Vol. 41. No. 2. P. 179–189.
101. Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles / F. K. van Landeghem et al. *Biomaterials.* 2009. Vol. 30. No. 1. P. 52–57.
102. Ferumoxytol as an intravenous iron replacement therapy in hemodialysis patients / R. Provenzano et al. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. Vol. 4. No. 2. P. 386–393.
103. Lanza G. M., Wickline S. A. Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy. *Curr. Probl. Cardiol.*2003. Vol. 28. No. 12. P. 625–653.
104. Metal nanoshells / L. R. Hirsch et al. *Ann. Biomed. Eng.* 2006. Vol. 34. No. 1. P. 15–22.
105. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance / L. R. Hirsch et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*2003. Vol. 100. No. 23. P. 13549–13554.
106. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery / R. Sincha et al. *Mol. Cancer. Ther.*2006. Vol. 5. No. 8. P. 1909–1917.
107. Hoet P. M., Brüske-Hohlfeld I., Salata O. V. Nanoparticles — known and unknown health risks. *J. Nanobiotechnology.* 2004. Vol. 2. No. 1. P. 12. URL : <http://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>.

108. El-Ansary A., Al-Daihan S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles. *J. Toxicol.* 2009. Vol. 2009. Art. ID 754810. P. 1–9. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2009/754810>.

109. Внедрение нанотехнологий в производство кормов для животноводства. *Наноиндустрия*. 2009. № 1. С. 12–13.

110. Нанотехнологии и наноматериалы в агропромышленном комплексе / В. Ф. Федоренко и др.; под общ. ред. В. Ф. Федоренко. М. : ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. 312 с.

111. Нанотехнології мікронутрієнтів: питання безпеки та біотичності наноматеріалів при виробництві харчових продуктів / А. М. Сердюк та ін. *Журн. АМН України*. 2010, Т. 16. № 3. С. 467–473.

112. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases : report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: WHO, 2003. 149 pp.

113. ХенчЛ., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжирирование тканей. М.: Техносфера, 2007. 301 с.

114. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles/ R. Tanaka et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. Vol. 385, No. 8. P. 1414–1420.

115. Пиотровский А. Б., Киселев О. И. Фуллерены в биологии. СПб. : Росток, 2006. 336 с.

116. Нанотехнологии и наноматериалы в ветеринарии / М-во сел. хоз-ва РФ. М., 2011. 15 с. URL: http://guv.tatarstan.ru/rus/file/pub/pub_95316.pdf.

117. Застосування комплексу C₆₀фуллерену доксорубіцину для лікування пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*/ Панчук Р.Р., Прилуцька С.В., Чумак В.В. та ін. *J. Biomed Nanotechnol.* 2015. Vol. 11. P. 1139-1152.

118. Vasir J. K., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007. Vol. 59. No. 8. P. 718–728.

119. A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles-multi-walled carbon nanotubes-thionine multilayer

films on polyelectrolyte surface/ R. Ou et al. *Anal. Chim. Acta.* 2007. Vol. 603.No. 2. P. 205–213.

120. Комплекс C_{60} фуллерену з доксорубіцином як перспективний агент при протипухлинній терапії / С. Прилуцька, Л. Скивка, Г. Діденко. *Nanoscale Res. Lett.* 2015. Vol.10. P. 499.

121. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods / P. Baptista et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Vol. 391. No. 3. P. 943–950.

122. Comparative Analysis of the Antineoplastic Activity of C_{60} Fullerene with 5-Fluorouracil and Pyrrole Derivative In Vivo / O. V. Lynchak, Y. I. Prylutskyy, V. K. Rybalchenko et al. *Nanoscale Res. Lett.* 2017. Vol. 12(8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5215998/>

123. Peek L. J., Middaugh C. R., Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. Vol. 60. No. 8. P. 915–928.

124. Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-OO 7): Phase I study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity / B. Damascelli et al. *Cancer.* 2001. Vol. 92. No. 10. P. 2592–2602.

125. Fonseca C., Simões S., Gaspar R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release.* 2002. Vol. 83. No. 2. P. 273–286.

126. Sampathkumar S. G., Yarema K. Y. Targeting cancer cells with dendrimers. *Chem. Biol.* 2005. Vol. 12. No. 1. P. 5–6.

127. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil / D. Bhadra et al. *Int. J. Pharm.* 2003. Vol. 257. No. 1–2. P. 111–124.

128. Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against *Bacillus anthrax* spore challenge/ A. U. Bielinska et al. *Infect. Immun.* 2007. Vol. 75.No. 8. P. 4020–4029.

129. Colloidal gold particle concentration immune assay : patent 4853335, United States / D. A. Olsen, D. Bernstein. Appl. No. US 07/101415; filed : 28.09.87 ; publ. : 01.08.89. 12 pp. URL: www.google.com/patents/US4853335.

130. Дыкман Л. А., Богатырев В. А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии. *Успехи химии*. 2007. Т. 76. № 2. С. 199–213.

131. Black J. L. 3rd Genome projects and gene therapy: gateways to next generation biological weapons. *Mil. Med.* 2003. Vol. 168. No. 11. P. 864–871.

132. Method and reagents for genetic immunization: patent 6294378, United States / A. Houghton et al. Appl. No. US 09/230199; filed : 18.07.97 ; publ. : 25.09.01. 30pp. URL: www.google.com/patents/US6294378.

133. Foster N., Hirst B. H. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. Vol. 57. No. 3. P. 431–450.

134. Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage / X.X. He, K. Wang, W. Tan et al. *J. of the Am. Chem. Society*. 2003. Vol. 125. N. 24. P. 7168–7169.

135. Sarker D. K. Engineering of nanoemulsions for drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 2005. Vol. 2. No. 4. P. 297–310.

136. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs/ R. D. Hofheinz et al. *Anticancer Drugs*. 2005. Vol. 16. No. 7. P. 691–707.

137. Pegylated liposomal doxorubicin and mitomycin C in combination with infusional 5-fluorouracil and sodium folinic acid in the treatment of advanced gastric cancer: results of a phase II trial / S. U. Gnad-Vogt et al. *Anticancer Drugs*. 2005. Vol. 16. No. 4. P. 435–440.

138. Encapsulation in liposomal nanoparticles enhance the immunostimulatory, adjuvant and anti-tumor activity of subcutaneously administered CpG ODN/ S. de Jong et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007. Vol. 56. No. 8. P. 1251–1264.

139. Хромов О. С., Соловйов А. І. Експериментальне обґрунтування застосування фосфатидилхолінових ліпосом у медицині. *Фармакологія і лікар. токсикологія*. 2008. № 4(5). С. 88–98.
140. Lee L. J. Polymer nano-engineering for biomedical applications. *Ann. Biomed. Eng.* 2006. Vol. 34. No. 1. P. 75–88.
141. Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene / Y. Mo et al. *Mol. Vis.* 2007. Vol. 13. P. 746–757. URL: <http://www.molvis.org/molvis/v13/a81/>.
142. Чекман І. С., Ніцак О. В. Нанофармакологія: стан та перспективи наукових досліджень. *Вісн. фармакол. та фармацевції*. 2007. № 11. С. 7–10.
143. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release*. 2004. Vol. 100. No. 1. P. 5–28.
144. Sapra P., Tyagi P., Allen T.M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr. Drug Deliv.* 2005. Vol. 2. No. 4. P. 369–381.
145. Till M. C., Simkin M. M., Maebius S. Nanotech meets the FDA: a success story about the first nanoparticulate drugs approved by the FDA. *Nanotechnol. Law Business*. 2005. Vol. 2. No. 2. P. 163–167.
146. Вуглецеві нанотрубки як новітні матеріали для нейроінженерії / Д.М. Ротко, С.В. Прилуцька, К.І. Богуцька, Ю.І. Прилуцький. *Біотехнологія*. 2011. Т. 4. № 5. С. 9–24.
147. Токсичність вуглецевих наноструктур у системах *invitro* та *invivo*. / С. В. Прилуцька, Д. М. Ротко, Ю. І. Прилуцький, В. К. Рибальченко. *Суч. пробл. токс., харч. та хім. безпеки*. 2012. № 3–4 (58–59). С. 49–57.
148. Multi-walled carbon nanotube interaction with human epidermal keratinocytes / N. A. Monteiro-Riviere et al. *Toxicol. Lett.* 2005. Vol. 155. No. 3. P. 377–384.
149. Lecaroz C., Gamazo C., Blanco-Prieto M. J. Nanocarriers with gentamicin treat intracellular pathogens. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006. Vol. 6. No. 9–10. P. 3296–3302.

150. Biomedical platforms based on composite nanomaterials and cellular toxicity / S. Bellucci et al. *J. Phys. Conf. Ser.* 2007. Vol. 61. P. 95–98.
151. Moghimi S. M., Hunter A. C., Murray I. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005. Vol. 19. No. 3. P. 311–330.
152. Средство для ингибирования ВИЧ и ЦМВ-инфекций и способ их ингибирования: пат. 2196602, Российская Федерация / Г.Г. Миллер, А.А. Куш, В.С. Романова. № 2002101294/14; заявл. 22.01.02; опубл. 20.01.03. 2 с. URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2196602>.
153. Статистичний щорічник України за 2007 рік / Держ. ком. статистики України. Київ : Консультант, 2008. 572 с.
154. Глобальная стратегия ВОЗ по питанию, физической активности и здоровью: руководство для стран по мониторингу и оценке осуществления / ВОЗ. Женева: ВОЗ, 2009. 47 с.
155. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії :учбовий і практ. посіб. для студ. аграр. закл. освіти III–IV рівнів акредитації зі спец. «Вет. медицина» / В. Б. Борисевич та ін.; за ред. В. Б. Борисевича, В. Г. Каплуценка. Київ: Авіцена, 2010. 416 с.
156. Питание и здоровье в Европе: новая основа для действий. Резюме : пер. с англ. М. Хусаинова. Копенгаген: Европ. регион. бюро ВОЗ, 2003. 38 с.
157. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. Vol. 18. No. 1. P. 26–30.
158. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance / C. Medina et al. *Br. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 150. No. 5. P. 552–558.
159. Коллоидные металлы как перспективные компоненты для создания комплексных металлосодержащих пробиотиков / Т. Г. Грузина и др. *Доп. НАН України. Сер. : Біологія.* 2004. № 3. С. 154–158.
160. Нормалізація біохімічних показників крові молодняка сільськогосподарських тварин під впливом пробіотичного препарату

«Окарін-Вет»/ Л. С.Резніченко та ін. *Вет. біотехнологія : бюл.*2008. № 13(2). С. 195–204.

161. Nanoparticles of colloidal metals as perspective components for creation of metal-containing probiotics / Reznichenko L. et al. *Ukrainian-German Symp. on Nanobiotechnology (Ukraine, Kyiv, 14–16 December 2006) : abstr.* Kyiv, 2006. P. 121.

162. Применение нанотехнологий в промышленном птицеводстве («МТох+» стратегия профилактики микотоксикозов): метод. реком./ И. А. Егоров и др.; под общ. ред. В. И.Фисинина. СПб., 2011. 34 с.

163. Адсорбция афлатоксина В₁наноалмазами детонационного синтеза / А. П. Пузырь и др. *Докл. РАН.* 2007. Т. 417. № 1. С. 117–120.

164. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part VIII : International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials / K. Thomas et al. *Toxicol. Sci.*2006. Vol. 92.No. 1. P. 23–32.

165. Chen D., Xi T., Bai J. Biological effects induced by nanosilver particles: *in vivo* study. *Biomed. Mater.*2007. Vol. 3.No. 2. P. S126–S128.

166. Chen X., Schluesener H. J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicol. Lett.*2008. Vol. 176.No. 1. P. 1–12.

167. Нанотехнології, наномедицина, нанофармакологія: стан, перспективи наукових досліджень, впровадження в медичну практику/ В. Ф. Москаленко та ін. Інац. конгр. «Человек и Лекарство — Украина» (Київ, 26–28 бер. 2008 р.) : тези доп. Київ, 2008. С. 167–168.

168. Tumor-inhibitory effect and immunomodulatory activity of fullerol C₆₀(OH)_x/ J. Zhu, Z. Ji, J. Wang et al. *Small.* 2008. Vol. 4. P. 1168–1175.

169. Молекулярний докінг нанорозмірного матеріалу діоксиду титану із зовнішньоклітинною частиною ГАМКБ-рецептора / А. М. Науменко, О. Ю. Нипирко, О. В. Цимбалюк та ін. *Біол. Студії.* 2016. Вип. 10(3). С. 5–16.

170. Rezaeinejad S., Ivanov V. Heterogeneity of *Escherichia coli* population by respiratory activity and membrane potential of cells during growth

and long-term starvation. / *Microbiological Research*. 2011. Vol. [66\(2\)](#). P. 129–135.

171. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: a novel biological approach./ A. R. Shahverdi, S. Minaeian, H. R. Shahverdi, H. Jamalifar, A. A. Nohi. *Process Biochem*. 2007. Vol. 42(5). P. 919–923.

172. Дисбактериоз кишечника (клиника, диагностика, лечение): рук. для врачей / Ю. В. Лобзин и др. Спб. : Фолиант, 2003. 256 с.

173. Бондаренко В. М., Воробьёв А. А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиол.* 2004. № 1. С. 84–92.

174. Othman M., Agüero R., Lin H. C. Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008. Vol. 24. No. 1. P. 11–16.

175. O’Keefe S. J. D. Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008. Vol. 24. No. 1. P. 51–58.

176. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract/ I. Lenoir-Wijnkoop et al. *Nutr. Rev.* 2007. Vol. 65. No. 11. P. 469–489.

177. Конев Ю. В. Дисбиозы и их коррекция. *Consilium Medicum*. 2005. Т. 7. № 6. С. 432–437.

178. Биологическая активность микроорганизмов-пробиотиков / Г. И. Новик и др. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2006. Т. 42. № 2. С. 187–194.

179. Пробиотики: можливість застосування при гіперхолестеринемії / С. М. Мосійчук та ін. *Укр. мед. часоп.* 2006. № 2. С. 10–23.

180. Voivrint M., Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2007. Vol. 23. No. 6. P. 679–692.

181. Воробьёва Л. И., Абилев С. К. Антимутагенные свойства бактерий. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2002. Т. 38. № 2. С. 115–127.

182. Elmer G. W. Probiotics: «living drugs». *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2001. Vol. 58. No. 12. P. 1101–1109.
183. Полеско И. В., Малиновская В. В. Роль микрофлоры кожи и кишечника у больных себорейным дерматитом. *Детск. инфекции.* 2005. Т. 4, № 1. С. 39–44.
184. Амосова Л. А., Ломако Ю. В., Москалёва Н. В. Разработка способа получения поверхностных протективных антигенов *S. dublin* и *S. typhimurium* при помощи солянокислого гидроксилamina и мочевины для изготовления компонентов вакцины против сальмонеллёза крупного рогатого скота. *Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук.* 2009. № 4. С. 86–91.
185. Лясковский Т. М., Подгорский В. С. Оценка пробиотиков, согласно рекомендациям международных организаций (FAO/WHO). *Мікробіол. журн.* 2005. Т. 67. № 6. С. 104–112.
186. Нутрицевтики и пробиотики в лечении синдрома кишечной недостаточности и нормализации микробиоценоза кишечника / Т. С. Попова и др. *Клин. медицина.* 2001. Т. 79. № 4. С. 4–9.
187. Перспективність бактерій родів *Escherichia* та *Enterococcus* для створення полікомпонентного пробіотику/ Л. С. Рєзніченкотаін. *Вісн. пробл. біології і медицини.* 2007. № 1. С. 31–37.
188. Рєзніченко Л. С., Вембер В. В., Грузіна Т. Г. Металовмісні пробіотики в біотерапії мікроелементозів та дисбактеріозів людей та тварин. *Укр. біохім. журн.* 2007. Т. 79, № 4. С. 132.
189. Рєзніченко Л. С., Грузіна Т. Г., Вембер В. В. Пробіотик «Окарін-Вет» у профілактиці та терапії захворювань шлунково-кишкового тракту молодняку сільськогосподарських тварин. *Матеріали II міжнар. конф. мол. учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 19–21 лист. 2007 р.).* Харків : Планета-Принт, 2007. С. 103–104.
190. Новик Г. И., Астапович Н. И., Самарцев А. А. Влияние препаратов микроэлементов, полученных при обработке природного минерала кремния, на физиолого-биохимические особенности

бифидобактерий. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2001. Т. 37. № 3. С. 317–325.

191. Merroun M. L. Interactions between metals and bacteria: fundamental and applied research. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology / Ed. by A. Méndez-Vilas*. Badajoz: Formatex, 2007. P. 108–119.

192. Хромосомна природа резистентності до тетрацикліну у *Escherichia coli* Г35 №2 пробіотику «Окарін-голд» / С. М. Дибкова та ін. *Вісн. пробл. біології і медицини*. 2005. № 1. С. 19–22.

193. Huh A.J., Kwon Y.J. Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistantera. *J. of Controlled Release*. 2011. Vol. 156. P. 128–145.

194. Мосин О. В. Физиологическое воздействие наночастиц серебра на организм человека. *NanoWeek.2 008*. № 3. С. 34–37.

195. Ульберг З. Р., Грузіна Т. Г., Карпов О. В. Нанотехнології в медицині: роль колоїдно-хімічних процесів. *Вісн. НАН України*. 2008. № 8. С. 28–41.

196. Chah S., Hammond M. R., Zare R. N. Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes. *Chem. Biol*. 2005. Vol. 12. No. 3. P. 323–328.

197. Aslan K., Lakowicz J. R., Geddes C. D. Nanogold-plasmonresonance-based glucose sensing. *Anal. Biochem*. 2004. Vol. 330. No. 1. P. 145–155.

198. Polarization microscopy with stellated gold nanoparticles for robust, in-situ monitoring of biomolecules / J. Aaron et al. *Opt. Express*. 2008. Vol. 16. No. 3. P. 2153–2167.

199. Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer / R. R. Letfullin et al. *Nanomedicine (Lond.)*. 2006. Vol. 1. No. 4. P. 473–480.

200. Effect of silver content on the structure and antibacterial activity of silver-doped phosphate-based glasses / S. P. Valappil, D. M. Pickup, D. L. Carroll et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. Vol. 51(12). P. 4453–4461.

201. Singh B.N., Rao Prateeksha Ch.V. Antimicrobial nanotechnologies: what are the current possibilities? *Curr. sci.* 2015. Vol. 108(7). P. 1210–1213.

202. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах / Е. М. Егорова и др. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2 : Химия.* 2001. Т. 42. № 5. С. 332–338.

203. Борисевич В. Б., Борисевич Б. В. Антибактеріальні властивості та хіміотерапевтична активність наноаквахелатів металів. *Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії:учбовий і практ. посіб. для студ. аграр. закл. освіти III–IV рівнів акредитації зі спец. «Вет. медицина»/ В. Б. Борисевич та ін.; за ред. В. Б.Борисевича, В. Г. Каплуненка. Київ : Авіцена, 2010. С. 27–33.*

204. Вплив важких металів у колоїдній та іонній формах на ростові процеси *Escherichia coli* 1257 / В. В. Вембер та ін. *Наук. вісті Нац. техн. ун-ту України «Київ. політехн. ін-т».* 2003. № 6. С. 132–137.

205. Изучение ингибирующего влияния ионов свинца на клетки некоторых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* / Т. Г. Грузина и др. *Укр. біохім. журн.* 2002. Т. 74. № 2. С. 115–119.

206. Вплив металів-мікроелементів на функціональний стан бактерій-пробіонтів / Л. С. Резніченко та ін. *Укр. біохім. журн.* 2008. Т. 80. № 1. С. 96–101.

207. Influence of gold nanoparticles of varying size in improving the lipase activity within cationic reverse micelles / S. Maiti et al. *Chemistry.* 2010. Vol. 16. No. 6. P. 1941–1950.

208. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice / S. BarathManiKanth et al. *J. Nanobiotechnology.* 2010. Vol. 8. P. 16. URL: <http://doi.org/10.1186/10.1186/1477-3155-8-16>.

209. Влияние коллоидного золота на физиолого-биохимические процессы *Escherichia coli* 1257 / Т. Г. Грузина и др. *Укр. біохім. журн.* 2003. Т. 75, № 3. С. 95–98.
210. Исследование роли структуры компонентов поверхности микроорганизмов в гетерокоагуляции с частицами коллоидного золота / В. И. Карамушка и др. *Прикл. биохимия и микробиология.* 1987. Т. 23, вып. 5. С. 697–702.
211. Роль биохимических факторов в селективной гетерокоагуляции микроорганизмов с частицами коллоидного золота / Ф. Д. Овчаренко и др. *Докл. АН СССР.* 1986. Т. 287. № 4. С. 1009–1012.
212. Біохімічні механізми селективності взаємодії мікроорганізмів з металами / Ф. Д. Овчаренко та ін. *Вісн. АН УРСР.* 1988. № 2. С. 11–21.
213. Peculiarities of live cells' interaction with micro- and nanoparticles / A. S. Dukhin, Z. R. Ulberg, V. I. Karamushka, T. G. Gruzina. *Adv. in Coll. and Interface Science.* 2010. Vol. 159. P. 60–71.
214. Влияние золота на рост и морфофизиологические свойства *Candida utilis* / Е. Д. Коробушкина и др. *Микробиология.* 1987. Т. 56. Вып. 1. С. 44–51.
215. Придыбайло Н. Д. Нанотехнологии – путь к созданию новых вакцин для птицеводства. *Вмеждународ. вет. конгр. по птицеводству (Москва, 21–24 апр. 2009 г.).* М., 2009. С. 26–27.
216. Придыбайло Н. Перспективы использования нанотехнологий в птицеводстве. *Птицеводство.* 2008. № 7. С. 32–33.
217. Fricker S. P. 4th International Conference on Gold and Silver in Medicine. *Gold Bulletin.* 1998. Vol. 31. No. 3. P. 103–104.
218. Ульберг З. Р. Коллоидно-химические свойства биологических наносистем. Биомембраны. *Коллоидно-химические основы нанонауки* / З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузина, Н. В. Перцев; под ред. З. Р. Ульберг. Киев: Академперіодика, 2005. С. 199–237.

219. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: the Tellinid clam *Scrobicularia plana*. / Y. F. Pan, P. E. Buffet, L. Poirier et al. *Environ. Pollution*. 2012. Vol. 168.P. 37–43.

220. P4-ATP-aseAtp8b1/FIC1: structural properties and (patho)physiological functions / T. V. Korneenko et al. *Bioorg Khim.* 2015. Jan-Feb. Vol.41. No. 1. P. 3–12.

221. Энергозависимая аккумуляция Au(III) приводит к ингибированию систем трансформации энергии у бактерий / В. И. Карамушка, З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузина и др. *Прикл. биохим. и микробиол.* 1991. Т. 27. Вып. 1. С. 119–126.

222. Вплив іонного та колоїдного золота на АТР-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus sp.* B4253 та *Bacillus sp.* B4851 / Г. В. Данилович та ін. *Укр. біохім. журн.* 2007. Т. 79. № 4. С. 46–51.

223. Ідентифікація та каталітичні властивості Mg²⁺-залежної АТР-гідролази плазматичних мембран *Bacillus sp.* B4253, здатних до накопичення золота / Г. В. Данилович та ін. *Укр. біохім. журн.* 2004. Т. 76. № 5. С. 45–51.

224. Gupta A. K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005. Vol. 26. No. 18. P. 3995–4021.

225. Кузьмина Л. Н., Звиденцова Н. С., Колесников Л. В. Получение наночастиц серебра методом химического восстановления. *Материалы Междунар. конф. «Физико-химические процессы в неорганических материалах» (ФХП-10)*. Кемерово: Кузбассвуиздат. 2007. Т. 2. С. 321–324.

226. Microwave-assisted preparation of silver nanoparticles / T. Yamamoto et al. *Chem. Lett.* 2004. Vol. 33. № 2. P. 158–159.

227. Huang H., Yuan Q, Yang X. Preparation and characterization of metal-chitosan nanocomposites. *Coll. Surf. Biointerfaces* .2004. Vol. 39, No. 1–2. P. 31–37.

228. Kyriacou S. V., Brownlow W. J., Xu X. H. Using nanoparticles optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. *Biochemistry*. 2004. Vol. 43. № 1. P. 140–147.
229. Сергеев Г. Б. Нанохимия: учеб. пособ. М. : КДУ, 2006. 336 с.
230. Мовчан Б. А. Электронно-лучевая гибридная нанотехнология осаждения неорганических материалов в вакууме. *Актуал. пробл. современ. материаловедения*. Киев: Академперіодика, 2008. Т. 1. С. 227–247.
231. Silver protein (core-shell) nanoparticle production using spent mushroom substance / N. Vigneshwaran et al. *Langmuir*. 2007. Vol. 23. № 13. P. 7113–7117.
232. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis* / K. Kalimuthu et al. *Coll. Surf. Biointerfaces*. 2008. Vol. 65. № 1. P. 150–153.
233. Вплив неіонного колоїдного розчину наночасток біогенних металів на вміст елементів металів у рослинних тканинах / Н.Ю. Таран, Л.М. Бацманова, К.Г. Лопатько та ін. *Фізика живого*. 2011. Т. 19. С. 9–11.
234. Глущенко Н. Н., Богословская О. А., Ольховская И. П. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов. *Хим. физика*. 2002. Т. 21. № 4. С. 79–85.
235. Амплеева Л. Е. Физиологическое состояние кроликов при введении в рацион вики, выращенной с использованием ультрадисперсных порошков железа и кобальта: дис.... канд. биол. наук : 03.00.13. Рязань, 2006. 142 с.
236. Изучение воздействия наночастиц железа на содержание гидропироксидов в липидах печени в процессе регенерации кожи после нанесения экспериментальных полнослойных ран/ Т. А. Байтукалов и др. *II Всерос. науч. конф. «Физико-химические и прикладные проблемы магнитных дисперсных наносистем» (Ставрополь, сент. 2009 г.): сб. науч. тр.* Ставрополь, 2009. С. 276.
237. Оцінка біологічної дії кобальтвмісного нанокompозиту із використанням біохімічних маркерів двостулкового моллюска *Anodonta cygnea*

/ Г.І. Фальфушинська, Л.Л. Гнатишина, О.Б. Столяр та ін. *Укр. біохім. журнал.* 2011. Т. 83. С. 14–21.

238. Глущенко Н. Н., Богословская О. А., Ольховская И. П. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенность их биологического действия. *Нанотехнология — технология XXI века: тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. (Москва, 24–26 мая 2006 г.)*. М., 2006. С. 93–95.

239. Исследование наночастиц металлов в качестве источника микроэлементов для животных / Е. В. Яушева и др. *Соврем. пробл. науки и образования.* 2013. №5. С. 470. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=10180>.

240. Synthesis, characterization, and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles/ F. Rohner et al. *J. Nutr.* 2007. Vol. 137. No. 3. P. 614–619.

241. Ле Вьет Фьонг. Использование высокодисперсных порошков железа, меди, марганца, цинка в премиксах цыплят-бройлеров: дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.02. М., 2005. 114 с.

242. Токсико-біохімічна характеристика неорганічних елементів та застосування рентгенофлуоресцентного аналізу у ветеринарній медицині / О.Т. Куцан, О.Л. Оробченко, Ю.А. Кочергін. Харків : «Планета-прінт, 2014. 300 с.

243. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity / A. Panacek et al. *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 110. № 33. P. 16248–16250.

244. Фёдоров И. Наночастицы серебра. *Вестн. инноваций.* 2005. Т. 1. № 2. С. 25–31.

245. Фотохимический синтез наночастиц серебра в водных растворах поликарбоновых кислот. Влияние полимерной матрицы на размер и форму частиц / Б. М. Сергеев и др. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия.* 2001. Т. 42, № 5. С. 308–314.

246. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles / C. Baker et al. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005. Vol. 5, № 2. P. 244–249.
247. Родимин Е. Приготовление целебных медно-серебряных растворов и металлоионотерапия. М. : Рем, 2003. 144 с.
248. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* by silver in tap water/ N. Silvestry-Rodriguez et al. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2007. Vol. 42. № 11. P. 1579–1584.
249. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / A. R. Shahverdi et al. *Nanomedicine.* 2007. Vol. 3. № 2. P. 168–171.
250. Pal S., Tak Y. K., Song J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Vol. 73. № 6. P. 1712–1720.
251. *Colloidal silver fabrication using the spark discharge system and its antimicrobial effect on Staphylococcus aureus* / D. C. Tien et al. *Med. Eng. Phys.* 2008. Vol. 30. № 8. P. 948–952.
252. Particulate silver biocides and methods for biocide use in fracturing fluids / E. V. Barmatov, A. V. Medvedev, M. V. Barmatova. United States Patent 11/942839. 2008.
253. Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles / H. Yu et al. *J. Appl. Polymer Sci.* 2007. Vol. 103. № 1. P. 125–133.
254. Rentz Do., Comm Cnmo E. J. Viral pathogens and severe acute respiratory syndrome: oligodynamic Ag⁺ for direct immune intervention. *J. Nutr. Environ. Med.* 2003. Vol. 13. № 2. P. 109–118.
255. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu et al. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, Medicine.* 2007. Vol. 3. P. 95–101.
256. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the

observed toxicity / H. J. Johnston, G. Hutchison, F. M. Christensen et al. *Critical Rev. in Toxic.* 2010. Vol. 40. P. 328–346.

257. A case of generalized argyria after ingestion of colloidal silver solution / Y. Kim et al. *Am. J. Ind. Med.* 2009. Vol. 52. No. 3. P. 246–250.

258. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J. R. Morones et al. *Nanotechnology.* 2005. Vol. 16. No. 10. P. 2346–2353.

259. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / W. K. Jung et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74. No. 7. P. 2171–2178.

260. Use of aqueous silver to enhance inactivation of coliphage MS-2 by UV disinfection / M. A. Butkus et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. Vol. 70, No. 5. P. 2848–2853.

261. Препарати срібла : вчора, сьогодні і завтра / О. Б. Щербаков, Г. І. Корчак, О. В. Сурмашева та ін. *Фарм. журнал.* 2006. № 5. С. 45–57.

262. Наносеребро : технологии получения, фармакологические свойства, показания к применению / И. С. Чекман, Б. А. Мовчан, М. И. Загородный и др. *Препараты и технологии.* 2008. № 5. С. 32–34.

263. Aslan K., Holley P., Geddes C. D. Microwave-Accelerated Metal-Enhanced Fluorescence (MAMEF) with silver colloids in 96-well plates: application to ultra fast and sensitive immunoassays, high throughput screening and drug discovery. *J. Immunol. Methods.* 2006. Vol. 312. No. 1–2. P. 137–147.

264. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Coll. Interface Sci.* 2004. Vol. 275. No. 1. P. 177–182.

265. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds / H. H. Lara, E. N. Garza-Trevino, L. Ixtapan-Turrent, D. K. Singh. *J. of Nanobiotechnology.* 2011. Vol. 9. P. 30–37.

266. Біобезпечні наночастки металів в наномедицині та нанобіотехнології / З. Р. Ульберг та ін. *Вісн. пробл. біології та медицини.* 2010. Вип. 4. С. 72–77.

267. Дибкова С. М. Оцінка стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини при дії наночастинок золота і срібла. *Вісн. пробл. біології та медицини*. 2010. Вип. 3. С. 223–227.

268. Антимикробные свойства, фармакотоксикологические характеристики и терапевтическая эффективность препарата Арговит при желудочно-кишечных болезнях телят /Н. А. Шкиль и др. *Науч. журн. КубГАУ*. 2011. Вып.68 (04). С. 46. URL:<http://ej.kubagro.ru/2011/04/pdf/46.pdf>.

269. Крутяков Ю. А., Оленин А. Ю., Лисичкин Г. В. Наночастицы серебра, стабилизированные «Мирамистином»[®], — основа безопасных лекарственных средств высокой антибактериальной активностью. *Выставка инновац. проектов к 80-летию хим. фак. Моск. гос. ун-та : сб. тез.* М., 2009. С. 31. URL: <http://www.chem.msu.ru/rus/events/innov-project-ex-2009/31.pdf>.

270. Antimicrobial properties of silver-containing wound dressings: a microcalorimetric study/ М. А.О’Neill et al. *Int. J. Pharm.* 2003. Vol. 263. No. 1–2. P. 61–68.

271. Bornier C., Jeannin C. Clinical trials with ACTISORB — carried out on 20 cases of complex wounds. *Soins. Chir.* 1989. Vol. 99. P. 39–41.

272. Cassino R., Ricci E., Carousone A. Management of infected wounds: a review of antibiotic and antiseptic treatments [Poster presentation]. *10th European Wound Management Association Conf.* Dublin, 2001.

273. Lansdown A. B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr. Probl. Dermatol.* 2006. Vol. 33. P. 17–34.

274. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities / С. N. Lok et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007. Vol. 12. No. 4. P. 527–529.

275. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J. Cytotoxicity of nanoparticles of silver in mammalian cells. *Toxic. Sci.* 2005. 380 pp.

276. Володина Л. А., Ольховская И. П. К механизму токсического действия наночастиц меди на бактерии *Escherichia coli*. *Нанорозмірні системи: будова— властивості— технології: тези доп. II міжнар. конф. (Київ, 21–23 лист. 2007 р.)*. Київ, 2007. С. 441.

277. Аналіз колоїдних систем на основі наночастинок Cu-O-H₂O та Ag-O-H₂O, отриманих методом молекулярних пучків / Ю. А. Курапов та ін. *Доп. НАН України.* 2009. № 7. С. 176–181.

278. Kumar S. A., Chen S.-M. Nanostructured Zinc oxide particles in chemically modified electrodes for biosensor applications. *Anal. Lett.* 2008. Vol. 41. No. 2. P. 141–158.

279. Ершов Б. Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства. *Рос. хим. журн.* 2001. Т. XLV. № 3. С. 20–30.

280. Synthesis, structures, and magnetic properties of the copper(II), cobalt(II), and manganese(II) complexes with 9-acridinecarboxylate and 4-quinolinecarboxylate ligands / X. H. Bu et al. *Inorg. Chem.* 2005. Vol. 44. No. 26. P. 9837–9846.

281. Нанокпозиционные металлополимерные плёнки: сенсорные, каталитические и электрофизические свойства / Л. И. Трахтенберг и др. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2001. Т. 42. № 5. С. 325–331.

282. Наночастицы меди— биофункциональные агенты для клеток про- и эукариотов/ О. И. Богословская и др. *Нанорозмірні системи: будова — властивості — технології: тези доп. II міжнар. конф. (Київ, 21–23 лист. 2007 р.).* Київ, 2007. С. 413.

283. Iron, folate, vitamin B-12, zinc, and copper status in outpatients with Crohn's disease: effect of diet counseling / S. Imes et al. *J. Am. Diet. Assoc.* 1987. Vol. 87. № 7. P. 928–930.

284. Effects of gold compounds on the function of phagocytic cells. II. Inhibition of superoxide radical generation by tripeptide-activated polymorphonuclear leukocytes/ P. Davies et al. *Arthritis Rheum.* 1983. Vol. 26. No. 1. P. 82–86.

285. Intramuscular gold decreases cytokine expression and macrophage numbers in the rheumatoid synovial membrane / G. Yanni et al. *Ann. Rheum. Dis.* 1994. Vol. 53, No. 5. P. 315–322.

286. Potential oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum. / H. Y. Jia, Y. Liu, X. J. Zhang et al. *J. of the Am. Ch. Society.* 2009. Vol. 131. P.40–41.
287. Vischer T. L. Mechanism of action of gold compounds. *Wien. Klin. Wochenschr. Suppl.* 1984. Vol. 156. P. 17–18.
288. Burmester G. R., Barthel H. R. Mechanism of action of gold in treatment of rheumatoid arthritis. *Z. Rheumatol.* 1996. Vol. 55. No. 5. P. 299–306.
289. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis* / S. Tedesco, H. Doyle, J. Blasco et al. *Aquatic Toxic.* 2010. Vol.100. P. 178–186.
290. Polak G. M. Immunolabelling for electron microscopy. New York : Elsevier, 1984. 386 pp.
291. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects / A. M. Alkilany et al. *Small.* 2009. Vol. 5. No. 6. P. 701–708.
292. Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods / C. Sönnichsen et al. *Phys. Rev. Lett.* 2002. Vol. 88. No. 7. P. 077402-1–077402-4.
293. Gold nanocages: synthesis, properties, and applications / S. E. Skrabalak et al. *Acc. Chem. Res.* 2008. Vol. 41. No. 12. P. 1587–1595.
294. Hu J., Wang Z., Li J. Gold nanoparticles with special shapes: controlled synthesis, surface-enhanced Raman scattering, and the application in biodetection. *Sensors (Basel).* 2007. Vol. 7. No. 12. P. 3299–3311.
295. Чекман І. С., Дорошенко А. М., Загородний М. І. Металічні наноскорини – експериментально-клінічні основи. *Укр. мед. часоп.* 2009. № 2(70). С. 99–103.
296. Сумм Б. Д., Иванова Н. И. Коллоидно-химические аспекты нанохимии – от Фарадея до Пригожина. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия.* 2001. Т. 42. № 5. С. 300–305.
297. Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles / T. K. Sau et al. *J. Nanopart. Res.* 2001. Vol. 3. No. 4. P. 257–261.

298. Zhang Y. X., Zng H. C. Mesoscale spherical and planar organizations of gold nanoparticles. *Funct. Mater. Lett.* 2008. Vol. 1.No. 1. P. 43–53.
299. Jain K. K. The role of nanobiotechnology in drug discovery. *Drug Discov. Today*. 2005. Vol. 10. No. 21. P. 1435–1442.
300. Jain K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clin. Chim. Acta*. 2005. Vol. 358. No. 1–2. P. 37–54.
301. Penn S. G., He L., Natan M. J. Nanoparticles for bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. Vol. 7.No. 5. P. 609–615.
302. Thomas M., Klibanov A. M. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Vol. 100.No. 16. P. 9138–9143.
303. On the preparation, characterization, and enzymatic activity of fungal protease-gold colloid bioconjugates / A. Gole et al. *Bioconjug. Chem.* 2001. Vol. 12. No. 5. P. 684–690.
304. Esumi K., Takei N., Yoshimura T. Antioxidant-potentiality of gold-chitosan nanocomposites. *Coll. Surf. Biointerfaces*. 2003. Vol. 32. No. 2. P. 117–123.
305. On the interactions of free radicals with gold nanoparticles / Z. Zhang et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125.No. 26. P. 7959–7963.
306. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery / G. F. Paciotti et al. *Drug Deliv.* 2004. Vol. 11. No. 3. P. 169–183.
307. Endo T. Anti-bacterial and anti-fungal effect of several antirheumatic drugs. *Rheumatol. Europe*. 1995. Vol. 3. No. 24. P. 228.
308. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains / C. M. Goodman et al. *Bioconjug. Chem.* 2004. Vol. 15. No. 4. P. 897–900.
309. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity / E. E. Connor et al. *Small*. 2005. Vol. 1.No. 3. P. 325–327.

310. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview / R. Shukla et al. *Langmuir*. 2005. Vol. 21. No. 23. P. 10644–10654.
311. Ajayan P. M., Zhou O. Z. Drug delivery and bimolecular transport. *Carbon*. 2005. Vol. 43. P. 389–415.
312. Чекман І. С. Нанофармакологія: експериментально-клінічний аспект. *Лікар. справа*. 2008. № 3–4. С. 104–109.
313. Cabuil V. Magnetic nanoparticles. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* / Ed. by J. A. Schwarz, C. I. Contescu, K. Putyera. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008. Vol. 3. P. 1985–2000.
314. Huber D. L. Iron nanoparticles. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* / Ed. by J. A. Schwarz, C. I. Contescu, K. Putyera and ed. Boca Raton FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008. Vol. 3. P. 1681–1687.
315. Chemically prepared magnetic nanoparticles / M. A. Willard et al. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* / Ed. by H. S. Nalwa. Valencia, CA: Am. Sci. Publ., 2004. Vol. 1. P. 815–848.
316. New magnetic nanoparticles for biotechnology / A. Hütten et al. *J. Biotechnol.* 2004. Vol. 112. No. 1–2. P. 47–63.
317. Briley Saebok. Degradation, metabolism and relaxation properties of iron oxide particles for magnetic resonance imaging. *Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*. Vol. 1362. Uppsala, 2004. 92 pp. URL: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-4311>.
318. Structure and function of the vertebrate magnetic sense. / M. M. Walker et al. *Nature*. 1997. Vol. 390. P. 371–376.
319. Testing for the presence of magnetite in the upper-beak skin of homing pigeons / L. Tian et al. *BioMetals*. 2007. Vol. 20. No. 2. P. 197–203.
320. Formation of magnetite by bacteria and its application / A. Arakaki et al. *J. R. Soc. Interface*. 2008. Vol. 5. No. 26. P. 977–999.

321. Bacterial aerobic synthesis of nanocrystalline magnetite/ A. Bharde et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127. No. 26. P. 9326–9327.
322. Tartaj P. Nanomagnets for biomedical applications. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* /Ed. by H. S. Nalwa. Valencia, CA: Am. Sci. Publ., 2004. Vol. 6. P. 823–842.
323. Чекман І. С., Дорошенко А. М. Клініко-фармакологічні властивості наночастинок заліза. *Укр. мед. часоп.* 2010. № 3(77). С. 44–50.
324. Структура и магнитные свойства наночастиц на основе железа в оксидной оболочке / О. В. Толочко и др. *Письма в ЖТФ.* 2005. Т. 31. № 18. С. 30–36.
325. Molecular and cellular MR imaging / Ed. by M. M. J. Modo, J. W. M. Bulte. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2007. 440 pp.
326. Geraldes C. F., Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging.* 2009. Vol. 4. No. 1. P. 1–23.
327. An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application / Y. Sunet et al. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005. Vol. 285. No. 1–2. P. 65–70.
328. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*) : Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology / H. Li, Q. Zhou, Y. Wu et al. *Ecotoxic. and Env. Safety.* 2009. Vol. 72. P. 684–692.
329. Pharmacokinetic study of ferumoxytol: A new iron replacement therapy in normal subjects and hemodialysis patients / R. Landry et al. *Am. J. Nephrol.* 2005. Vol. 25. No. 4. P. 400–410.
330. Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study / L. F. Gamarra et al. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005. Vol. 289. P. 439–441.
331. Properties of iron oxide particles prepared in the presence of dextran / K. M. Lee et al. *Korean J. Chem. Eng.* 2002. Vol. 19. No. 3. P. 480–485.

332. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging / A. S. Arbab et al. *Radiology*. 2003. Vol. 229. No. 3. P. 838–846.

333. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells / A. Villanueva et al. *Nanotechnology*. 2009. Vol. 20. No. 11. P. 115–103.

334. Goya G. F., Grazú V., Ibarra M. R. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Curr. Nanosci*. 2008. Vol. 4. No. 1. P. 1–16.

335. Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection, particle size, and surface coating on labeling efficiency / L. Matuszewski et al. *Radiology*. 2005. Vol. 235. No. 1. P. 155–161.

336. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10 / I. Raynal et al. *Invest. Radiol*. 2004. Vol. 39. No. 1. P. 56–63.

337. Contrast-enhanced blood-pool MR angiography with optimized iron oxides: effect of size and dose on vascular contrast enhancement in rabbits / T. Allkemper et al. *Radiology*. 2002. Vol. 223. No. 2. P. 432–438.

338. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterization of a new class of contrast agents for MR imaging / R. Weissleder et al. *Radiology*. 1990. Vol. 175. No. 2. P. 489–493.

339. T1 effects of a bolus-injectable superparamagnetic iron oxide, SH U 555 A: dependence on field strength and plasma concentration — preliminary clinical experience with dynamic T1-weighted MR imaging / P. Reimer et al. *Radiology*. 1998. Vol. 209. No. 3. P. 831–836.

340. Hepatic lesion detection and characterization: Value of nonenhanced MR imaging, superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging, and spiral CT-ROC analysis / P. Reimer et al. *Radiology*. 2000. Vol. 217. No. 1. P. 152–158.

341. Evaluation of neck and body metastases to nodes with ferumoxtran 10-enhanced MR imaging: phase III safety and efficacy study / Y. Anzai et al. *Radiology*. 2003. Vol. 228. No. 3. P. 777–788.

342. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging of head and neck lymph nodes / M. G. Mack et al. *Radiology*. 2002. Vol. 222. No. 1. P. 239–244.

343. *In vivo* MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke / A. Saleh et al. *Brain*. 2004. Vol. 127. No. 7. P. 1670–1677.

344. Evaluation of a new ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agent Clariscan, (NC100150) for MRI of renal perfusion: experimental study in an animal model / R. Bachmann et al. *J. Magn. Reson. Imaging*. 2002. Vol. 16. No. 2. P. 190–195.

345. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents / J. A. Frank et al. *Radiology*. 2003. Vol. 228. No. 2. P. 480–487.

346. *In vivo* targeting of underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe / A. Moore et al. *Cancer Res*. 2004. Vol. 64. No. 5. P. 1821–1827.

347. Разработка магнитоуправляемой системы для доставки химиопрепаратов на основе наноразмерных частиц железа / А. И. Галанов и др. *Сиб. онкол. журн.* 2008. № 3(27). С. 50–57.

348. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting / C. Alexiou et al. *Cancer Res*. 2000. Vol. 60. No. 23. P. 6641–6648.

349. Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors / A. S. Lübbe et al. *Cancer Res*. 1996. Vol. 56. No. 20. P. 4686–4693.

350. Баснакьян И. А. Стресс у бактерий. М.: Медицина, 2003. 136 с.

351. Cold stress responses in mesophilic bacteria / J.-M. Panoff et al. *Cryobiology*. 1998. Vol. 36. No. 2. P. 75–83.

352. Работнова И. Л., Позмогова И. Н., Баснакьян И. А. Хемостатное и периодическое культивирование при изучении физиологии микроорганизмов. *Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Т. 11: Культивирование микроорганизмов.* М.: ВИНТИ, 1981. С. 3–54.

353. Алексахина Н. Н., Баснакьян И. А. Влияние стрессоров на белки наружной мембраны *Neisseria meningitidis* серогруппы В в процессе (периодического) культивирования (в биореакторе). *Вестн. РАМН.* 1999. № 11. С. 48–54.

354. Баснакьян И. А., Мельникова В. А. Стрессорные белки у бактерий. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1996. № 6. С. 99–103.

355. Баснакьян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М.: Медицина, 1992. 189 с.

356. Феофилова Е. П. Изменения в углеводном и липидном составе мицелия *Cunninghamella japonica* во время длительного высокотемпературного стресса. *Микробиология.* 1993. Т. 62. № 1. С. 62–69.

357. Рощина Е. К., Петров Л. И. Выделение белка во внеклеточное пространство как неспецифическая реакция *Escherichia coli* на стресс. *Микробиология.* 1997. Т. 66. № 2. С. 179–184.

358. Леонова І. С. Механізми накопичення ергостерину в клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в залежності від умов культивування : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.04. Харків, 2005. 19 с.

359. Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов: сб. статей / под ред. И. Л. Работновой. М.: Наука, 1980. 220 с.

360. Петровская В. И., Бондаренко В. М. Общие принципы генетического контроля патогенности бактерий. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1994. № 3. С. 106–110.

361. Ginnochio C., Pace J., Galán J.E. Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the

internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89. No. 13. P. 5976–5980.

362. Pace J., Hayman M. Y., Galán J. E. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell*. 1993. Vol. 72. No. 4. P. 505–514.

363. Finlay B. B., Ruschkowski S., Dedhar S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 1991. Vol. 99. No. 2. P. 283–296.

364. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis within spacious phagosomes / C. V. Apuche-Aranda et al. *J. Exp. Med.* 1994. Vol. 179. No. 2. P. 601–608.

365. Francis K. P., Gallagher M. P. Light emission from a Mudlux transcriptional fusion in *Salmonella typhimurium* is stimulated by hydrogenperoxide and by interaction with the mouse macrophage cell-line J774.2. *Infect. Immun.* 1993. Vol. 61, No. 2. P. 640–649.

366. *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages / A. J. Bäumlner et al. *Infect. Immun.* 1994. Vol. 62. No. 5. P. 1623–1630.

367. Konen-Waisman S., Fridkin M., Cohen I. R. Self and foreign 60-kilodalton heat shock protein T cell epitope peptides serve as immunogenic carriers for a T cell-independent sugar antigen. *J. Immunol.* 1995. Vol. 154. No. 11. P. 5977–5985.

368. Gulig P. A., Doyle T. J. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect. Immun.* 1993. Vol. 61. No. 2. P. 504–511.

369. Кузин А. М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. М.: Наука, 1986. 284 с.

370. Oxidative stress response in an anaerobe *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide / E. R. Rocha et al. *J. Bacteriol.* 1996. Vol. 178. No. 23. P. 6895–6903.

371. Tamarit J., Cabisco E., Ros J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, No. 5. P. 3017–3032.
372. Foster J. W., Spector M. P. How *Salmonella* survive against the odds. *Ann. Rev. Microbiol.* 1995. Vol. 49. P. 145–174.
373. Characterization of the *gor* gene of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 / M. Pebay et al. *Res. Microbiol.* 1995. Vol. 146. No. 5. P. 371–383.
374. González-Flecha B., Demple B. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1997. Vol. 179. No. 2. P. 382–388.
375. Laušová A., Ferianc P., Polek B. The effect of different oxidative challenge on growth and stress protein induction in *Escherichia coli*. *Biologia (Bratislava)*. 1999. Vol. 54. No. 6. P. 649–660.
376. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria / D. R. Sherman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Vol. 92. No. 14. P. 6625–6629.
377. Кассіч В. Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу : автореф. ... д-ра вет. наук : 16.00.03. Харків, 2004. 42 с.
378. Rocha E. R., Smith C. J. Regulation of *Bacteroides fragilis* *katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation. *J. Bacteriol.* 1997. Vol. 179. No. 22. P. 7033–7039.
379. ДСТУ ISO 13408-3:2006. Асептична обробка виробів призначених для охорони здоров'я. Ч. 3. Ліофілізація. 18 с.
380. Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования. Киев: Наук. думка, 1984. 264 с.
381. Иваница В. И., Рахимова Е. Л. Жизнеспособность лиофилизированных клеток *Mycoboccus xanthus* UCM 10041 и *Polyangium*

cellulosum UCM 10043 в присутствии различных антиоксидантов. *Мікробіол. журн.* 2002. Т. 64. № 5. С. 3–9.

382. Дубинина Е. Е., Пустыгина А. В. Окислительная модификация протеинов, её роль при патологических состояниях. *Укр. біохім. журн.* 2008. Т. 80. № 6. С. 5–18.

383. Бекер М. Е. Современные представления об анабиозе микроорганизмов. *Торможение жизнедеятельности клеток.* Рига : Зинатне, 1987. С. 9–19.

384. Бекер М. Е., Райпулис Е. П. Живая клетка и её жизнедеятельность. *Биотехнология.* М.: Агропромиздат, 1990. С. 7–41.

385. Рапопорт А. И., Марковский А. Б., Бекер М. Е. О повышении проницаемости внутриклеточных мембран при обезвоживании-регидратации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Микробиология.* 1982. Т. 51. Вып. 6. С. 901–904.

386. Rapoport A. I., Khroustalyova G. M., Kuklina E. N. Anhydrobiosis in yeast: activation effect. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1997. Vol. 30. No. 1. P. 9–13.

387. Тимошин А. А., Рапопорт А. И., Бекер М. Е. Влияние высушивания на термоиндуцированные структурные перестройки цитоплазматической мембраны клеток дрожжей. *Микробиология.* 1989. Т. 58. Вып. 4. С. 679–680.

388. Харчук И. А. Анабиоз: основные понятия и сопровождающие его процессы (обзор). *Экология моря.* 2005. Вып. 70. С. 62–78.

389. Dehydration as a yeast metabolism regulating factor /M. J. Beker et al. *Environmental regulation of microbial metabolism:proc. 23rdFEMS Symp. (Pushchino, USSR, 1–7 June 1983)* / Ed. by I. S. Kulaev, E. A. Dawes, D. W. Tempest. London: Acad. Press, 1985. P. 105–111.

390. Clegg J. S. Cryptobiosis — a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2001. Vol. 128. No. 4. P. 613–624.

391. Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 2001. Vol. 6. No. 9. P. 431–438.
392. Krallish I. L., Damberga B. E., Beker M. J. The effect of yeast dehydration on the activity of a number of enzymes of cell energetic metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986. Vol. 23. No. 6. P. 482–486.
393. Leder I. G. Interrelated effects of cold shock and osmotic pressure on the permeability of the *Escherichia coli* membrane to permease accumulated substrates. *J. Bacteriol.* 1972. Vol. 111. No. 1. P. 211–219.
394. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress / E. Bar et al. *J. Plant Physiol.* 1995. Vol. 146. No. 4. P. 527–534.
395. Natural antioxidant activity in some microalgal species / A. Perelman et al. *Israel J. Plant Sci.* 1998. Vol. 46. No. 2. P. 169–176.
396. Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме ткани при состояниях окислительного стресса. *Вопр. мед. химии.* 2001. Т. 47. № 6. С. 561–581.
397. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. М. : Наука, 2001. 343 с.
398. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и экспрессия генов. *Биохимия.* 2002. Т. 67. Вып. 3. С. 339–352.
399. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньшикова и др. М.: Слово, 2006. 556 с.
400. Dunlop R.A., Rodgers K.J., Dean R.T. Recent developments in the intracellular degradation of oxidized proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 33. N 7. P. 894–906.
401. Кения М. В. Динамика свободнорадикальных процессов и продуктов азотистого катаболизма в тканях системы крови при гипероксии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. Ростов н/Д, 1991. 19 с.

402. Oliver A. E., Crowe L. M., Crowe J. H. Method for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. *Seed Sci. Res.* 1998. Vol. 8. No. 2. P. 211–221.

403. Russel N. J., Fukunga N. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1990. Vol. 75. No. 2–3. P. 171–182.

404. Корогодін В. І. Проблеми пострадіаційного відновлення. М. : Атомиздат, 1966. 390 с.

405. Исследование прогностической роли активности энзимов антиоксидантной защиты в окислительной модификации белков после действия низкоинтенсивного ионизирующего излучения / Л. С. Старикович и др. *Лаб. диагностика.* 2008. № 1(43). С. 57–60.

406. Кенія М. В., Лукаш А. І., Гуськов Е. П. Роль низкомолекулярних антиоксидантів при окислювальному стресі. *Успехи совр. біології.* 1993. Т. 113. № 4. С. 456–470.

407. Рєзнїченко Л. С. Біохїмічні ефекти впливу наночастинок золота на прокаріотичні та еукаріотичні клітини : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.04. Київ, 2010. 148 с.

408. Melhus A. Silver treatments the use of antibiotics. N. Y., 2002. 180 pp.

409. Pumera M. Nanotoxicology: the molecular science point of view. *Chem. Asian. J.* 2011. Vol. 6. No. 2. P.340–348.

410. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee. Regulatory aspects of nanomaterials. SEC(2008) 2036 / Commission of the European Communities. Brussels, 17.6.2008. 11 pp. URL: https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/comm_2008_0366_en.pdf.

411. Santamaia A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology. *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 926. P. 1–12.

412. Nanotoxicology / K. Donaldson et al. *Occup. Environ. Med.* 2004. Vol. 61. No. 9. P. 727–728.
413. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation / C.-W.Lam et al. *Toxicol. Sci.* 2006. Vol. 77. No. 1. P. 126–134.
414. Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin / A. C. P. Elder et al. *Inhal. Toxicol.* 2000. Vol. 12, suppl. 4. P. 227–246.
415. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model / A. Nemmar et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. Vol. 166. No. 7. P. 998–1004.
416. Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology / K. E. Driscoll et al. *Am. J. Respir. Cell Mol. Bio.* 1990. Vol. 2. No. 4. P. 381–390.
417. Ferin J., Oberdörster G. Biological effects and toxicity assessment of titanium dioxides: anatase and rutile. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1985. Vol. 46. No. 2. P. 69–72.
418. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles / E. Bermudez et al. *Toxicol. Sci.* 2004. Vol. 77. No. 2. P. 347–357.
419. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles / E. Bermudez et al. *Toxicol. Sci.* 2002. Vol. 70. No. 1. P. 86–97.
420. Warheit D. B., Webb T. R., Reed K. L. Pulmonary toxicity studies with TiO₂ particles containing various commercial coatings. *Toxicol. Sci.* 2003. Vol. 72, Suppl. 1. P. 298–300.
421. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration / J. Wang et al. *Toxicol. Lett.* 2007. Vol. 168. No. 2. P. 176–185.

422. Строче А. А. Влияние наночастиц меди на активность индикаторных ферментов сыворотки крови при перкутанном введении лабораторным животным. *Бюл. мед.интернет-конф.* 2012. Vol. 2, No. 4. С. 180. URL: <https://medconfer.com/files/archive/2012-04/2012-04-2076-T-1412.pdf>.

423. Слободсков А. А. Влияние внутримышечного введения наноразмерных частиц меди на биохимические показатели крови самок крыс при гестации. *Совр. пробл. науки и образования.* 2014. № 1. С. 328. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=12071>.

424. Слободсков А. А., Демченко Т. Г. Влияние внутримышечного введения наноразмерных частиц меди на морфологические показатели самок крыс. *Теорет. и прикл. аспекты совр. науки.* 2014. № 5–1. С. 148–150. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=22833668>.

425. Fischer H. C., Chan W. C. Nanotoxicity: the growing need for *in vivo* study. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. Vol. 18. No. 6. P. 565–571.

426. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties / N. R. Yacobi et al. *Toxicol. In Vitro.* 2007. Vol. 21. No. 8. P. 1373–1381.

427. Müller R.H., Keck C.M. Drug delivery to the brain –realization by novel drug carriers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2004. Vol. 4. No. 5. P. 471–483.

428. Moghimi S. M., Hunter A. C., Murray J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001. Vol. 53. No. 2. P. 283–318.

429. Abraham G.E., Himmel P.B. Management of rheumatoid arthritis: rationale for the use of colloidal metallic gold. *J. Nutr. Environ. Med.* 1997. Vol. 7, No. 4. P. 295–305.

430. Abraham G.E., McReynolds S.A., Dill J.S. Effect of colloidal metallic Gold on cognitive functions: a pilot study. *Frontier Perspectives.* 1998. Vol. 7. No. 2. P. 39–41.

431. Hussain N., Jaitly V., Florence A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 50.No. 1–2. P. 107–142.

432. Thaxton C. S., Georganopoulou D. G., Mirkin C. A. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clin. Chim. Acta.* 2006. Vol. 363. No. 1–2. P. 120–126.

433. Smith D. K., Korgel B. A. The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods. *Langmuir.* 2008. Vol. 24. No. 3. P. 644–649.

434. Фармакологічний, токсикологічний і клінічний аспекти наномедицини / І. С. Чекман та ін. *Фармакол. та лікар. токсикол.* 2008. Т. 4. № 5. С. 3–9.

435. Banerji S. K., Hayes M. A. Examination of nonendocytotic bulk transport of nanoparticles across phospholipid membranes. *Langmuir.* 2007. Vol. 23. No. 6. P. 3305–3313.

436. Морфологические изменения во внутренних органах лабораторных животных при однократном введении наночастиц Fe / Н. А. Наволокин и др. *Изв. Саратов. ун-та. Сер. Физика.* 2011. Т. 11. № 2. С. 62–66.

437. Мильто И.В. Влияние наноразмерных частиц оксида железа на морфо-функциональное состояние внутренних органов крыс : дис. ... канд. биол. наук : 03.03.04 ; 03.01.04. Томск, 2010. 165 с.

438. Слюняева М.К. Изменение активности индикаторных ферментов сыворотки крови при подкожном введении наночастиц железа. *Бюл. мед. интернет-конф.* 2012. Т. 2. № 4. С. 181. URL: <https://medconfer.com/files/archive/2012-04/2012-04-2076-T-1413.pdf>.

439. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats / M.-T. Zhu et al. *Toxicology.* 2008. Vol. 247, No. 2–3. P. 102–111.

440. Safety of ferumoxytol in patients with anemia and CKD / A. Singh et al. *Am. J. Kidney Dis.* 2008. Vol. 52. No. 5. P. 907–915.

441. Galla J. H. Metabolic alkalosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000. Vol. 11, No. 2. P. 369–375.

442. The copper toxicosis gene product Murrldirectly interacts with the Wilson disease protein / T.Y.Tao et al. *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. No. 43. P. 41593–41596.

443. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: explanation of oral toxicity of nanocopper particles / H. Meng et al. *Toxicol. Lett.* 2007. Vol. 175. No. 1–3. P. 102–110.

444. Williams A. J. ABC of oxygen: assessing and interpreting arterial blood gases and acid-base balance. *BMJ.* 1998. Vol. 317. No. 7167. P. 1213–1216.

445. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells / L. Zhu et al. *Nano Lett.* 2007. Vol. 7. No. 12. P. 3592–3597.

446. Сергеев Б.М. Нанохимия металлов. Успехи химии. 2001. Т. 70. С. 915–934.

447. Colon J., Herrera L., Smith J. Protection from radiation induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2009. Vol. 5. P. 225–231.

448. Kipen H. M., Laskin D. L. Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005. Vol. 289. No. 5. P. L696–L697.

449. Decker T., Lohmann-Matther M.L. A quick and simple methods for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurement of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods.* 1998. Vol. 115. No. 1. P. 61–67.

450. Cook J. A., Mitchell J. B. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 179, No. 1. P. 1–7.

451. Коваленко Л. В., Фолманис Г. Э. Биологически активные нанопорошки железа. М. : Наука, 2006. 124 с.
452. Jurišić V., Bumbaširević V. *In vitro* assays for cell death determination. *Arch. Oncol.* 2008. Vol. 16. No. 3–4. P. 49–54.
453. Crouch S. Biocompatibility testing ATP bioluminescence. *Med. Device Technol.* 2000. Vol. 11. No. 8. P. 12–15.
454. Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 2005. Vol. 288. No. 2. P. 369–376.
455. Study on the role of inflammatory factors in the cardiovascular toxicity of PM_{2.5} / Y.-H. Zhang et al. *China Environ. Sci.* 2006. Vol. 26. No. 1. P. 16–19.
456. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells / S. M. Hussain et al. *Toxicol. In Vitro.* 2005. Vol. 19. No. 7. P. 975–983.
457. *In vitro* toxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells / L. Braydich-Stolle et al. *Toxicol. Sci.* 2005. Vol. 88. No. 2. P. 412–419.
458. Scherlinger M. Nanoecotoxicology: Environmental risks of nanomaterials. *Nature Nanotechnology.* 2008. Vol. 3. 322.;
459. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function *in vitro*: studies on viability, proliferation and inflammation / K. Peters et al. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004. Vol. 15. No. 4. P. 321–325.
460. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety / K. Donaldson. *Toxicol. Sci.* 2006. Vol. 92. No. 1. P. 5–22.
461. Toxic potential of materials at the nanolevel / A. Nel et al. *Science.* 2006. Vol. 311. No. 5761. P. 622–627.
462. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage / N. Li et al. *Environ. Health Perspect.* 2003. Vol. 111. No. 4. P. 455–460.
463. Shvedova A. A., Kisin E., Murray A. R. Exposure of human bronchial cells to carbon nanotubes caused oxidative stress cytotoxicity. *Proc. Soc. Free*

Radical Res. Meet. Eur. Sec (Ioannina, Greece, 26–29 June 2003). 2004. P. 91–103.

464. Garcon G., Dagher Z. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol. In Vitro*. 2006. Vol. 20.№ 4. P. 519–528.

465. Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 2001. Vol. 74. No. 1. P. 1–8.

466. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility / T. J. Brunner et al. *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40. No. 14. P. 4374–4381.

467. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂⁻ versus ¹O₂ / Y. Yamakoshi et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125. No. 42. P. 12803–12809.

468. Oxidative stress and NFκB activation in the lungs of rats: asynergistic interaction between soot and iron particles / Y.-M. Zhou et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003. Vol. 190. No. 2. P. 157–169.

469. Cytotoxic and genotoxic effects of single wall carbon nanotube exposure on human keratinocytes and bronchial epithelial cells / A. A. Shvedova et al. 227th *Am. Chem. Soc. Natl. Meet (Anaheim, CA, 28 March–1 April 2004): abstr.* 2004. URL: <http://oasys2.confex.com/acs/227nm/techprogram/P705375.HTM>.

470. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene / G. Jia et al. *Environ. Sci. Technol.* 2005. Vol. 39.No. 5. P. 1378–1383.

471. Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд) / І. С. Чекман та ін. *Довкілля та здоров'я*. 2009. Т. 48. № 1. С. 3–7.

472. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe. Strasbourg, 1986. 53 pp.

473. Стаття 26. Правила поводження з тваринами, що використовуються в наукових експериментах, тестуванні, навчальному процесі, виробництві біологічних препаратів. *Про захист тварин від жорстокого поводження* : Закон України від 21.02.2006 № 3447-15. URL : <http://zakon.rada.gov.ua/laws/3447-15>.

474. Council directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). *Off. J. Eur. Com.* 1986. Ser. L.No 358. P. 1–29.

475. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / под ред. А. В. Перцова. М.: Изд-во МГУ, 1976. 132 с.

476. Rawle A. Basic principles of particle size analysis. Malvern Instruments, 1994. UR: <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/application-notes/AN020710BasicPrinciplesPSA.aspx>.

477. ДСТУ 4483:2005. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибнової контамінації : на заміну ГОСТ 28085-89 ; чинний від 2005-11-25. Київ : Держспоживстандарт України, 2006. 20 с.

478. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов : утв. Главбиопромом Минсельхоза СССР 1.10.1980 г. М. : Профиздат, 1981. 34 с.

479. Роль Omi/HtrA2 в каспазозависимой клеточной гибели нейтрофилов человека / Н. Я. Маянский и др. *Цитокины и воспаление*. 2004. Т. 3. № 2. С. 47–51.

480. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry et al. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193.No. 1. P. 265–275.

481. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений : метод. реком. / А. Д. Дурнев и др. М., 2006. 27 с.

482. In situ detection of DNA damage. Methods and protocols / Ed. by V. V. Didenko. *Methods Mol. Biol.* 2002. Vol. 203. P. 1–299.
483. Collins A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004. Vol. 26.No. 3. P. 249–261.
484. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop / A. Hartmann et al. *Mutagenesis.* 2003. Vol. 18.No. 1. P. 45–51.
485. Use of alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations / A. Hartmann et al. *Mutagenesis.* 2004. Vol. 19.No. 1. P.51–59.
486. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing / S. Brendler-Schwaab et al. *Mutagenesis.* 2005. Vol. 20.No. 4. P.245–254.
487. Abu N. E., Mba K. C. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. *J. Toxicol. Environ. HealthSci.* 2011. Vol. 3.No. 2.P.44–51.
488. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях / Н. Н. Беляева и др.; под ред. Ю. А. Рахманина, Л. П. Сычевой. М.: Гениус. 2007. 312 с.
489. Cotelle S., Masfaraud J. F., Férard J. F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat. Res.* 1999. Vol. 426.No. 2. P. 167–171.
490. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) : учеб. пособ / под ред. М. И. Прохоровой. Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 272 с.
491. Fiske C. H., Subbarow J. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925. Vol. 66.No. 1.P.375–400.
492. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лаб. дело.* 1983. № 3. С. 33–36.
493. Арчаков А. И., Михосоев А. И. Модификация белков активным кислородом и их распад. *Биохимия.* 1998. Т. 54. № 2. С. 179–186.

494. Королюк М. А. Определение активности каталаз. *Лаб. дело*. 1988. № 1. С. 16–18.
495. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г. И. Клебанов и др. *Лаб. дело*. 1988. № 5. С. 59–62.
496. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии / И. П. Кондрахин и др. М. : Агропромиздат, 1985. 287 с.
497. Лабораторные методические исследования в клинике / под ред. В. В. Меньшикова. М. : Медицина, 1987. 90 с.
498. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довід. /В. В. Влізла та ін. ; за ред. В. В. Влізла. Львів : Сполом, 2012. 764 с.
499. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас та ін. ; за ред І. Я. Коцюмбаса. Львів : Тріада плюс, 2006. 360 с.
500. Жаров А. В., Иванов И. В., Стрельников А. П. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных : учеб.М.: Колос, 2000. 400 с.
501. Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих клітин : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держ. ком. вет. медицини України (протокол № 3 від 20.06.2009 р.) / С. М. Дибкова, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, А. М. Головка, В. О. Ушкалов, М. В. Бабкін, О. В. Годовський, Л. І. Акименко, О. А. Лаврик, Д. С. Тимченко, М. Є. Романько ; ДНКІБШМ. Київ, 2010. 23 с.
502. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів : декл. пат. на корис. модель 48540, Україна / С. М. Дибкова, О. В. Годовський, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. № u200909287 ; заявл. 10.09.09 ; опубл. 25.03.10, бюл. № 6. 5 с.

503. Артюхов В. Г., Наквасина М. А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами : учеб. пособ. Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2000. 296 с.

504. Методи оцінки інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та його регуляції у біологічних об'єктах : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держ. ком. вет. медицини України (протокол № 1 від 20.12.2007 р.) / Б. Т. Стегній, Л. В. Коваленко, М. Є. Романько, В. О. Ушкалов, С. П. Долецький, В. С. Бойко, Ю. М. Кротовська, Л. В. Матюша ; ННЦ «ІЕКВМ». Харків, 2009. 59 с.

505. Gel'man N.S. Respiratoin and Phosphorylation of Bacteria. Springer, 2014. 252 p.

506. Визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів, перспективних для біотехнологій / С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна, Л. С. Резніченко, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Біотехнологія*. 2009. Т. 2. № 3. С. 80–85.

507. Застосування методу ДНК-комет для визначення генотоксичності препаратів ветеринарних вакцин / С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна, Л. С. Резніченко, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Biopolymers and cell*. 2010. Vol. 26. No. 3. P. 200–204.

508. Оцінювання та контролювання біологічної безпеки наноматеріалів у ветеринарній медицині / А. М. Головка, В. О. Ушкалов, Л. С. Резніченко, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, З. Р. Ульберг. *Вісн. аграр. науки*. 2011. № 5. С. 24–28.

509. Романько М. Є. Фізіолого-біохімічні маркери безпечності наночасток металів на моделі ізольованих бактеріальних клітин роду *Salmonella*. *Біологія та валеологія : зб. наук. пр.* Харків, 2012. Вип. 14. С. 67–77.

510. Оценка генотоксических свойств наноматериалов ветеринарного назначения методом ДНК-комет *in vitro* / М. Е. Романько, С. Н. Дыбкова, Т. Г. Грузина, Л. С. Резниченко, З. Р. Ульберг, В. А. Ушкалов, А. Н. Головка.

Аграр. наука : журн. Межгос. совета по аграр. науке и инф-ции стран СНГ. 2010. № 1. С. 28–31.

511. Романько М. Є. Оксидативний стрес у мікроорганізмів. *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту.* 2005. Вип. 33. С. 317–327.

512. Романько М.Є. Біохімічні маркери безпечності наночастинок металів на моделі ізольованих субклітинних фракцій еукаріотів. *Reg. Mech. Biosyst.* 2017. Vol. 8(4). P. 564–568.

513. Романько М.Є. Рівень інтенсивності процесів переокиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* як біомаркер тестування біосумісності наночастинок металів. *Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна, серія Біологія.* 2017. Вип. 29. С. 19–33.

514. Оцінка генотоксичності та мутагенності наночастинок металів, перспективних компонентів ветеринарних нанонутрицевтиків / С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, О. Т. Куцан. *Vet. біотехнологія : бюл. Київ,* 2011. № 19. С. 61–69.

515. Gold nanoparticles genotoxicity / S. Dibkova, M. Roman'ko, T. Gruzina, L. Rieznichenko, V. Ushkalov, Z. Ulberg. *Ukrainian Biochem. J.* 2009. Vol. 81, No. 4, spec. iss. : VII Parnas Conf. on Biochem. and Molec. Biology (Yalta, Ukraine, 3–7 Oct. 2009). P. 291.

516. Інтенсивність мембранних процесів виробничих штамів роду *Escherichia* в умовах впливу наночастинок золота / М. Є. Романько, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов. *Укр. біохім. журн.* 2010. Т. 82, спец. вип. 4 : Матеріали X Укр. біохім. з'їзду (м. Одеса, 13–17 верес. 2010 р.). С. 304–305.

517. Metal nanoparticles: synthesis, properties, and application in medicine and veterinary / L. S. Rieznichenko, T. G. Gruzina, S. N. Dybkova, Z. R. Ulberg, M. E. Roman'ko, V. A. Ushkalov, I. S. Chekman. *Mediterranean-East-Europe*

Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed 2011 (Uzhgorod, Ukraine, 12–14 May 2011) : prog. and materials. Uzhgorod, 2011 P. 60–61.

518. Наноккомпозит металів, як потенційний компонент біопрепаратів і кормових добавок для тварин : декл. пат. на корис. модель 92804, Україна / М. Є. Романько, О. Л. Оробченко, О. Т. Куцан, В. О. Ушкалов. № u201401499 ; заявл. 17.02.14 ; опубл. 10.09.14, бюл. № 17. 6 с.

519. Токсико-біохімічна оцінка наночасток металів, як потенційних компонентів біопрепаратів і кормових добавок, за показниками безпеки в експериментах *in vivo* : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держветфітослужби України (протокол № 1 від 21.12.2012 р.) / О. Т. Куцан, М. Є. Романько, О. Л. Оробченко, Г. М. Шевцова, Р. В. Доценко ; ННЦ «ІЕКВМ». Харків, 2013. 40 с.

520. Куцан О. Т., Оробченко О. Л., Романько М. Є. Токсикокінетика Купруму в організмі щурів за умов тривалого введення наноккомпозиту металів (Ag, Cu, Fe та двоокис Mn) з кормом. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2015. Т. 17. № 1. С. 68–77.

521. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., Романько М. Е. Токсикокінетика заліза у крыс после внутривентриального введення наноккомпозита металлов в условиях острого эксперимента. *Аграр. наука : журн. Межгос. совета по аграр. науке и инф-ции стран СНГ.* 2013. № 7. С. 22–26.

522. Романько М.Є. Визначення біохімічних показників функціонального стану печінки в крові білих щурів за одноразового внутрішньошлункового введення суміші наночастинок металів (Ag, Cu, Fe, MnO₂). *ScienceRise: BiologicalScience.* 2017. Vol. 6(9). P. 14-22.

523. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., Романько М. Е. Токсикокінетика марганца в организме крыс после введения наноккомпозита металлов (Ag, Cu, Fe, двуокись Mn) с кормом в условиях хронического эксперимента. *Актуальн. вопр. вет. биологии.* 2014. № 1 (21). С. 57–64.

524. Оробченко А. Л., Романько М. Е., Куцан А. Т. Токсикологическая оценка наноккомпозита металлов (Ag, Cu, Fe и двуокись Mn) по уровню

биохимических маркеров крови крыс в условиях хронического эксперимента. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология : науч.-практ. журн.* 2014. № 3. С. 21–29.

525. Романько М.Є. Рівень показників імунної реактивності у крові щурів за умов одноразового внутрішньошлункового введення суміші наночастинок металів (Ag, Fe, Cu, двоокис Mn). *Біоресурси і природокористування. Біологія.* 2017. Т. 9. № 5–6. 68–79.

526. Оробченко О. Л., Романько М. Є., Куцан О. Т. Зміни коефіцієнтів маси внутрішніх органів у щурів після внутрішньошлункового введення нанокмпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. наук.-досл. конгр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок.* Львів, 2013. Вип. 14. № 1–2. С. 295–300.

527. Куцан О. Т., Оробченко О. Л., Романько М. Є. Клінічні та органічні зміни у щурів після внутрішньошлункового введення нанокмпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2013. № 22. С. 298–309.

528. Roman'ko M. Intensity of lipid oxidation and oxidativemodification of proteins in blood of rats under the conditions of chronic influence of mixture of nanoparticles of metals and tier macro-disperse analogue [Електронний ресурс]. *Наукові доповіді НУБіП України. Біологія, біотехнологія, екологія.* 2017. № 5(69). <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi>.

529. Ушкалов В. О., Головка А. М., Романько М. Є. Гармонізація нормативної бази для оцінювання біологічної безпеки наноматеріалів з метою їх реєстрації. *Етика нанотехнологій та нанобезпека : тез. доп. міжнар. семінару (м. Київ, Україна, 13 жовт. 2011 р.).* Київ, 2011. С. 54–55.

530. Куцан А. Т., Романько М. Е., Оробченко А. Л. Оценка безопасности и токсичности наночастиц металлов, как прототипов

ветеринарного нанонутрицевтика, по определению системных биомаркеров в экспериментах *in vitro* и *in vivo* *Materiály VIII mezinárodní věd.-prakt. konf. «Moderní vymoženosti vědy — 2012» (Praha, 27 ledna–05 února 2012 r.)*. Praha : Publ. House «Education and Science», 2012. Díl 22. Biologické vědy. Zeměpis a geologie. Zvěrolékařství. S. 84–87.

531. Біодоступність композиції наночасток Ag, Cu, Fe та двоокису Mn в організмі щурів за умов гострого токсикологічного експерименту / О. Т. Куцан, О. Л. Оробченко, М. Є. Романько, Р. В. Доценко. *Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів : зб. матеріалів наук.-практ. конф. (у рамках V міжнар. форуму «Комплексне забезпечення лабораторій»)* (м. Київ, 26–27 верес. 2012 р.). Київ, 2012. С. 93–95.

532. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., Романько М. Е. Токсикокинетика марганца в организме крыс после внутрижелудочного введения нанокompозита металлов (Ag, Cu, Fe, двуокись Mn) в условиях острого эксперимента. *Материалы IV съезда вет. фармакологов и токсикологов России «Актуал. вопр. вет. фармакологии, токсикологии и фармации»*. Воронеж : Истоки, 2013. С. 372–375.

533. Белоус А. М., Цветков Ц. Д. Научные основы технологии сублимационного консервирования. Киев : Наук. думка, 1985. 208 с.

534. Волков В. Я. К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах устойчивости микроорганизмов к замораживанию и высушиванию. *Микробиология*. 1994. Т. 63. Вып. 1. С. 5–16.

535. Емцева Т. В., Лаврова Л. Н., Константинова Н. Д. Влияние условий предварительного культивирования бактерий на их устойчивость и структуру клетки при замораживании и лиофилизации. *Микробиология*. 1991. Т. 60. Вып. 5. С. 879–889.

536. Спосіб отримання біомаси бактеріальних клітин сальмонел з використанням наночасток золота і срібла : декл. пат. на корис. модель 72608, Україна / М. Є. Романько, Б. Т. Стегній, О. В. Обуховська,

В. О. Ушкалов. № u201201110 ; заявл. 03.02.12. ; опубл. 27.08.12, бюл. № 16. 4 с.

537. Binarybacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins / H. Barth et al. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. Vol. 68. No. 3. P. 373–402.

538. Anthrax in humans and animals / World Organization for Animal Health, World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. 4th ed. China : WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2008. 208 pp.

539. Мачуський О. В. Удосконалення вакцин проти сибірки тварин та методів контролю їх якості : дис. ...канд. вет. наук :16.00.03. Київ, 2012. 151 с.

540. Спосіб отримання біомаси *Bacillus anthracis* з використанням наночастинок золота : декл. пат. на корис. модель 58450, Україна / А. М. Головка, В. О. Ушкалов, О. В. Мачуський, Л. С. Резніченко, М. Є. Романько, С. М. Дибкова, М. В. Бабкін. № u201011927 ; заявл. 08.10.10. ; опубл. 11.04.11, бюл. № 7. 2 с.

541. Романько М.Є. Вплив наночастинок металів на показники енергетичного метаболізму бактерійних клітин за їх ліофілізації і регідратації. *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. 2017. № 4(80). С. 24–31.

542. Романько М. Є., Ушкалов В. О., Головка А. М. Стрес у мікроорганізмів та вірулентність. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2006. № 8. С. 222–241.

543. Романько М. Є. Інтенсивність ліпопероксидації в мембранах бактеріальних клітин в оцінюванні ефектів стресу ліофілізації. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2008. № 13 (2). С. 214–223.

544. Романько М. Є., Андрущенко В. В. Вивчення ростових властивостей нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2009. № 14. С. 286–292.

545. Романько М. Є. Оцінка ефектів стресу ліофілізації за інтенсивністю ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів у мембранах клітин мікоплазм. *Біотехнологія*. 2009. Т. 2. № 2. С. 105–110.

546. Вплив наночастинок золота та срібла на АТФ-азну активність нативних і регідратованих клітин виробничих штамів *Escherichia coli* / М. Є. Романько, Л. С. Рєзніченко, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Укр. біохім. журн.* 2009. Т. 81. № 6. С. 70–76.

547. Романько М. Є., Ушкалов В. О., Андрущенко В. В. Інтенсивність дихання нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2009. Т. 11. № 1–2. С. 307–311.

548. Романько М. Є. Мембранотропний вплив наночастинок ауруму та аргентуму на інтенсивність окиснювальних процесів у клітинах *Escherichia* за умов їх ліофілізації/регідратації. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2010. Т. 12. № 2. С. 460–473.

549. Романько М.Є. Проліферативні властивості клітин періодичних культур *Salmonella* виробничих штамів за умов культивування у присутності наночасток металів. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2012. Т. 14. № 1–2. С. 618–623.

550. Романько М. Є., Рєзніченко Л. С. Наночастинки ауруму та аргентуму як потенційні кріопротектори за довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5. № 5. С. 100–108.

551. Roman'ko M. E. Physiological and biochemical mechanisms of contact interaction of nanoparticles of gold with *Bacillus anthracis* vaccine strain Sterne 34F2 cells. *J. Vet. Med. Biotech. Biosafety*. 2016. Vol. 2, iss. 3. P. 12–18.

552. Романько М. Є., Ушкалов В. О., Андрущенко В. В. АТФ-аза плазматичних мембран клітин тест-штамів мікоплазм за умов ефектів ліофілізації. *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту*. 2008. Вип. 56. С. 142–145.

553. Романько М. Є. Ефекти мікробіоцидної дії срібла. *Наук. вісн. вет. медицини*. 2010. Вип. 6 (79). С. 18–23.
554. Вплив наночасток металів на інтенсивність ростових процесів бактерій / М. Є. Романько, О. В. Кольчик, О. Т. Куцан, В. О. Ушкалов. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. наук.-досл. конгр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок*. Львів, 2011. Вип. 12. № 3, 4. С. 404–410.
555. Романько М. Є. Біологічні ефекти іонного і колоїдного (нанорозмірного) ауруму та його препаратів. Перспективи застосування. *Вет. медицина : міжвідом. темат. наук. зб.* Харків, 2011. Вип. 95. С. 74–77.
556. Metal nanoparticles as method of renovation of biological potential of cells of production strains of microorganisms under the conditions of lyophilization stress / M. Roman'ko, L. Rieznichenko, T. Gruzina, V. Ushkalov, A. Golovko. *Ukrainian Biochem. J.* 2009. Vol. 81, No. 4, spec. iss. : VII Parnas Conf. on Biochem. and Molec. Biology (Yalta, Ukraine, 3–7 Oct 2009). P. 309.
557. Roman'ko M. Ye., Reznichenko L. S., Ushkalov V. O. Membranotropic effect of metal nanoparticles on the bacterial cells under the condition of their lyophilization/rehydration. *Ukrainian-German Symp. on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Beregove, Crimea, Ukraine, 6th–10th Sept. 2010) : book of abstr.* 2010. P. 256.
558. Roman'ko M., Kolchik O., Uskalov V. The study of properties of nanoparticles bakteriotsidnyh Ag, Zn, Cu, Mn, Fe against *Pasteurellamultocida* and *Staphylococcus aureus*. *3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the Environment (Aix-en-Provence, France, 26–29 June 2012) : final prog. and abstr.* Washington, DC: ASM, 2012. P. 58.
559. Протективная роль наночастиц металлов в физиолого-биохимических механизмах репарационных процессов лиофилизированных/регидратированных клеток *Salmonella* / М. Е. Романько, Л. С. Резниченко, В. А. Ушкалов, М. В. Рубленко. *MateriályVIII mezinárodní věd.-prakt. konf. «Moderní vymoženostivědy— 2012» (Praha, 27 ledna–05 února 2012 r.)*. Praha :

Publ. House «Education and Science», 2012. Díl 22. Biologické vědy. Zeměpis a geologie. Zvěrolékařství. S. 87–90.

560. Романько М. Є. Рістстимулююча активність наночасток аргентуму щодо періодичних культур клітин ентеробактерій виробничих штамів. *Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів : зб. матеріалів наук.-практ. конф. (у рамках V міжнар. форуму «Комплексне забезпечення лабораторій»)* (м. Київ, 26–27 верес. 2012 р.). Київ, 2012. С. 110–111.

561. Романько М. Є. Застосування наночасток аурому в біотехнологіях отримання біомаси клітин ентеробактерій виробничих штамів після їх ліофілізації/регідратації. *Етика нанотехнологій та нанобезпека : тез. доп. II міжнар. семінару* (м. Київ, 10 жовт. 2012 р.). Київ, 2012. С. 57–59.

562. Романько М. Е., Мачусский А. В., Ушкалов В. А. Наночастицы золота в биотехнологиях культивирования биомассы *Bacillus anthracis* вакцинного штамма. *Биотехнология. Взгляд в будущее : материалы II междунар. науч. интернет-конф. (г. Казань, 26–27 марта 2013 г.)*. Казань, 2013. С. 294–297.

563. Roman'ko M. Ye. Protective effect of metal nanoparticles for generation of oxidation of lipids and proteins in membrane fractions of bacterial cells at lyophilization/rehydration. *23rd Int. Symp. «New Technologies in Contemporary Animal Production» (Novi Sad, Serbia, 19–21 June 2013) : proc.* P. 337–340.

564. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине : справ. пособ. / А. Н. Головкин, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрышник, Б. Т. Стегний, В. В. Герман, Л. В. Олейник, М. В. Бабкин, М. Е. Романько, Ю. А. Собко, Р. А. Кучерявенко, Н. Г. Пинчук, А. В. Скрышник, Т. Ю. Трускова, М. Р. Ковпак, О. А. Головкин, В. О. Коцимон, Д. А. Ордынская, Я. А. Древаль ; под ред. д-ра вет. наук, проф., акад. УААН А. Н. Головкин. Х. : НТМТ, 2007. 512 с.

565. Токсико-біохімічна оцінка нанометалів за системними маркерами при застосуванні у ветеринарній медицині / О. Т. Куцан, М. Є. Романько, О. Л. Оробченко, В. О. Ушкалов. Харків : НТМТ, 2016. 328 с.
566. Jia G., Wang H., Yan L. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, and fullerene. *Environ.Sci. Technol.* 2005. Vol.39. P. 1378–1380.
567. Zhao X., Liu R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomolecule levels. *Environ. Inter.* 2012. Vol. 40. P. 244–255.
568. DNA-binding by functionalized gold nanoparticles: mechanism and structural requirements / C. M. Goodman, N. S. Chari, G. Han et al. *Ch. Biology and Drug Design.* 2006. Vol. 67. P. 297–304.
569. Cytotoxicity investigation on cultured human blood cell treated with single-wall carbon nanotubes / O.Zeni, R. Palumbo, R. Bernini et al. *Sensors.* 2008. V. 8. P. 488–499.
570. Effect of single-walled carbon nanotubes on primary immune cells in vitro / J. Zhang, X. Ji, C. Liu et al. *Front. Mater. Sci. China.* 2008. V. 2. P. 228–232.
571. Matsuda S. Genotoxicity of colloidal fullerene C₆₀. / S. Matsuda, S. Matsui, Y. Shimizu, T. Matsuda. *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 1. P. 4133–4138.
572. Stable colloidal dispersions of C₆₀ fullerenes in water: evidence for genotoxicity / A. Dhawan, J.S. Taurozzi, A.K. Pandey et al. *Environ. Sci. Technol.* 2006. V. 40. P. 7394–7401.
573. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullerene in different cell lines / Y. Su, J.Y. Xu, P. Shen et al. *Toxicol.* 2010. V. 10. P. 155–159.
574. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes / J.G. Rouse, J. Yang, A.R. Barton, N.A. Monteiro-Reviere. *Toxicol. invitro.* 2006. V. 20. P. 1313–1320.
575. Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells / S. Hirano, Y. Fujitani, A. Furuyama, S. Kanno. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010. V. 249. P. 8–15.

576. Prathima S., Asha D.S. Adaptations in lactate dehydrogenase and isozymes in aging mammalian myocardium: Interaction of exercise and temperature. *Mech. of Ageing and Development*. 1999. Vol. 108. P. 61–75.

577. Dyomshina O.O., Ushakova G.O., Stepchenko L.M. The effect of biologically active feed additives of humilid substances on the antioxidant system in liver mitochondria of gerbils. *Reg. Mech. in Biosystems*. 2017. Vol. 8(2). P. 185–190.

578. Orally supplemented catechin increases heme amounts and catalase activities in rat heart blood mitochondria: A comparison between middle-aged and young rats. / Marni E.C., Muneaki T., Kenichi I., Kuniyasu O. *Exp. Gerontology*. 2013. Vol. 48(11). P. 1319–1322.

579. Серова Д., Таран О., Дьомшина О. Біологічна активність препаратів на основі гумінових речовин у печінці піщанок. *Вісн. Дніпр. ун-ту. Біологія, Екологія*. 2016. Т. 24(2). С. 410–415.

580. Marques G.L., Neto F.F., Oliveira C.A. Oxidative damage in the aging heart: An experimental rat model. *The Open Cardiovasc. Med. J.* 2015. Vol. 9. P. 78–82.

581. Patnaik L., Patra A.K. Haematopoietic alterations induced by carbaryl in *Clarias batrachus* (Linn.). *J. of App. Sci. and Environ. Management*. 2006. Vol. 10. P. 5–7.

582. Effects of dietary copper exposure on accumulation, growth, and hematological parameters in *Cyprinus carpio* / A.S.Al-Akel, H.F.Alkahem-Al-Balawi, F.Al-Misned et al. *Toxicol. and Environ. Ch.* 2010. Vol. 92. P. 1865–1878.

583. Levinsky R. Role of circulating immune complexes in renal diseases. *J. of Clin. Phathology*. 1981. Vol. 34. P. 1214–1222.

584. Хазанов А. И. Функциональная диагностика болезней печени. 2-е изд., перераб. и доп. М. : Медицина, 1988. 304 с.

585. Bono D. P. Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. *QJM*. 1994. Vol. 87. No. 8. P. 445–453.

586. Rosenberger G. Die klinische Untersuchung des Rindes / G. Dirksen, H.-D. Gründer, M. Stöber (Hrsg.). 3 Aufl. Berlin ; Hamburg : Paul Parey, 1990.S. 367–385.

587. Involvement of caspases and their upstream regulators in myocardial apoptosis in a rat model of selenium deficiency-induced dilated cardiomyopathy / H. Shan, R. Yan, J. Diaoe et al. *J. of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015. Vol. 31. P. 85–91.

588. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver / K. Begriche, J. Massart, M.-A. Robin et al. *J. of Hepatology*. 2011. Vol. 54. P. 773–794.

589. Cancer chemotherapy and hepatotoxicity: an update / M. Joshi, K. S. Sodhi, R. Pandey et al. *IndoAm. J. of Pharm. Research*. 2014. Vol. 4, N 6. P. 2976–2984.

590. Ramadori G., Cameron S. Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Ann. of Hepatology*. 2010. Vol. 9. No 2. P. 133–143.

591. Бабій С. О., Дьомшина О. О., Штеменко Н. І. γ -Глутамілтрансфераза в моделі канцерогенезу у щурів. *Вісн. Дніпр. ун-ту. Біологія, Медицина*. 2010. Вип. 1(1). С. 28–33.

592. Whitfield J. B. Gamma glutamyl transferase. *Critical Rev. in Clin. Lab. Sci*. 2001. Vol. 38(4). P. 263–355.

593. Glucose metabolism in fish / S. Polakof, S. Panserat, J. L. Soengas, T.W. Moon. *A Rev. J. of Comparative Physiology B*. 2012. Vol. 182. P. 1015–1045.

594. Moussa F. Early effects of C60 administration in Swiss mice: A preliminary account for in vivo C60 toxicity. *Fuel Energy Abstracts*. 1996. Vol. 37. P. 137.

595. [60] fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity / N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel et al. *NanoLett*. 2005. Vol. 5. P. 2578–2585.

596. Hyman J. Zimmerman Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver. – Lippincott : Williamsand Wilkins, 1999. 789 p.

597. АТФаза плазматических мембран бактерий в оценки токсичности тяжелых металлов / Т. Г. Грузина и др. *Микробиология*. 1997. Т. 66. № 1. С. 14–15.

598. Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. Роль мембранных процессов в накоплении Au(III) и Au(0) бактериями. *Укр. біохім. журн*. 1990. Т. 62. № 1. С. 76–82.

599. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction. / Y. Nakagawa, T. Suzuki, H. Ishii et al. *Arch. Toxicol*. 2011. V. 85. P.1429–1440.

600. Role of oxidative damage in toxicity of particulates / P. Møller, N.R. Jacobsen, J.K. Folkmann et al. *Free Radical Research*. 2010. Vol. 44, iss. 1. P. 1–46.

601. Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions. / H. Cornejo-Garrido, D. Kibanova, A. Nieto-Camacho et al. *Chemosphere*. 2011. Vol. 84. P. 1329–1335.

602. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. / Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau et al. *Small*. 2009. Vol. 5. P. 2067–2076.

603. Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspec*. 2003. Vol. 111. P. 455–459.

604. Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids surface science challenge for the 21st century. *Adv. Coll. Interface Sci*. 2007. Vol. 31. P. 167–174.

605. Функції металотіонеїнів на системи антиоксидантного захисту за дії кобальт- та цинквмісних нанокмпозитів на карася сріблястого *Carassius*

auratus gibelio / Г. І. Фальфушинська, Л. Л. Гнатишина, О. О. Турта та ін. *Укр. біохім. журн.* 2013. Т. 85. С. 52–61.

606. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes in vitro. / S. V. Prylutska et al. *Fullerene, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2008. Vol. 16. P. 698–705.

607. Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fulleranol C₆₀(OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress / R. Injac et al. *Pharm. Reports*. 2009. Vol. 61. P. 335–342.

608. Stoliar O. B., Falfushynska H. I. Metallothionein of aquatic animals as a biomarker: Coverage of vulnerability. *Global J. Env. Sci. Technology*. 2012. Vol. 2. N 5. P. 115.

609. Sutherland D. E., Summers K. L., Stillman M. J. Noncooperative metalation of metalothionein Ia and its isolated domains. *Biochemistry*. 2012. Vol. 51. P. 6690–6700.

610. Синтез, биологическая и фотокаталитическая активность зольей диоксида церия, стабилизированных цитрат-ионом. Наносистемы: физика, химия. / Т. О. Шекунова, Д. О. Гиль, О. С. Иванова и др. *Математика*. 2013. Т. 4. № 2. С. 83–89.

611. Davies K. J., Delsignore M. E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 9908–9913.

612. Davies K. J. A., Lin S. V. Oxidative denatured proteins are degraded by an ATP-independent pathway in *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* 1988. Vol. 5. N4. P. 225–236.

613. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. : Наука, 1972. 252 с.

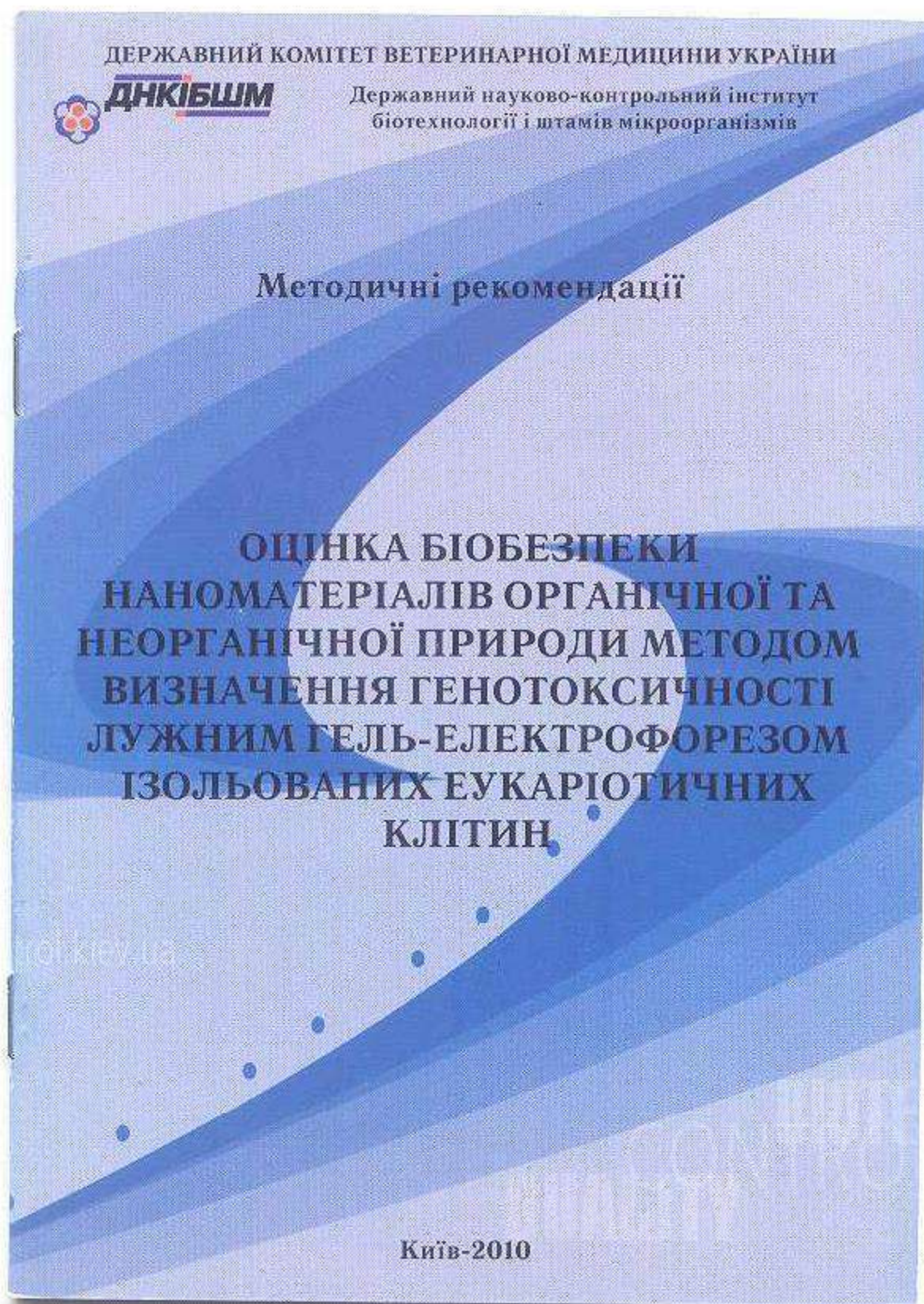
614. Перекисное окисление липидов и стресс / В. А. Барабой и др. СПб. : Наука, 1992. 148 с.

615. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І. Ф. Беленічев, Є. Л. Левицький, Ю. І. Губський та ін. *Совр. пробл. токсикології*. 2002. № 3. С. 24–31.

616. Transformations of nanomaterials in the environment / G. V.Lowry, K. B. Gregory, S. C. Apte, J. R. Lead. *Env. Science Technology*. 2012. Vol. 46. P. 6893-6899.

617. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles / B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris et al. *Science*. 2002. Vol. 298. P. 1759–1762.

ДОДАТОК А



Методичні рекомендації підготовлені к.б.н. Дибковою С. М., к.б.н. Грузіною Т. Г., д.х.н., проф. Ульберг З. Р. (Інститут біологічної хімії НАН України); акад. УААН, д.вет.н. Головком А. М., д.вет.н. Ушкаловим В. О., к.вет.н. Бабкіним М. В., к.вет.н. Годовським О. В., к.б.н. Акіменко Л. І., Лавриком О. А., Тимченком Д. С. (Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів); к.б.н. Романько М. С. (Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» УААН).

Рекомендовані для лабораторій науково-дослідних та практичних закладів, які займаються проблемами генотоксикології.

ДЕРЖАВНИЙ КОМІТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ УКРАЇНИ

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 1

засідання Науково-методичної ради Державного комітету
ветеринарної медицини України

23-24 грудня 2009 року

м. Київ

Присутні: 22 із 33 членів Ради

Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин.

Розробники: Дибкова С.М., Грузіна Т.Г., Ульберг З.Р. (Інститут біологічної хімії НАНУ), Головка А.М., Ушкалов В.О., Бабкін М.В., Головський О.В., Акіменко Л.І., Лаврик О.А., Тимченко Д.С. (ДНКІБІШМ), Романько М.С. (ННЦ «ЕКВМ»).

Рецензенти: Дерябін О.М. (ІВМ УААН), Абрамов А.В. (ДНДІЛДІВСЕ)

ПОСТАНОВИЛИ:

Запропоновані колективом науковців методичні рекомендації затвердити і прийняти до впровадження в практику ветеринарної медицини.

Прийнято одностайно членами Науково-методичної ради.

Заступник голови Науково-методичної
ради Державного комітету ветеринарної
медицини України, кандидат ветеринарних наук

В. М. Горжесь

Секретар

С.В. Трубка

ДОДАТОК Б





УКРАЇНА

(19) UA (11) 48540 (13) U

(51) МПК (2009)
G01N 33/00
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ГЕНОТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОМАТЕРІАЛІВ

1

(21) u200909287

(22) 10.09.2009

(24) 25.03.2010

(46) 25.03.2010, Бюл. № 6, 2010 р.

(72) ДИБКОВА СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА, ГОДОВСЬКИЙ ОЛЕКСІЙ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ, РОМАНЬКО МАРИНА ЄВГЕНІВНА, ГРУЗІНА ТАМАРА ГРИГОРІВНА, УЛЬБЕРГ ЗОЯ РУДОЛЬФІВНА, УШКАЛОВ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ГОЛОВКО АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ БІОКОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ ІМ. Ф.Д. ОВЧАРЕНКА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) 1. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів in vitro, що включає підготовку зразка для дослідження, вибір та підготовку тестової культури клітин, обробку суспензії культуральних клітин в інкубаційному середовищі досліджуваним зразком з наступним визначенням ступеня пошко-

2

дження ДНК методом "ДНК-комет", який відрізняється тим, що зразок для дослідження готують у формі водної дисперсії частинок наноматеріалу диспергуванням його у воді або шляхом синтезу частинок, які за хімічним складом і розмірами ідентичні частинкам наноматеріалу, як тестову культуру клітин використовують культуру клітин яєчника китайського хом'ячка CHO-K1 і обробку суспензії клітин дисперсією частинок проводять інкубуванням протягом 0,3-48 годин.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що максимальну кількість наноматеріалу для обробки суспензії клітин тестової культури визначають за показниками його цитотоксичності.

3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що мінімальну кількість наноматеріалу для обробки суспензії клітин тестової культури визначають за величиною імунізуючої дози.

Корисна модель належить до нанобіотехнології та токсикології, конкретно, до методів визначення біобезпеки речовин з використанням як індикатора ступеню ДНК-пошкоджень тестових культур клітин, і може бути використана для оцінки генотоксичності різних наноматеріалів органічної та неорганічної природи.

На сьогоднішній день в результаті бурхливого розвитку нанотехнологій створюється та застосовується цілий ряд наноматеріалів, які відрізняються за хімічною природою і складом (наноматеріали на основі вуглецю, металів, природних та синтетичних органічних і неорганічних сполук, нанокмпозити), формою і структурою частинок, що входять до їх складу (наносфери, фулерени, дендримери, наностержні та ін.), призначенням і сферами застосування (нанобіосенсиори, нанокапсули, нанопрепарати медичного та іншого призначення).

При всьому різноманітті наноматеріалів однією із найважливіших характеристик таких матеріалів є розмір частинок (1-100нм), що входять до їх складу. Завдяки таким розмірам наночастинки при контакті з живими клітинами можуть зв'язуватись з

білками, нуклеїновими кислотами, викликаючи утворення аддуктів ДНК, вбудовуватися в біологічні мембрани, проникати в клітинні органели та різносторонньо змінювати функції біологічних структур. При цьому характер біологічної дії, а також фізико-хімічні властивості наноматеріалів, значною мірою відрізняються від речовин у звичайному фізико-хімічному стані. Ці особливості вивчаються, з одного боку, з метою створення і корисного застосування наноматеріалів, а з іншого - для визначення і забезпечення їх біобезпеки, що особливо важливо для наноматеріалів, які призначені для введення в організм людини чи тварини (вакцини, лікарські препарати, біодобавки та ін.).

Важливим показником, який безпосередньо характеризує біобезпеку фактору зовнішнього середовища, є його генотоксичність. Серед відомих на даний час методів визначення генотоксичності найбільш придатним є метод лужного гелелектрофорезу ізольованих клітин або метод "ДНК-комет" [Применение метода щелочного гелелектрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетичес-

(13) U

(11) 48540

(19) UA

ких соединений // Методические рекомендации: Рос. акад. мед. наук, Рос. акад. сельскохоз. наук, М., 2006].

В основі методу лежить реєстрація відмінностей у рухливості в постійному електричному полі ДНК та можливих фрагментів ДНК клітин тестової культури, оброблених досліджуваною речовиною, а потім лізованих та іммобілізованих в агарозний гель. Рухаючись до аноду, ДНК формує електрофоретичний слід, що нагадує "хвіст комети", параметри якого залежать від рівня пошкодження молекули ДНК.

Для визначення генотоксичних властивостей хімічної речовини готують зразок для дослідження, вибирають та підготовлюють тестову культуру клітин і обробляють суспензію клітин в інкубаційному середовищі досліджуваною речовиною. Потім готують мікропрепарати для проведення гелелектрофорезу: оброблені клітини заключають в агарозний гель та наносять на підготовлені гелі-слайди (стандартні предметні скельця, покриті агарозним гелем). Після отвердіння клітини піддають лізису, при цьому відбувається дисоціація клітинних структур і вищеплювання хроматину в пори агарози. В результаті подальшої лужної денатурації ($pH > 13$) лужно-лабільні сайти ДНК реалізуються в одонитковій розриви. При електрофорезі ДНК у вигляді фрагментів та петель суперполімерних молекул рухається до аноду, формуючи "хвіст комети", ядром якої є порожнина, заповнена ДНК. Після завершення електрофорезу слайди нейтралізують, фіксують, фарбують та виконують мікроскопію з використанням флуоресцентного мікроскопа.

Для оцінки ДНК-пошкоджень в клітинах тестової культури під дією досліджуваної речовини визначають параметри отриманих зображень "комети": вимірюють "довжину комети", "діаметр голови" та "довжину хвоста" за допомогою мікрометричної лінійки, або використовують комп'ютерний аналіз цифрових зображень, який дозволяє визначити вміст ДНК в "кометі", долю матеріалу в її "голові" та "хвості".

Порівнюючи отримані показники ДНК-пошкоджень в мікропрепаратах клітин, оброблених дослідженою речовиною, з контрольними оцінюють її генотоксичні властивості.

Метод "ДНК-комет" характеризується високою чутливістю, інформативністю, не потребує великої кількості матеріалу і може бути застосований практично до любых клітин. Тому він рекомендований та застосовується для оцінки генотоксичних властивостей широкого кола природних та синтетичних сполук. Так, відомо застосування методу мікроелектрофорезу ДНК для вивчення наслідків впливу на геном солей важких металів на прикладі хлориду нікелю [В.Ю. Чернеко, Л.Л. Лукаш и др. Применение метода микроэлектрофореза ДНК для оценки генотоксических эффектов мутагенов в культуре гемопозитических клеток человека // Цитология и генетика. - 2004. - №1. - С.31-35]. Як модельну клітинну систему для тестування одониткових розривів в ДНК вибрали первинну культуру ембріональних гемопоетичних клітин людини. Клітини із абортивного матеріалу інкубували в по-

живному середовищі, виділяли культуру гемопоетичних клітин та визначали їх життєздатність. Потім в суспензію клітин додавали хлорид нікелю у вигляді водного розчину з концентрацією 500мкг/мл і інкубували протягом 24 годин. Отриману суспензію оброблених клітин використовували для приготування мікропрепаратів та подальшого виявлення пошкоджуючої дії хлориду нікелю на клітинну ДНК методом "ДНК-комет". Вивчення отриманих комп'ютерних зображень продемонструвало наявність великої кількості клітин з пошкодженою ДНК. При цьому автори зазначають високу чутливість методу мікроелектрофорезу ДНК гемопоетичних ембріональних клітин людини по відношенню до виявлення пошкоджень ДНК окремих клітин під дією хлориду нікелю.

При визначенні генотоксичності хімічних речовин відомим способом підготовка зразка для досліджень зводиться до приготування істинного розчину його в воді; в деяких випадках дозволяється застосування інших розчинників за умов їх нетоксичності. Рівень токсичності таких розчинів визначається не тільки природою хімічної речовини, але й, значною мірою, її концентрацією.

Враховуючи наведені вище особливості структури і властивостей наноматеріалів, рівень їх токсичності не можна зводити до токсичності істинних розчинів речовин, що входять до їх складу. Для об'єктивної оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалу необхідно забезпечити можливість взаємодії з клітиною безпосередньо частинок наноматеріалу та враховувати те, що наслідки такої взаємодії будуть залежати не стільки від кількості введеного в суспензію клітин наноматеріалу, скільки від особливостей його частинок і, насамперед, від їх розміру.

Автори корисної моделі, що пропонується, вирішували завдання вдосконалення, заснованого на методі "ДНК-комет" способу визначення генотоксичності, з метою його застосування для об'єктивної оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів з необхідною достовірністю.

Поставлене завдання вирішене тим, що у відомому способі оцінки генотоксичності *in vitro*, що включає підготовку зразка для дослідження, вибір і підготовку тестової культури клітин, обробку суспензії культуральних клітин в інкубаційному середовищі досліджуваним зразком та подальше визначення рівня пошкодження ДНК методом "ДНК-комет", у випадку визначення генотоксичних властивостей наноматеріалів відповідно до корисної моделі, що заявляється, зразок для досліджень готують у формі водної дисперсії частинок наноматеріалу шляхом диспергування його в воді, або отриманого шляхом синтезу частинок наноматеріалу за хімічною природою і розміром ідентичних частинкам, що входять до складу наноматеріалу, як тестову культуру клітин використовують культуру клітин яєчника китайського хом'ячка CHO-K1 і обробку суспензії клітин підготовленою дисперсією частинок проводять інкубуванням протягом 0,3-48 годин.

При визначенні генотоксичних властивостей наноматеріалу способом, який заявляється, тестову культуру клітин необхідно обробляти безпосе-

редньо наночастинками, що входять до його складу, тому підготовка відповідного зразка наноматеріалу для дослідження має дуже велике значення для отримання об'єктивних та достовірних результатів.

Підготовка зразка для дослідження може включатися у диспергування, якщо це можливо, наноматеріалу у воді відомими способами та при умові його однорідності за складом та розміром частинок. За умов значної неоднорідності частинок наноматеріалу за розмірами, необхідно попередньо виділити основну фракцію частинок та приготувати з неї водну дисперсію. Для визначення генотоксичності наноматеріалу, який складається з двох чи більше видів наночастинок різної хімічної природи, можна приготувати водні дисперсії частинок кожного виду, або частинок, які складають його основу, а також частинок, які можуть значною мірою визначати генотоксичність, виділивши їх із складу наноматеріалу.

В деяких випадках можливо вивчати генотоксичні властивості наноматеріалу з використанням в якості зразків спеціально отриманих з цією метою водних дисперсій частинок, які за хімічним складом та розмірами ідентичні частинкам наноматеріалу.

Як тест-об'єкт вибрали стандартизовану культуру клітин яєчника китайського хом'ячка СНО-К1, яка за результатами випробувань виявила високу чутливість до дії наноматеріалів як органічної так і неорганічної природи. Стандартизована культура клітин СНО-К1 є доступною для дослідників і зазвичай є наявною в банках культур лабораторій, що займаються проблемами генотоксикології.

Час обробки тестової культури клітин дисперсією частинок наноматеріалу вибирають в діапазоні 0,3-48 годин. В кожному конкретному випадку необхідний час контакту визначають експериментально, встановлюючи час досягнення максимального рівня акумуляції частинок клітинами за результатами вивчення кінетики цього процесу. У випадку наноматеріалів медичного (ветеринарного) призначення при визначенні тривалості контакту клітин тест-об'єкту з дисперсією частинок досліджуваного зразка приймають до уваги час їх терапевтичної дії при лікуванні, або більш тривалий час у відповідності з періодом знаходження в організмі препаратів іншого призначення (зазвичай це 24-48 годин).

Кількість досліджуваного матеріалу для введення у контакт із суспензією клітин, обирають, виходячи з відомої чи попередньо визначеної цитотоксичності *in vitro* або, беручи до уваги рекомендовану дозу чи величину добового споживання

наноматеріалу при його використанні. При цьому за максимальну кількість наноматеріалу, що вводиться, можна прийняти значення $\frac{1}{2} LC_{50}$ (із урахуванням впливу на осмотичний тиск інкубаційного середовища), а за мінімальну кількість прийняти, наприклад, добову терапевтичну дозу із розрахунку на 1кг маси тіла в перерахунку на 1л інкубаційного середовища. Інші значення цього параметру можна вибрати в 10 і 100 раз меншими за максимальне значення, або в 10 та 100 раз більшими за мінімальне. Можливо застосовувати також інший підхід до вибору адекватних кількісних параметрів (кількість наноматеріалу в одиниці об'єму інкубаційного середовища, маса наночастинок в одиниці об'єму дисперсії) процесу обробки культур клітин дисперсією частинок досліджуваного наноматеріалу.

Нижче приведені приклади застосування способу, що заявляється, для визначення генотоксичних властивостей наноматеріалів органічної та неорганічної природи.

Приклад 1.

Визначали генотоксичні властивості наноматеріалів, що містять наночастинки золота, які є основою наноматеріалу або компонентом, що може обумовлювати його токсичність. До таких матеріалів відносяться як монопрепарати складені тільки з наночастинок золота, так і комплексні препаративні, наприклад, біопрепарати та біодобавки медичного (ветеринарного) призначення, які поряд з компонентами білкової або іншої органічної природи містять наночастинки золота.

Генотоксичні властивості таких наноматеріалів можна визначати за результатами дослідження генотоксичності насамперед наночастинок золота.

Зразки для дослідження готували у формі колоїдного водного розчину металевого золота [Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / под ред. А.В. Перцова. - Москва: Изд-во МГУ, 1976. - С.128]. Методика дозволяє одержувати колоїдні розчини з однорідними за розміром частинками золота, варіюючи їх розмір у нанодіапазоні. За цією методикою одержували серію колоїдних розчинів з розміром частинок золота 10, 20, 30 та 45нм. Розмір наночастинок в кожному отриманому колоїдному розчині вимірювали за допомогою лазерно-кореляційного спектрометра Zetasizer-3 ("Malvern Instrument Ltd", Великобританія).

В таблиці наведено характеристику зразків для дослідження, що були отримані на основі вищезазначених колоїдних розчинів та розрізняються розміром частинок і концентрацією.

Таблиця

Характеристика	Позначення зразка							
	1	1p	2	2p	3	3p	4	4p
Розмір частинок, нм	10	10	20	20	30	30	45	45
Концентрація, мкг/мл	11,06	$11,06 \cdot 10^{-5}$	11,0	$11,0 \cdot 10^{-5}$	14,0	$14,0 \cdot 10^{-5}$	38,6	$38,6 \cdot 10^{-5}$

Як тестову культуру клітин використовували культуру клітин яєчника китайського хом'ячка СНО-К1 із колекції Державного науково-

контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Київ, Україна). Клітини культури СНО-К1 нарощували на середовищі F10 ("Sigma",

США), що містило 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби ("Gibco", США) в атмосфері, що містить 5% CO₂, при 37°C до титру 5·10⁵кл/мл. Кількість живих клітин, визначених за допомогою фарбування 0,3% розчином трипанового синього, складала не менш ніж 90%.

Визначення генотоксичності частинок золота в зразках, характеристику яких наведено у таблиці, здійснювали змішуючи 67мкл суспензії клітин СНО-K1 і 33мкл кожного зразка нанопрепарату при 37°C з наступним інкубуванням протягом 30 хвилин. Час обробки був визначений за результатами попередніх досліджень кінетики процесів акумуляції частинок золота клітинами тестової культури.

В експериментах із зразками 3 і 4 застосовували також метаболічну активацію з використанням мікосомальної фракції S9 печінки щурів, вміст якої в інкубаційній суміші складав 5%. Час інкубації - 3 години при температурі 37°C.

Позитивним контролем слугували клітини культури СНО-K1, оброблені N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1мМ протягом 48 годин. В якості негативного контролю були клітини в розчині диметилсульфоксиду.

Приготування мікропрепаратів клітин, оброблених досліджуваними зразками, а також клітин позитивного і негативного контролів, та їх дослідження проводили за звичайною схемою методу ДНК-комет: отримання гель-слайду, формування мікропрепарату, лізис, лужна денатурація, проведення електрофорезу, нейтралізація/фіксація, фарбування препарату, мікроскопічний аналіз.

Мікроскопію мікропрепаратів здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа ("ЛЮ-МАМ Р8", Росія). На кожен мікропрепарат аналізували не менш ніж 200 "ДНК-комет".

Комп'ютерну обробку отриманих цифрових зображень здійснювали за допомогою програми "COMET-CASP". При цьому визначали наступні параметри "комет": "довжина хвоста", "% ДНК в хвості", "момент хвоста".

Статистичну обробку результатів проводили по кожній експериментальній точці шляхом порівняння показників ушкодження ДНК в дослідній та контрольних групах. Критерієм позитивного результату слугував статистично достовірний відтворений ефект.

Отримані результати свідчать про те, що генотоксичність досліджуваних зразків препаратів золота дуже залежить від розмірів наночастинок і значно меншою мірою визначається кількістю наноматеріала, що контактує з клітинами при їх обробці.

Нижче на діаграмі (див. фігуру) наведені дані про величину ДНК-руйнуючої активності наночастинок в зразках 1, 1р, 2, 2р, 3, 3р, 4 і 4р порівняно з контрольними зразками негативним (к-) і позитивним (к+) за показником "% ДНК в хвості". Наведені також результати обробки клітин зразками 3 і 4 з використанням метаболічної активації (на діаграмі позначені як 3* і 4*).

Аналіз показників діаграми доводить, що за допомогою запропонованого способу можна визначати кількісні показники генотоксичних властивостей нанопрепаратів на основі золота з різним

розміром частинок в широкому діапазоні концентрацій.

Зразки з розміром частинок золота 30 і 45нм не виявляли генотоксичності, в тому числі і в дослідях з метаболічною активацією (їх показники є близькими до негативного контролю), в той же час для зразків з розміром частинок 10 і 20нм виявлено ефект генотоксичності для усіх досліджених концентрацій.

Приклад 2.

Визначали генотоксичні властивості інактивованої вакцини проти сказу та лептоспірозу собак.

Доза такої вакцини рекомендується виробником і є строго індивідуальною для собак різного віку та маси тіла.

Вказана інактивована вакцина є продуктом де-струкції клітин збудників хвороб і являє собою суміш частинок білкової природи (макромолекул білків та їх фрагментів) з середнім розміром 7-10нм. Тобто досліджувана вакцина є наноматеріалом ветеринарного призначення (нанопрепаратом).

Для визначення біобезпеки інактивованої вакцини актуальною є оцінка її генотоксичних властивостей в імунізуючих дозах, тому вміст її у зразку для дослідження визначали, виходячи з дози в розрахунку на 1кг маси тіла тварини, забезпечуючи такий же вміст в 1л інкубаційного середовища при обробці клітин тестової культури. Досліджували вакцину у товарній формі, пакувальна одиниця якої містила 1 дозу.

10мл суспензії тестової культури клітин яєчника китайського хом'ячка СНО-K1 в інкубаційному середовищі, характеристика та порядок підготовки якої наведені у Прикладі 1, змішували з 0,01мл зразка вакцини в концентрації, яка забезпечувала імунізуючу дозу, та витримували 24 години при 37°C. Тривалість контакту визначали за показником часу імунізуючої дії вакцини (24 години), який застосовують у ветеринарній практиці.

Кількість живих клітин, визначених за допомогою фарбування 0,3% розчином трипанового синього, складала 93%.

Позитивним контролем слугували клітини культури СНО-K1, оброблені розчином N-нітрозометилсечовини в концентрації 1мМ та інкубовані протягом 24 годин при 37°C до титру 5·10⁵кл/мл. Кількість живих клітин позитивного контролю, визначених за допомогою фарбування 0,3% розчином трипанового синього, складала 85%.

В якості негативного контролю виступали інтактні (не оброблені) клітини культури СНО-K1, нарізані при температурі 37°C протягом 24 годин до титру 5·10⁵кл/мл. Кількість живих клітин негативного контролю, визначених за допомогою фарбування 0,3% розчином трипанового синього, складала 96%.

В експериментах з метаболічною активацією використовували мікосомальну фракцію S9 печінки щурів, вміст якої в інкубаційній суміші при обробці тестових клітин зразком вакцини складав 5%. Час інкубації - 3 години, що було достатнім для прояву генотоксичних властивостей в цих умовах. Кількість живих клітин, визначених за допомогою фарбування 0,3% розчином трипанового

синього, складала 94%.

Одержання мікропрепаратів клітин тестової культури, оброблених досліджуванним зразком інактивованої вакцини, а також клітин позитивного і негативного контролів, їх дослідження та обробку результатів проводили як описано в Прикладі 1.

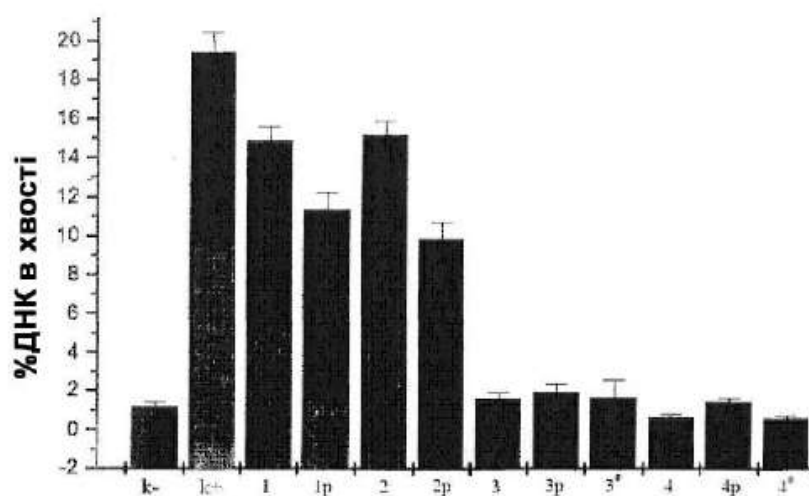
Як і у Прикладі 1, було одержано статистично достовірні відтворювані результати (аналізували до 200 "ДНК-комет"), які свідчать про те, що досліджувана інактивована вакцина проти сказу та лептоспірозу собак у імунізуючій дозі не проявляє генотоксичних властивостей: величина показника "% ДНК в хвості" складала 0,07% та 0,08% у дослідях з метаболічною активацією, що майже співпадає з аналогічною величиною негативного контролю

(0,014%) та є значно нижчою за показник "% ДНК в хвості" позитивного контролю (7,1%).

За такою схемою нами було також виконано дослідження більш ніж 10 ветеринарних вакцин.

Таким чином, наведені приклади застосування способу, що заявляється, демонструють можливість достовірного визначення генотоксичних властивостей наноматеріалів органічної та неорганічної природи.

Спосіб, що заявляється, є високоінформативним, експресним, достовірним та гуманним, оскільки не потребує використання лабораторних тварин, а реалізується в умовах *in vitro* на тестовій культурі клітин.



Фіг.

ДОДАТОК В

Українська академія аграрних наук
Національний науковий центр
«Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини»

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
«МЕТОДИ ОЦІНКИ ІНТЕНСИВНОСТІ ПЕРЕКИСНОГО
ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА ЙОГО РЕГУЛЯЦІЇ
У БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ»

Харків – 2009

Методичні рекомендації «Методи оцінки інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та його регуляції у біологічних об'єктах» розглянуто та схвалено методичною комісією Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ», м. Харків) УААН, протокол № 11 від «3» грудня 2007 р. та затверджено науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини МАП України протокол № 1 від « 20 » грудня 2007 р.

Автори:

Стегній Б.Т., док. вет. наук, проф., академік УААН; Коваленко Л.В., канд.біол.наук; Романько М.Є., канд. біол. наук; Ушкалов В.О., док. вет. наук; Долецький С.П., канд.вет.наук; Бойко В.С., мол. наук. спів.; Кротовська Ю.М., мол. наук. спів.; Матюша Л.В., мол. наук. спів.

Рецензенти:

Жегунов Г. Ф., проф., док. біол. наук, зав. кафедри хімії та біохімії ХДЗВА, м. Харків. Пащук Ю. Г., канд. вет. наук, ст. наук. спів. лабораторії безпеки та якості с.-г. продукції ННЦ «ІЕКВМ», м. Харків;

Методичні рекомендації встановлюють порядок і використання вимог до методів визначення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та стану його регуляції за оксидантно-антиоксидантними показниками у біологічних об'єктах, що застосовуються в лабораторній практиці ветеринарної медицини.

ДОДАТОК Д
РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ КОЕФІЦІЄНТІВ
МАСИ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ТА ВМІСТУ
МЕТАЛІВ У ОРГАНАХ ЩУРІВ, ЯКІ ОТРИМУВАЛИ
РІЗНІ ДОЗИ СУМІШІ ПРМЕ
І СУМІШ СОЛЕЙ ВІДПОВІДНИХ МЕТАЛІВ ЗА
УМОВ ГОСТРОГО ТОКСИКОЛОГІЧНОГО
ЕКСПЕРИМЕНТУ

Таблиця Д.1

Значення коефіцієнтів маси внутрішніх органів щурів, які отримували різні дози суміші NPMе і суміш солей відповідних металів на 1-шу і 3-тю добу експерименту (M±m; n=5)

Група тварин	Орган	Головний мозок	Серце	Селезінка	Печінка	Легені	Нирки
На 1-шу добу експерименту							
Контроль		0,91±0,06	0,42±0,02	0,46±0,04	4,04±0,09	0,98±0,06	0,83±0,02
I дослідна група суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла		0,87±0,05	0,47±0,02	0,46±0,03	3,98±0,27	0,86±0,05	0,90±0,02*
II дослідна група суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла		0,83±0,03	0,42±0,02	0,49±0,03	4,04±0,24	0,88±0,02	0,77±0,02
III дослідна група суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла		0,81±0,04	0,40±0,01	0,43±0,03	4,19±0,07	0,84±0,04	0,79±0,02
IV дослідна група NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла		0,85±0,05	0,39±0,01	0,50±0,01	4,55±0,16*2	0,84±0,01	0,83±0,03
V дослідна група суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла		0,81±0,02	0,42±0,02	0,38±0,03	4,38±0,14	0,83±0,05	0,82±0,05
На 3-тю добу експерименту							
Контроль		0,82±0,01	0,37±0,01	0,41±0,01	4,04±0,15	0,86±0,06	0,77±0,04
I дослідна група суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла		0,86±0,04	0,38±0,01	0,46±0,06	4,39±0,14	0,83±0,07	0,82±0,02
II дослідна група суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла		0,88±0,05	0,41±0,03	0,45±0,04	4,20±0,13	0,85±0,04	0,81±0,03
III дослідна група суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла		0,87±0,03	0,40±0,02	0,48±0,02*	4,09±0,16	0,88±0,04	0,77±0,03
IV дослідна група NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла		0,79±0,02	0,40±0,02	0,51±0,04*	4,02±0,16	0,86±0,06	0,86±0,06*
V дослідна група суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла		0,83±0,03	0,39±0,01	0,51±0,04*	4,46±0,12*	0,85±0,02	0,84±0,02*

Примітки: Суміш NPMе – розчин суміші наночастинок металів;* – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна при P<0,05 відносно його рівня в контрольних тварин.

Таблиця Д.2

Значення коефіцієнтів маси внутрішніх органів щурів, які отримували різні дози суміші NPMе і суміш солей відповідних металів на 7-му і 14-ту добу експерименту (M±m; n=5)

Група тварин	Орган	Головний мозок	Серце	Селезінка	Печінка	Легені	Нирки
На 7-му добу експерименту							
Контроль		0,78±0,03	0,36±0,01	0,39±0,01	4,16±0,13	0,79±0,01	0,79±0,02
I дослідна група суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла		0,76±0,04	0,38±0,02	0,56±0,04**	4,35±0,15	0,73±0,04	0,83±0,03
II дослідна група суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла		0,83±0,04	0,40±0,02*	0,49±0,03*	4,30±0,16	0,79±0,02	0,79±0,04
III дослідна група сумішNPMе, 1,0 мг/кг маси тіла		0,83±0,02	0,44±0,02**	0,50±0,03**	4,26±0,09	0,78±0,04	0,74±0,02
IV дослідна група NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла		0,81±0,01	0,39±0,02	0,50±0,04*	4,38±0,13	0,84±0,06	0,79±0,03
V дослідна група сумішNPMе, 4,0 мг/кг маси тіла		0,81±0,03	0,40±0,01*	0,53±0,04**	4,32±0,11	0,88±0,04*	0,78±0,02
На 14-ту добу експерименту							
Контроль		0,73±0,03	0,38±0,02	0,47±0,05	4,40±0,13	0,75±0,02	0,81±0,03
I дослідна група суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла		0,73±0,02	0,41±0,02	0,45±0,03	4,53±0,24	0,89±0,06*	0,79±0,03
II дослідна група суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла		0,70±0,03	0,39±0,01	0,40±0,03	4,17±0,08*	0,81±0,02*	0,77±0,02
III дослідна група сумішNPMе, 1,0 мг/кг маси тіла		0,76±0,02	0,39±0,01	0,45±0,04	4,50±0,18	0,91±0,05*	0,75±0,03*
IV дослідна група NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла		0,68±0,03	0,39±0,02	0,50±0,07	4,38±0,16	0,92±0,05**	0,82±0,03
V дослідна група сумішNPMе, 4,0 мг/кг маси тіла		0,76±0,04	0,42±0,02	0,50±0,02	4,42±0,08	0,81±0,04*	0,80±0,04

Примітки: СумішNPMе – розчин суміші наночастинок металів;* – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна при P<0,05 відносно його рівня в контрольних тварин;** – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна при P<0,01 відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Купруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NPMe і суміш солей металів на 1-шу добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (СумішNPMe, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NPMe, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NPMe, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NPMe, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	0,87±0,06	2,79±0,12***	1,13±0,13*	2,65±0,13***	1,96±0,05***	0,90±0,02
Тонкий кишечник	1,38±0,24	2,19±0,19*	1,18±0,04	2,26±0,16*	2,37±0,04*	2,02±0,09*
Товстий кишечник	4,09±0,23	4,29±0,32	2,99±0,05*	3,98±0,40	3,84±0,07	4,85±0,08*
Кров	не виявлено	0,06±0,001***	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Печінка	2,65±0,20	2,47±0,14	2,63±0,14	3,25±0,25*	3,95±0,23*	3,63±0,01**
Селезінка	0,70±0,03	0,41±0,04**	0,47±0,01**	0,82±0,001*	0,23±0,01***	не виявлено
Легені	0,74±0,05	0,42±0,02*	0,57±0,06*	0,73±0,06	1,63±0,26*	0,49±0,05*
Серце	4,62±0,10	4,06±0,12*	2,95±0,11***	3,87±0,09**	3,04±0,22**	3,68±0,14**
Нирки	4,07±0,06	5,08±0,10**	4,26±0,11	3,77±0,43	4,20±0,22	4,31±0,13
Шерсть+шкіра	1,12±0,02	2,24±0,08***	1,37±0,05	1,08±0,05	1,06±0,06	1,08±0,03

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Феруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NРМе і суміш солей металів на 1-шу добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NРМе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Ме, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NРМе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	47,05±0,66	54,64±0,34***	160,04±4,13***	48,43±1,07	104,41±2,78***	214,93±4,82***
Тонкий кишечник	35,25±0,64	33,03±0,24	66,17±0,31***	32,99±0,53	53,90±2,19**	43,63±1,48**
Товстий кишечник	157,90±0,43	153,91±3,85	99,47±2,96***	121,98±3,24***	174,43±3,40**	160,87±1,31
Кров	683,34±8,15	781,46±3,87***	895,08±5,88***	970,46±6,77***	847,54±6,29***	1013,57±7,19***
Печінка	105,47±1,03	178,11±2,21***	133,50±0,58***	104,90±1,15	125,52±2,58**	116,08±4,56
Селезінка	242,74±1,77	347,71±3,26***	346,45±1,02***	253,99±2,66*	303,81±1,76***	373,18±3,39***
Легені	141,32±19,00	146,34±1,42	123,51±0,91	138,54±1,20	120,42±0,79	132,13±1,86
Серце	72,69±0,29	105,00±0,67***	93,57±1,10**	94,64±0,52**	130,45±2,34***	137,10±1,43***
Нирки	56,57±0,47	75,46±0,90**	68,60±0,40*	50,88±1,15*	51,25±0,02*	51,20±0,96*
Шерсть+шкіра	22,18±0,03	22,78±0,35	16,60±0,31**	17,31±0,27***	29,14±0,46***	22,54±0,26

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Мангану в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NPMе і суміш солей металів на 1-шу добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	5,92±0,33	6,95±0,20*	16,05±0,56***	18,56±0,82***	23,15±0,67***	23,26±0,77***
Тонкий кишечник	4,79±0,20	3,20±0,21*	5,47±0,13**	7,37±0,12***	9,61±0,17***	8,13±0,23***
Товстий кишечник	38,11±0,67	35,57±1,10	34,50±1,40	39,64±1,28	38,88±0,99	39,15±0,81
Кров	не виявлено	0,16±0,01	1,23±0,02	0,21±0,04	0,28±0,02	не виявлено
Печінка	2,02±0,03	1,87±0,16	2,34±0,03*	2,39±0,02*	2,41±0,07*	2,88±0,19*
Селезінка	0,19±0,01	0,81±0,11**	0,87±0,08**	0,63±0,06**	0,93±0,04***	0,30±0,03*
Легені	0,15±0,01	0,04±0,002*	0,37±0,09*	0,68±0,07**	0,51±0,06**	0,32±0,04*
Серце	0,45±0,05	0,56±0,03	0,65±0,06	0,80±0,04**	0,29±0,02*	0,78±0,06*
Нирки	0,91±0,001	0,81±0,05	0,90±0,09	1,21±0,04*	0,79±0,11*	0,80±0,11*
Шерсть+шкіра	0,24±0,01	0,30±0,01*	0,17±0,03*	0,49±0,01***	0,40±0,03**	0,68±0,06**

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Купруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NРМе і суміш солей металів на 3-тю добу експерименту ($M \pm m$, $n=5$)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NРМе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Ме, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NРМе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	2,04±0,07	3,09±0,13**	3,68±0,16***	3,79±0,17***	4,28±0,34**	2,72±0,23*
Тонкий кишечник	1,06±0,001	0,82±0,09	0,19±0,01***	0,96±0,03	1,78±0,01***	0,95±0,01
Товстий кишечник	3,58±0,08	2,94±0,23*	1,84±0,19**	3,65±0,20	3,70±0,45	3,93±0,04*
Кров	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Печінка	2,05±0,06	2,17±0,04	1,81±0,11	2,33±0,08	2,92±0,10**	2,57±0,10**
Селезінка	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Легені	0,30±0,05	0,77±0,05**	0,24±0,01	0,49±0,07	-	0,26±0,04
Серце	2,12±0,17	0,99±0,14**	2,07±0,08	1,81±0,02***	2,69±0,16*	2,00±0,01
Нирки	3,59±0,13	6,00±0,24***	4,32±0,23	3,76±0,18	3,81±0,13	4,72±0,12**
Шерсть+шкіра	0,51±0,05	1,18±0,04***	1,39±0,15**	1,26±0,11**	1,67±0,03***	1,64±0,03***

Примітки: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Феруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NPMе і суміш солей металів на 3-тю добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	63,06±0,17	52,99±1,01***	60,40±1,25	57,22±1,27	89,39±1,06***	80,76±1,47***
Тонкий кишечник	30,90±0,54	27,35±1,28	23,41±0,21***	28,86±0,37	72,00±1,00***	35,58±1,02*
Товстий кишечник	131,39±4,97	106,20±2,08*	118,73±6,92	124,14±2,75	171,10±8,65*	203,20±0,95***
Кров	751,46±7,47	701,06±9,29*	826,96±10,10**	769,82±6,79	752,54±4,45	689,31±6,47**
Печінка	100,11±0,66	87,96±1,21**	99,66±1,71	127,02±1,95**	115,66±3,64*	111,88±4,10*
Селезінка	326,14±2,24	323,83±3,44	349,28±4,99*	389,82±9,98**	279,04±2,40***	323,11±0,50
Легені	114,39±0,66	111,76±1,13	128,02±1,55**	150,41±1,03***	138,09±0,60***	141,30±2,62***
Серце	84,43±0,79	93,18±1,94*	93,54±1,12**	87,27±1,12	108,71±0,87***	62,40±0,49***
Нирки	55,07±0,52	67,15±0,59***	47,85±0,98**	49,10±0,23***	53,45±0,35	64,57±2,13*
Шерсть+шкіра	20,77±0,29	18,42±0,44*	15,70±0,58**	16,88±0,35**	25,01±0,57**	15,43±0,61**

Примітки: * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Мангану в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NPMе і суміш солей металів на 3-тю добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	15,04±0,21	18,41±0,26***	14,93±0,41	17,19±0,37**	17,90±0,24***	18,67±0,25***
Тонкий кишечник	6,64±0,23	6,89±0,10	2,76±0,27***	6,16±0,23	6,38±0,14	8,31±0,10**
Товстий кишечник	40,62±0,84	41,37±0,85	38,75±2,22	45,14±2,09	42,57±2,26	47,29±0,20**
Кров	0,51±0,02	0,28±0,03**	0,52±0,10	0,28±0,01***	0,57±0,05	0,17±0,03**
Печінка	2,37±0,02	2,34±0,23	2,36±0,14	2,42±0,14	2,72±0,07**	2,15±0,03**
Селезінка	1,40±0,17	1,46±0,18	1,03±0,13	1,19±0,04	0,57±0,01**	1,12±0,08
Легені	0,32±0,01	0,54±0,08*	0,29±0,04	0,19±0,01**	0,22±0,03*	0,52±0,06*
Серце	1,16±0,17	0,94±0,11	0,58±0,03**	0,71±0,10*	0,97±0,09	0,28±0,01***
Нирки	0,92±0,05	1,62±0,14**	0,95±0,13	0,89±0,09	1,17±0,05*	0,82±0,13
Шерсть+шкіра	0,42±0,04	0,25±0,03*	0,40±0,03	0,44±0,08	0,59±0,05*	0,39±0,00

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Купруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NРМе і суміш солей металів на 7-му добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NРМе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Ме, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NРМе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	1,99±0,08	3,63±0,11***	3,37±0,15**	1,87±0,05	1,94±0,03	1,96±0,01
Тонкий кишечник	0,82±0,12	0,82±0,03	0,94±0,05	0,56±0,03*	0,63±0,03	0,73±0,01
Товстий кишечник	2,28±0,23	1,89±0,11	1,93±0,18	3,42±0,07**	1,77±0,12	3,44±0,18*
Кров	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Печінка	2,42±0,01	3,16±0,01***	2,48±0,26	2,34±0,14	2,87±0,07**	3,57±0,12***
Селезінка	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Легені	не виявлено	не виявлено	0,94±0,10***	не виявлено	не виявлено	0,50±0,02***
Серце	0,65±0,02	0,24±0,02***	0,46±0,03*	0,37±0,01***	не виявлено	не виявлено
Нирки	3,18±0,22	2,95±0,11	5,02±0,05**	3,73±0,19*	4,36±0,05**	2,96±0,14
Шерсть+шкіра	2,84±0,49	2,21±0,09**	0,58±0,01***	2,04±0,02**	2,46±0,09*	1,57±0,03***

Примітки: * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Феруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NРМе і суміш солей металів на 7-му добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NРМе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Ме, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NРМе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	72,42±0,22	65,61±2,42	67,98±0,90	88,87±1,98***	61,82±1,65**	63,02±2,18*
Тонкий кишечник	33,30±0,77	38,42±0,28**	38,11±0,94*	35,29±1,39	37,14±0,75*	96,04±5,32***
Товстий кишечник	147,13±2,54	143,91±1,02	127,99±4,60*	198,00±9,15**	125,10±5,69*	139,88±9,99
Кров	645,61±4,74	829,97±13,64***	815,59±4,74***	727,34±4,51**	752,14±6,11**	809,13±8,60***
Печінка	98,31±0,87	90,44±1,23**	106,46±4,21	100,78±3,42	92,09±1,50*	99,37±3,17
Селезінка	257,88±12,16	388,23±1,63***	290,27±2,10	317,32±2,79*	428,33±7,07***	350,37±2,94***
Легені	95,53±0,91	68,26±0,69***	118,0±0,59***	91,20±0,98	125,14±0,87***	130,85±1,45***
Серце	99,25±2,53	67,55±0,82***	48,72±0,97***	62,00±0,27***	54,58±1,06***	127,79±0,75***
Нирки	65,08±0,96	48,39±0,32***	69,26±0,35*	49,08±0,79***	69,69±0,23*	74,96±0,73**
Шерсть+шкіра	22,76±0,20	18,88±0,43**	9,90±0,22***	16,38±0,17***	20,72±0,37	20,45±0,50

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Мангану в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NPMе і суміш солей металів на 7-му добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	15,34±0,58	22,23±1,01**	20,17±0,42**	19,23±0,60**	16,09±0,44	22,91±0,89**
Тонкий кишечник	5,88±0,19	8,90±0,17***	10,67±0,22***	7,83±0,32**	7,77±0,05***	12,50±0,31***
Товстий кишечник	50,80±1,94	46,77±0,74	44,70±1,43	50,37±2,12	46,94±1,69	45,73±3,03
Кров	0,93±0,11	0,38±0,04**	0,43±0,01**	0,20±0,02**	0,42±0,01**	0,14±0,01**
Печінка	2,46±0,03	2,46±0,300	2,95±0,06**	2,01±0,04*	2,34±0,12	2,38±0,20
Селезінка	1,05±0,29	1,01±0,14	0,77±0,11*	0,75±0,06*	0,75±0,02*	0,26±0,01**
Легені	0,68±0,06	0,66±0,05**	0,12±0,01***	0,19±0,02***	0,65±0,02**	0,18±0,02***
Серце	0,67±0,03	0,54±0,02*	0,34±0,02***	0,31±0,02***	0,36±0,02***	0,44±0,01**
Нирки	1,11±0,06	1,05±0,17	2,12±0,10**	0,84±0,03*	0,72±0,02**	1,17±0,03
Шерсть+шкіра	0,49±0,04	0,90±0,01***	0,25±0,07*	0,61±0,05	0,95±0,10*	0,56±0,07

Примітки: * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Купруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NРМе і суміш солей металів на 14-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NРМе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Ме, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NРМе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	3,02±0,12	3,26±0,01	3,13±0,26	3,78±0,09**	2,14±0,21*	1,97±0,06**
Тонкий кишечник	1,24±0,08	2,26±0,06***	1,28±0,08	0,34±0,02***	0,61±0,02**	0,48±0,01**
Товстий кишечник	2,58±0,12	3,27±0,05**	2,44±0,13	2,92±0,06	2,40±0,10	2,70±0,13
Кров	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено	не виявлено
Печінка	2,93±0,02	3,21±0,03**	2,85±0,13	2,15±0,06**	2,62±0,04**	2,85±0,07
Селезінка	не виявлено	0,05±0,00***	не виявлено	0,10±0,01***	1,10±0,03***	не виявлено
Легені	0,95±0,05	0,74±0,05*	не виявлено	0,12±0,01***	1,08±0,01	0,74±0,02*
Серце	1,91±0,07	1,07±0,03***	1,65±0,02*	1,41±0,08***	1,64±0,01***	не виявлено
Нирки	4,89±0,07	6,18±0,19**	5,76±0,17**	5,39±0,05**	5,77±0,20*	5,89±0,08***
Шерсть+шкіра	3,05±0,04	2,24±0,06***	3,14±0,11	2,12±0,12**	1,73±0,07***	1,90±0,11***

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Феруму в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NРМе і суміш солей металів на 14-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NРМе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Ме, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NРМе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NРМе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NРМе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	68,85±2,69	78,37±1,28*	82,61±2,75*	63,58±2,49	90,72±2,06**	112,49±2,34***
Тонкий кишечник	47,92±1,12	48,75±1,28	45,03±0,27	34,44±0,69***	49,96±1,37	59,17±0,46***
Товстий кишечник	135,05±6,27	141,83±3,16	100,80±1,92**	190,22±0,11**	171,41±5,49*	104,34±4,60*
Кров	674,59±10,34	809,43±4,93***	779,41±6,38***	744,88±1,95**	781,84±5,04**	823,03±17,11**
Печінка	97,06±1,87	80,44±0,11**	94,26±4,30	95,52±1,35	78,96±1,20**	85,00±1,64*
Селезінка	273,37±1,22	215,71±0,61***	277,15±2,01	238,01±0,87***	264,71±4,92	274,91±10,36
Легені	130,40±2,12	123,00±0,73	126,92±1,27	107,16±0,08***	107,04±0,62***	113,02±0,49**
Серце	155,89±1,25	120,14±8,63*	36,18±0,22***	37,82±0,23***	47,44±0,33***	191,47±0,09*
Нирки	49,07±0,70	60,23±0,55***	53,99±1,49*	67,94±0,56***	61,10±0,63***	53,68±0,38**
Шерсть+шкіра	21,82±0,45	27,28±0,25***	18,32±0,36**	27,15±0,24***	19,88±0,33*	22,59±0,26

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

Вміст Мангану в органах і тканинах щурів, які отримали різні дози суміші NPMе і суміш солей металів на 14-ту добу експерименту (M±m, n=5)

Група тварин Орган, тканина	Контроль	I дослідна група (Суміш NPMе, 0,3 мг/кг маси тіла)	II дослідна група (Суміш солей Me, 0,3 мг/кг маси тіла)	III дослідна група (Суміш NPMе, 1,0 мг/кг маси тіла)	IV дослідна група (Суміш NPMе, 2,0 мг/кг маси тіла)	V дослідна група (Суміш NPMе, 4,0 мг/кг маси тіла)
Шлунок	21,97±1,44	16,60±0,77*	21,96±0,35	20,16±0,51	20,69±1,00	17,04±0,79*
Тонкий кишечник	13,73±0,48	13,60±0,43	12,50±0,19	5,11±0,05***	12,12±0,51	12,32±0,42
Товстий кишечник	44,25±1,81	45,77±1,01	38,18±1,06*	45,63±0,64	47,29±1,17	39,93±2,03
Кров	0,52±0,00	1,00±0,10**	0,31±0,00***	0,18±0,01***	0,25±0,01***	0,42±0,01**
Печінка	2,65±0,22	2,72±0,26	2,46±0,18	1,99±0,01*	2,33±0,16	2,54±0,13
Селезінка	0,18±0,01	0,54±0,08*	0,91±0,14**	0,88±0,02**	0,95±0,05***	0,85±0,01***
Легені	0,24±0,01	0,23±0,02	0,18±0,02	не виявлено	0,27±0,01	не виявлено
Серце	0,33±0,01	0,64±0,02***	0,34±0,04	0,37±0,04	0,58±0,01***	0,84±0,04***
Нирки	1,03±0,05	1,11±0,03	0,96±0,03	0,69±0,04**	0,94±0,07	0,67±0,05**
Шерсть+шкіра	0,59±0,03	0,93±0,02***	0,45±0,02*	0,77±0,05*	0,76±0,08*	0,48±0,01*

Примітки: * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – різниця значень показника у щурів дослідних груп вірогідна відносно його рівня в контрольних тварин.

ДОДАТОК Е





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92804** (13) **U**
 (51) МПК (2014.01)
 B01J 13/00
 C01G 49/00
 C10L 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ
 УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2014 01499</p> <p>(22) Дата подання заявки: 17.02.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.09.2014</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2014, Бюл.№ 17</p>	<p>(72) Винахідник(и): Романько Марина Євгенівна (UA), Оробченко Олександр Леонідович (UA), Куцан Олександр Тихонович (UA), Ушкалов Валерій Олександрович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): Романько Марина Євгенівна, вул. Луї Пастера, 322, кв. 176, м. Харків, 61176 (UA), Оробченко Олександр Леонідович, вул. Блюхера, 35/81, кв. 422, м. Харків, 61123 (UA), Куцан Олександр Тихонович, вул. Н. Ужвій, 80, кв. 196, м. Харків, 61195 (UA), Ушкалов Валерій Олександрович, вул. Антонова, 17, кв. 17, м. Київ, 03151 (UA)</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) НАНОКОМПОЗИТ МЕТАЛІВ, ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ КОМПОНЕНТ БІОПРЕПАРАТІВ І КОРМОВИХ ДОБАВОК ДЛЯ ТВАРИН**(57) Реферат:**

Наноккомпозит металів як потенційний компонент біопрепаратів і кормових добавок для тварин, що містить металеві наночастки, переважно сферичної форми, в якому розміри наночасток складають від 30 нм до 100 нм, метали вибрані з групи, що складається з срібла (Аргентуму), міді (Купруму), заліза (Феруму), оксиду марганцю (Мангану). Наночастки синтезовані за методом хімічної конденсації, та за умов дослідження *in vitro* на моделі субклітинних фракцій культури клітин СНО-К1 не проявляють загальної токсичності і генотоксичності та має наступний структурний, якісний та кількісний склад за співвідношенням компонентів, об'єм %:

колоїдний розчин наночасток Аргентуму (з концентрацією 1600,0 мкг/см³ за металом, середнього розміру (~31,5±0,9) нм) - 0,625 %;

колоїдний розчин наночасток Феруму (з концентрацією 10000,0 мкг/см³, (-100,0±10,0) нм) - 0,100 %

колоїдний розчин наночасток двоокису Мангану (з концентрацією 2785,0 мкг/см³, (-50,0±3,0) нм) - 0,359 %;

колоїдний розчин наночасток Купруму (з концентрацією 2560,0 мкг/см³, (-70,0±5,0) нм) - 0,391 %;

вода дистильована - 98,525 %.

UA 92804 U

UA 92804 U

Корисна модель належить до області нанобіотехнологій, а саме до використання нанотехнологій у ветеринарній медицині та тваринництві для підвищення продуктивності та якості сільськогосподарської продукції.

Відомий колоїдний розчин металу, що містить частинки сполук рідкоземельного елемента, кислоти і розчинник, вибраний з неполярних вуглеводнів, причому щонайменше 90 % часток є монокристалічними, а сама дисперсія може бути отримана реакцією солі рідкоземельного елемента з дугою в лужному середовищі (Патент РФ №2242275. Органическая коллоидная дисперсия монокристаллических частиц соединения редкоземельного элемента. МПК 1301J13/00, C10L1/10. Оpubл. 2004.12.20).

Недоліком відомого колоїдного розчину є обмежена область застосування, що належить до присадок до палива для двигунів внутрішнього згорання.

Найбільш близьким аналогом до того, що заявляється, є колоїдний розчин наночасток металу або суміші металів (Патент України № 27080, МПК B01J 13/00, C01G 49/00, C10L 10/00 (2007) / Колоїдний розчин наночасток металу або суміші металів [Текст] / Косінов М.В., Каплуненко В.Г. Заявник і власник патенту Косінов М.В., Каплуненко В.Г.; заявл. 10.07.2007. - № у 2007 07776; опубл. 10.10.2007. - Бюл. № 16.-3 е.), що містить металеві наночастки, в якому розміри наночасток складають від 1 нм до 100 нм, метали вибрані з групи, що складається з срібла, золота, платини, паладію, міді, родію, ірідію, нікелю, заліза, марганцю, ванадію, вольфраму, молибдену, кобальту, танталу, титану, алюмінію, магнію, цинку, олова. Металеві наночастки мають переважно сферичну форму, мають електричний поверхневий заряд, а молекули діелектричної рідини наелектризовані і утворюють оболонки навколо металевих наночасток.

Основним недоліком цього колоїдного розчину є використання металів у нанорозмірній формі, що можуть мати генотоксичні властивості (Кобальт, Цинк та ін.), що унеможливує використання його у ветеринарній медицині та тваринництві.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити наноконпозиційну суміш металів (НкМе) для застосування у тваринництві та ветеринарній медицині, що відрізняється дослідженням загальної токсичності наночасток металів за умов *in vitro* на моделі субклітинних фракцій культури клітин CHO-K1, визначенням їх geno- і загальнотоксичних властивостей за умов *in vitro* та включає використання суміші колоїдних розчинів наночасток Аргентуму, Феруму, двоокису Мангану та Купруму, які мають сферичну геометрію, синтезовані за методом хімічної конденсації і в розмірному діапазоні (27,0-100,0) нм за наступного співвідношення компонентів, об'єм%:

Колоїдний розчин наночасток Аргентуму (з концентрацією 1600,0 мкг/см³ за металом, середнього розміру (-31,5±0,9) нм) - 0,625 %;

Колоїдний розчин наночасток Феруму (з концентрацією 10000,0 мкг/см³, (-100,0±10,0) нм) - 0,100 %

Колоїдний розчин наночасток двоокису Мангану (з концентрацією 2785,0 мкг/см³, (-50,0±3,0) нм) - 0,359 %;

Колоїдний розчин наночасток Купруму (з концентрацією 2560,0 мкг/см³, (-70,0±5,0) нм) - 0,391 %;

Вода дистильована - 98,525 %.

Порівняльний аналіз технічного рішення з прототипом дозволяє зробити висновок, що спосіб, який заявляється, відповідає критерію "новизна".

Наноконпозиційну суміш металів (НкМе) склали за результатами визначення geno- та загальнотоксичної дії таких наночасток (NP) металів - Аргентуму, Феруму, двоокису Мангану, Купруму, гексаціаноферату Кобальту, Кобальту та Цинку на моделі ізольованих субклітинних фракцій тест-культури клітин CHO-K1. Дослідні зразки NP металів синтезовані за методом хімічної конденсації [Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / под ред. А.В. Перцова. - М.: Изд-во МГУ, 1976. - 132 с.] та мають сферичну геометрію

Приклад 1. Визначення генотоксичності дослідних зразків наночасток металів за методом лужного гель-електрофорезу ("ДНК-комет") на моделі еукаріотичних тест-клітин CHO-K1.

Визначення генотоксичних властивостей наночасток металів здійснювали за методом лужного гель-електрофорезу еукаріотичних клітин яєчника китайського хом'ячка CHO-K1 [Didenko, V. Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols [Текст] / Edited by Vladimir V. Didenko. - Humana Press, 2002. - V. 203. - 279 p.]. Клітини культури CHO-K1 нарощували на середовищі F10 ("Sigma", США), що містить 5 % ембріональної сироватки ВРХ ("Gibco", США) до титру (5 10⁵)кл/см³. Кількість живих клітин, визначених за допомогою фарбування 0,3 % розчином трипайсового синього, складала не менш ніж 90 %.

Визначення генотоксичності NP металів здійснювали у реакційній суміші, що містить 67 мкл суспензії тест-клітин і 33 мкл NP за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Час інкубації клітин CHO-K1 із зразками NP металів складав 18 год. "Позитивним" контролем вважали клітини CHO-K1, оброблені N-нітрозометилсечовиною (тест-мутаген) в концентрації 1 мМ протягом 48 год.;

5 "негативним" контролем - клітини CHO-K1 в розчині ДМСО.
Для фарбування мікропрепаратів "ДНК-комет" використовували флуоресцентний барвник акридиновий жовтогарячий.

10 Флуоресцентну мікроскопію мікропрепаратів здійснювали за умов: збуджуючий фільтр 490 нм, дихроїчне дзеркало 510, відтинаючий фільтр 530 нм, збільшення $\times 200-400$. На кожний мікропрепарат аналізували не менш ніж 100 "ДНК-комет" без накладень "хвостів".

Аналіз "ДНК-комет" проводили візуально. При цьому "ДНК-комети" розподіляли на п'ять умовних типів із відповідним для кожного числовим значенням від 0 до 4. Ступінь пошкодження ДНК при цьому виражали як індекс "ДНК-комет" ($I_{\text{ДНК}}$), який обчислювали за формулою 1:

$$I_{\text{ДНК}} = \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{\Sigma} \quad (1)$$

15 де $n_0 - n_4$ - число "ДНК-комет" кожного типу,

Σ - сума "ДНК-комет".

Експерименти виконані в 6 повторах та у двох паралелях.

20 Статистичну обробку результатів проводили по кожній експериментальній точці шляхом порівняння показників ушкодження ДНК в дослідній та контрольних групах. Критерієм позитивного результату слугував статистично достовірний відтворюваний ефект.

25 Результати дослідження генотоксичності NPCo, гексаціаноферату NPCo і NPZn свідчать про наявність такої властивості у даних наночастинок у всьому вивченому концентраційному діапазоні. Так, клітини лінії CHO-K1, оброблені такими дискретними наночастинами, фіксували наявність первинних ДНК-пошкоджень. На фіг. 1 зображено приклади типових пошкоджень "ДНК-комет" завдяки генотоксичного впливу NPCo (фіг. 1, А) і NPZn (фіг. 1, Б).

30 Значення індексу "ДНК-комет", який характеризує рівень пошкоджень генетичного апарату еукаріотичних клітин, сягає значень, що близькі до таких у "позитивному" контролі (табл. 1). Таким чином, дослідні зразки гексаціаноферату NPCo, саме NPCo і NPZn проявляють гепотоксичну дію щодо ізольованих тест-клітин CHO-K1 у діапазоні концентрацій $(0,12-830,00)$ $\text{мкг}/\text{см}^3$ за металом, тобто вони є небезпечними. Наночастки таких металів можуть бути промутагенами і впливати на генетичний апарат клітин з подальшим утворенням ДНК-аддуктів, алкільованої ДНК тощо.

35 Дослідження генотоксичності NPCu, NPFe, NPAg та двоокису NPMn показало відсутність для них такої властивості у всьому вивченому концентраційному діапазоні. Так, в зразках еукаріотичних клітин CHO-K1, оброблених такими дискретними наночастинами, не реєстрували первинних ДНК-пошкоджень. На фіг.2 проілюстровано типове зображення непошкодженої ДНК клітин лінії CHO-K 1 на прикладі впливу NPFe.

40 Значення індексу "ДНК-комет" сягають таких у "негативному" контролі та становлять у середньому $(0,010 \pm 0,001)$ % (табл. 1). Тобто, дослідні зразки NPCu, NPFe, NPAg та двоокису NPMn в вивченому концентраційному діапазоні можна вважати біобезпечними.

Приклад 2. Визначення загальної токсичності дослідних зразків наночастинок металів за біохімічними маркерами на моделі ізольованих фракцій тест-клітин CHO-K1.

45 Дослідження загальної токсичності дослідних зразків NP металів проводили, використовуючи біохімічні маркери - активність АТР-ази (КФ 3.6.3.6) та лактатдегідрогенази (ЛДГ-аза, К Ф 1.1.1.27), - на моделі субклітинних фракцій еукаріотичних клітин CHO-K 1.

Для цього проводили преінкубацію зразків NP металів протягом 3 хв з препаратами сумарної мембранної фракції тест-клітин (кінцева концентрація білка - $(150-200)$ $\text{мкг}/\text{см}^3$) у кінцевій концентрації 1 $\text{мкг}/\text{мл}$ за кожним металом за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

50 При визначенні активності АТР-ази використовували середовище інкубації, що містить 50 мМ Трис-НСІ, 5 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ АТР (pH=7,5). В "контрольну" пробу замість NP металів додавали 20 мМ Трис-НСІ буфер. Час інкубації тривав 10 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1 см^3 10% розчину ТХО. Величину АТР-ої активності визначали спектрофотометрично за накопиченням неорганічного фосфору (P_i) методом Фіске-Суббароу, обчислювали за формулою 2:

$$55 \quad A = \frac{D_b \times 4 \times \text{Ctga} \times 1000}{B \times t} \quad (2)$$

де А - активність АТР-ази;

В - кількість білка в пробі, мкг;

t - час інкубації, що складає 10 хв;

UA 92804 U

- 1000 - перерахунок мкг у мг,
 D_p - оптична густина проби, яка відповідає P за калібрувальною кривою;
 $\text{ctg}\alpha - \text{ctg}$ кута нахилу калібрувальної кривої, який дорівнює 1,8;
 4 - коефіцієнт перерахунку (враховують кювету при побудові калібрувальної кривої (0,25 см
 5 - ~ 1,00 см)).
 Результати виражали у відносних одиницях A/A_0 ,
 де A_0 - величина АТР-ної активності МФ "контрольної" проби;
 A - величина АТР-ної активності МФ після взаємодії з наночастками металів ("дослідна"
 проба).
- 10 - Активність ЛДГ-ази у "дослідній" та "контрольній" пробах визначали спектрофотометрично за швидкістю окиснення NADH у середовищі інкубації, що містить 50 мМ К-фосфатний буфер, 0,3 мМ піруват- Na та 9 мМ NADH (pH 7,5). Активність ЛДГ-ази виражали у мкмоль NADH /хв•мг білка та розраховували за формулою 3:
- $$A = \frac{\Delta D \times V}{6,22 \times 2 \times v}, \quad (3)$$
- 15 - де ΔD - середнє значення зміни оптичної густини проби за 1 хв;
 V - кінцевий об'єм проби, що дорівнює 3,15 cm^3 ;
 6,22 - коефіцієнт мікромолярної екстинкції відновленої форми піридинових нуклеотидів;
 v - кількість білка в пробі, визначеного методом Лоурі, мг.
 Результати виражали у відносних одиницях, порівнюючи абсолютні величини
 20 - ферментативних активностей "дослідного" та "контрольного" зразків.
 Токсичними вважали зразки NP металів у випадку стимуляції активності ЛДГ-ази за взаємодії з цитозольною фракцією клітин CHO-K1 не менш, ніж на 20 %, та інгібіції активності АТР-зи з мембранною фракцією не менш ніж на 50 %, відносно їх рівня у "контрольній" пробі.
 Результати досліджень загальної токсичності дослідних зразків гексаціаноферрату NPCo,
 25 - саме NPCo, NPZn, NPAg, NPFe, NPCu та двоокису NPMn з субклітинними фракціями клітин CHO-K1 за визначенням величин біохімічних маркерів у порівнянні з такими в "контролі" наведені в таблиці 2. Так, визначено, що під впливом гексаціаноферрату NPCo і саме NPCo визначено вірогідне гальмування активності мембранної АТР-ази та посилення цитозольної ЛДГ-ази відносно їх значень в "контрольній" пробі. За додавання у інкубаційну суміш NPZn
 30 - встановлювали тенденцію до зміни активностей індикаторних ферментів.
 Результати щодо активності ферментів у субклітинних фракціях клітин CHO-K 1 внаслідок взаємодії з NPAg, NPFe, NPCu та двоокису NPMn дозволяють вважати їх нетоксичними, а враховуючи відсутність їх генотоксичної та мутагенної дії щодо тест-клітин, біобезпечними.
 За підсумком одержаних даних, було вибрано безпечні зразки NPAg, NPFe, NPCu та
 35 - двоокису NPMn, як складові наноконструкції металів (НкМе) у аліквотному співвідношенні з кінцевою концентрацією 100 мкг/см³ за кожним металом. Даний НкМе знайде широке впровадження і використання у технологіях отримання як біологічних засобів, так й кормових добавок (нанонутрицевтиків) з перспективою застосування у ветеринарній медицині та тваринництві.
 40 -

Таблиця 2

Активність мембранної АТФ-ази та цитозольної ЛДГ- ази тест-клітин лінії CHO-K1 за впливу дослідних зразків наночастинок металів ($M \pm m$; $n=5$).

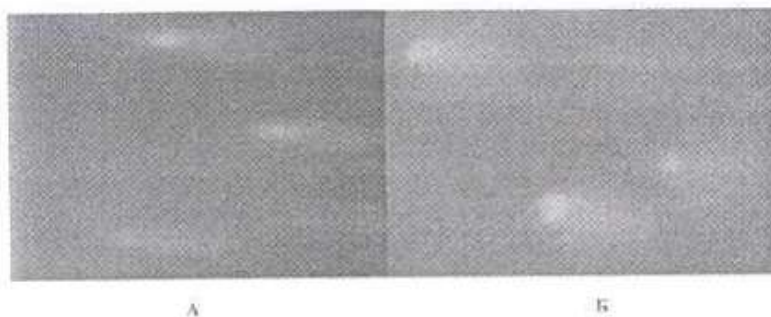
Наночастки металів/контроль	Активність ЛТР- ази, ум.од.	Активність ЛДГ- ази, ум.од.
Контроль (субклітинні фракції інтактних клітин)	1,300±0,030	0,970±0,020
Субклітинні фракції + гексаціаноферат NPCo	1,080±0,006*	1,460±0,040*
Субклітинні фракції + NPCo	1,020±0,002	1,520±0,052*
Субклітинні фракції + NPZn	1,100±0,030	1,270±0,080
Субклітинні фракції + NPAg	1,220±0,005	0,900±0,002
Субклітинні фракції + NPFe	1,120±0,007	1,140±0,006
Субклітинні фракції + NPCu	1,250±0,008	1,250±0,015
Субклітинні фракції + двоокису NPMn	1,310±0,025	1,080±0,004

Примітка. * - різниця значень вірогідна при ($p \leq 0,05$) відносно значень такого показника у контролі.

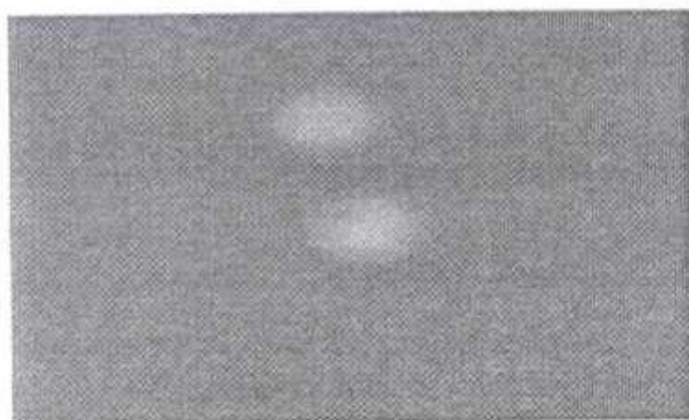
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Нанокomпозит металів, як потенційний компонент біопрепаратів і кормових добавок для тварин, що містить металеві наночастки, переважно сферичної форми, в якому розміри наночастинок складають від 30 нм до 100 нм, метали вибрані з групи, що складається з срібла (Аргентуму), міді (Кулпруму), заліза (Феруму), оксиду марганцю (Мангану), який відрізняється тим, що
- 10 наночастки синтезовані за методом хімічної конденсації та за умов дослідження *in vitro* на моделі субклітинних фракцій культури клітин CHO-K1 не проявляють загальної токсичності і генотоксичності та має наступний структурний, якісний та кількісний склад за співвідношенням компонентів, об'єм %:
- 15 колоїдний розчин наночастинок Аргентуму (з концентрацією 1600,0 мкг/см³ за металом, середнього розміру (~31,5±0,9) нм) - 0,625 %;
- колоїдний розчин наночастинок Феруму (з концентрацією 10000,0 мкг/см³, (~100,0±10,0) нм) - 0,100 %
- колоїдний розчин наночастинок двоокису Мангану (з концентрацією 2785,0 мкг/см³, (~50,0±3,0) нм) - 0,359 %;
- 20 колоїдний розчин наночастинок Кулпруму (з концентрацією 2560,0 мкг/см³, (~70,0±5,0) нм) - 0,391 %;
- вода дистильована - 98,525 %.

UA 92804 U



фiг.1



фiг.2

Комп'ютерна верстка Д. Шевчук

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

ДОДАТОК Ж

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
«ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ»

ТОКСИКО-БІОХІМІЧНА ОЦІНКА НАНОЧАСТОК
МЕТАЛІВ, ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ КОМПОНЕНТІВ
БІОПРЕПАРАТІВ І КОРМОВИХ ДОБАВОК, ЗА
ПОКАЗНИКАМИ БЕЗПЕКИ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

Методичні рекомендації

Харків 2013

ДЕРЖАВНА ВЕТЕРИНАРНА ТА ФІТОСАНІТАРНА СЛУЖБА УКРАЇНИ

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 1

засідання Науково-методичної ради Державної
ветеринарної та фітосанітарної служби України

21 грудня 2012 року

м. Київ

Присутні: 37 із 42 членів ради

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Розгляд звітів заключних та перехідних науково-дослідних робіт на 2012 рік, які фінансувались за рахунок коштів Державного бюджету України, методичних рекомендацій, вказівок, пропозицій науково-дослідних розробок на 2013 рік

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

Розробники: Куцан О.Т., Романько М.С., Оробченко О.Л., Шевцова Г.М. та ін. (ННЦ «ЛЕКВМ»).

Рецензенти: Маценко О.В. (ХДЗВА), Руденко О.Л. (ННЦ «ЛЕКВМ»).

Незалежний експерт: Л.І. Акименко.

ПОСТАНОВИЛИ:

1. Запропоновані колективом науковців методичні рекомендації затвердити і прийняти до впровадження в практику ветеринарної медицини за умови затвердження керівниками робочих груп.
2. Зобов'язати авторів методичних рекомендацій надрукувати їх та розіслати до:
 - відділення ветеринарної медицини НААН України;
 - Головні управління ветеринарної медицини АР Крим, областей, міст Києва і Севастополя Держкомветмедицини;
 - ДНКВЦМ;
 - ДНДЛДВСЕ;
 - факультети ветеринарної медицини вищих навчальних закладів.

Прийнято одногосно членами Науково-методичної ради.

Заступник Голови Науково-методичної
ради Державної ветеринарної та фітосанітарної
служби України

Секретар



В.В. Башинський

С.В. Трубка

ДОДАТОК 3





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72608** (13) **U**
 (51) МПК (2012.01)
A61K 39/00
A61K 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ
 УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 01110</p> <p>(22) Дата подання заявки: 03.02.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2012, Бюл.№ 16</p>	<p>(72) Винахідник(и): Романько Марина Євгенівна (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA), Обуховська Ольга Валеріївна (UA), Ушкалов Валерій Олександрович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

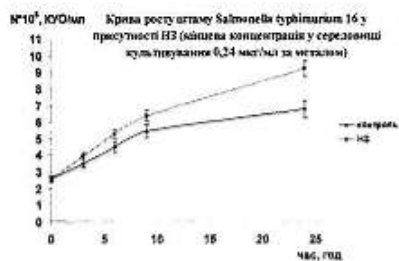
(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОМАСИ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН САЛЬМОНЕЛ З ВИКОРИСТАННЯМ НАНОЧАСТОК ЗОЛОТА І СРІБЛА

(57) Реферат:

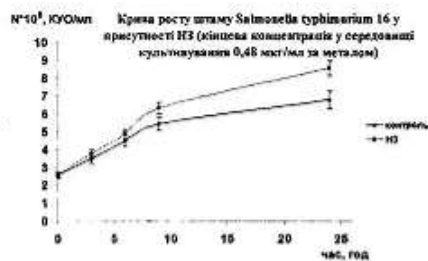
Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології та нанобіотехнології, зокрема до способів підвищення рівня накопичення біомаси бактеріальних клітин сальмонел у порівнянні з загальноприйнятими способами. Даний спосіб може бути використаний при виготовленні будь-яких імунобіологічних засобів, що потребує використання при виготовленні вакцинних препаратів для імунопрофілактики сальмонельозів тварин і людей; сальмонельозних антигенів для серологічних і імуноферментних реакцій у діагностичних дослідженнях; протисальмонельозних, гіперімунних і аглютинуючих сироваток тощо. В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб отримання біомаси бактеріальних клітин сальмонел на моделі виробничих штамів *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму M та *Salmonella Turphimurium* штаму № 16, що включає виготовлення рідкого поживного середовища, культивування бактеріальної маси клітин шляхом додавання у рідке поживне середовище наночасток золота у діапазоні концентрації (0,12-0,97) мкг/мл за металом та наночасток срібла - (0,27-2,16) мкг/мл за металом - із середнім розміром ~30 нм, щоб забезпечити ефективність способу. Даний спосіб знайде широке впровадження і використання у біотехнологічній промисловості при виготовленні імунобіологічних засобів, сировиною для яких є якісна біомаса бактеріальних клітин сальмонел, зокрема - при виготовленні вакцинних препаратів проти сальмонельозу тварин і людей; сальмонельозних антигенів для серологічних і імуноферментних реакцій у діагностичних дослідженнях; протисальмонельозних, гіперімунних і аглютинуючих сироваток тощо.

UA 72608 U

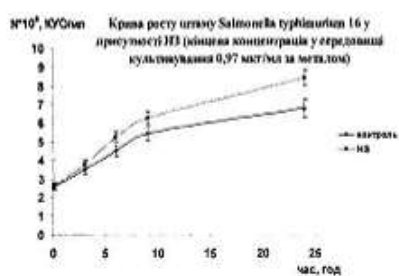
UA 72608 U



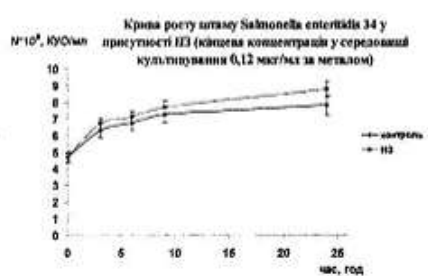
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Примітка: НЗ – наночастки золота; НС – наночастки срібла.

UA 72608 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології та нанобіотехнології, зокрема до способів підвищення рівня накопичення біомаси бактеріальних клітин сальмонел у порівнянні з загальноприйнятими способами. Даний спосіб може бути використаний при виготовленні будь-яких імунобіологічних засобів, що потребує використання при виготовленні вакцинних препаратів для імунопрофілактики сальмонельозів тварин і людей; сальмонельозних антигенів для серологічних і імуноферментних реакцій у діагностичних дослідженнях; протисальмонельозних, гіперімунних і аглютинуючих сироваток тощо.

Загальновідомим та широко впровадженим є спосіб отримання біомаси бактеріальних клітин сальмонел шляхом висівання та культивування в рідких живильних середовищах.

Існує спосіб накопичення біомаси сальмонел на середовищі СБК (гідролізат сухого білкового концентрату - 4,6 мас. %; екстракту кормових дріжджів - 0,6 мас. %; натрію фосфорнокислого двоаміщеного - 0,2 мас. %; хлориду натрію - 0,45 мас. %; води дистильованої - до 100 мас. %), готове середовище утримує аміний азот 150,0-210,0 мг% та має рН 7,6-7,8 [Патент РФ № 2124366, А61К39/02 Способ изготовления вакцины против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных и птиц]. Після 20 годин культивування на середовищі СБК накопичується біомаса сальмонел в концентрації $2,3 \cdot 10^8$ КУО/см³.

Також існує спосіб накопичення біомаси сальмонел на середовищі на основі м'ясопептонного бульйону із додаванням сухого екстракту кормових дріжджів (5,0 г/л), калію (8,8 г/л), натрію фосфорнокислого двоаміщеного (1,4 г/л), 0,1 % розчину діамантового зеленого (5,0 мл/л) та 0,01 % розчину кристалічного фіолетового (10 мл/л), рН - 6,6-6,8, утримання амінного азоту 0,8-1,0 % [Панасовец О.П., Нетрусов А.И., Головина С.В., Алешня В.В., Журавлев П.В. Обоснование возможности применения новой жидкой среды накопления для выделения сальмонелл из водных объектов // ЖМЭИ, 2007. - № 4. - С. 54-56]. Культивування впродовж 20 годин дозволяє накопичити біомасу *Salmonella Typhimurium* в концентрації $4,1 \cdot 10^8$ КУО/см³.

Недоліком наведених вище способів є досить громіздкі та кропіткі методики виготовлення середовищ та недостатньо висока концентрація біомаси сальмонел.

Найбільш близьким за технічною суттю до рішення, що заявляється, є спосіб накопичення біомаси сальмонел на переварі Хоттінгера [Патент РФ №2086259, А61К39/116 Ассоциированная инактивированная вакцина против хламидиоза, кампилобактериоза, сальмонеллеза и лептоспироза мелкого рогатого скота]. За умов застосування цього способу до перевару Хоттінгера додають 40 % розчин глюкози до концентрації 0,1-0,2 %. Культивування впродовж 18-20 годин дозволяє накопичити сальмонели сировару *Salmonella Typhimurium* в концентрації $6 \cdot 10^8$ КУО/см³. За цим способом виготовляють рідке поживне середовище та культивують бактеріальну масу клітин. Недоліком цього рішення є недостатньо висока концентрація біомаси сальмонел.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб отримання біомаси бактеріальних клітин сальмонел на моделі виробничих штамів *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М та *Salmonella Typhimurium* штаму № 16, що включає виготовлення рідкого поживного середовища, культивування бактеріальної маси клітин шляхом додавання у рідке поживне середовище наночасток золота у діапазоні концентрацій (0,12-0,97) мкг/мл за металом та наночасток срібла - (0,27-2,16) мкг/мл за металом - із середнім розміром ~ 30 нм, щоб забезпечити ефективність способу.

У порівнянні з прототипом у стандартному поживному середовищі ("контроль") рівень інтенсивності накопичення біомаси клітин роду *Salmonella* складає не більш ніж $((6,5-7,5) \cdot 10^8)$ КУО/см³, а за умов додавання до середовища наночасток золота максимальний відсоток приросту біомаси сягає у середньому 27,8 %, а наночасток срібла - 21,4 % відповідно, що відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконується таким чином.

Виготовлення поживного середовища з наночастками золота.

Як джерело амінного азоту використовують будь-яке рідке поживне середовище, що є стандартним і підходить для культивування та накопичення біомаси бактеріальних клітин сальмонел. До рідкого поживного середовища за умов асептики додають колоїдні дисперсії наночасток золота із середнім розміром ~ 30 нм у співвідношенні 4:1 у діапазоні концентрацій (0,12-0,24-0,48-0,97-1,93) мкг/мл за металом за температури $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$. Середовище у подальшому піддають автоклавуванню за 0,7 атм; з метою перевіряння на стерильність витримують за температури $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ впродовж 48 год.

При отриманні біомаси бактеріальних клітин з наночастками срібла до рідкого поживного середовища додають колоїдні дисперсії наночасток срібла із середнім розміром ~ 30 нм у співвідношенні 4:1 у діапазоні концентрацій (0,27-0,54-1,08-2,16-4,32) мкг/мл за металом за

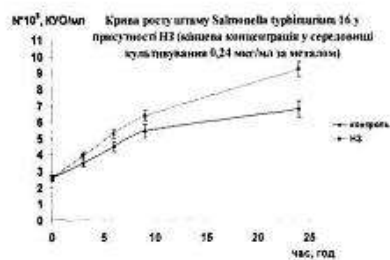
UA 72608 U

- температури $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$. Середовище у подальшому піддають автоклавуванню за $0,7$ атм; з метою перевіряння на стерильність витримують за температури $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ впродовж 48 год.
- Як стандартне ("контроль") використовують комерційне стандартизоване рідке середовище - м'ясопептонний бульон (МПБ) та бульон Хоттінгера ($\text{pH}=(7,2-7,6)$); аміний азот $(100-120)$ мг %.
- 5 Після перевірки на стерильність в конічні колби з середовищем, що містить наночастки, та з стандартним середовищем ("контроль") за умов асептики засівають по 1 см^3 суспензії добової культури *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М та *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 з відомою концентрацією та залишають для інкубації. Інкубацію бактеріальних культур дослідних штамів проводять за температури $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ впродовж 24 год.
- 10 Бактеріальні клітини *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М та *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 накопичуються у середньому до $(9,0 \cdot 10^8)$ колоній утворюючих одиниць у 1 см^3 (КУО/ см^3) в залежності від рідкого поживного середовища, що було вибрано як стандартне ("контроль"). Як "холостої" пробу вважають зразок рідкого поживного середовища з вмістом та без наночастинок металів.
- 15 Приклад 1. Визначення інтенсивності приросту біомаси культур клітин *Salmonella* виробничих штамів після інкубації у рідкому поживному стандартному середовищі ("контроль"). Після інкубації культур клітин *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М та *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 у рідкому поживному стандартному середовищі ("контроль") відбирають по 1 см^3 суспензії біомаси і визначають її оптичну густину через певні проміжки часу:
- 20 3, 6, 9, 12 і 24 години проти "холостої" проби спектрофотометричним методом за довжини хвилі 630 нм. Отримані результати виражають графічно кінетичними кривими, що наведені на фіг. 1-8 перераховуючи оптичну густину у КУО/ см^3 за даними попередньо побудованих калібрувальних кривих.
- 25 Аналіз отриманих результатів свідчить, що у процесі культивування у стандартному середовищі було отримано біомасу клітин *Salmonella* дослідних штамів, значення інтенсивності накопичення якої дорівнювало у середньому для *Salmonella Typhimurium* - $((6,4-6,6) \cdot 10^8)$ КУО/ см^3 та *Salmonella Enteritidis* - $((7,2-7,4) \cdot 10^8)$ КУО/ см^3 відповідно (див фіг. 1-8).
- 30 Приклад 2. Визначення інтенсивності приросту біомаси культур клітин *Salmonella* виробничих штамів після інкубації у рідкому поживному середовищі з вмістом наночастинок золота і срібла у порівнянні зі стандартним середовищем ("контроль"). Після інкубації культур клітин *Salmonella Enteritidis* штаму № 34 і штаму М та *Salmonella Typhimurium* штаму № 16 у рідкому поживному середовищі з вмістом наночастинок певних металів відбирають по 1 см^3 суспензії біомаси і визначають її оптичну густину через певні проміжки часу: 3, 6, 9, 12 і 24 години проти "холостої" проби спектрофотометричним методом за довжини хвилі 630 нм.
- 35 Отримані результати виражають графічно кінетичними кривими, що наведені на фіг. 1-8 перераховуючи оптичну густину у КУО/ см^3 за даними попередньо побудованих калібрувальних кривих. Аналіз отриманих результатів свідчить, що у процесі культивування у рідкому поживному середовищі з вмістом наночастинок золота було отримано біомасу клітин *Salmonella*, значення інтенсивності накопичення якої перевищували такі у "контролі" у середньому для
- 40 *Salmonella Typhimurium* та *Salmonella Enteritidis* дослідних штамів на $(25,07 \pm 1,13)$ % і дорівнювали $((8,5-9,6) \cdot 10^8)$ КУО/ см^3 (див фіг. 1-4. У процесі культивування у рідкому поживному середовищі з вмістом наночастинок срібла було отримано біомасу клітин *Salmonella*, значення інтенсивності накопичення якої перевищували такі у "контролі" у середньому для *Salmonella Typhimurium* та *Salmonella Enteritidis* дослідних штамів на $(16,70 \pm 0,45)$ % і дорівнювали $((8,4-8,9) \cdot 10^8)$ КУО/ см^3 (див фіг. 1-8).
- 45 Даний спосіб знайде широке впровадження і використання у біотехнологічній промисловості при виготовленні імунобіологічних засобів, сировиною для яких є якісна біомаса бактеріальних клітин сальмонел, зокрема - при виготовленні вакцинних препаратів проти сальмонельозу тварин і людей; сальмонельозних антигенів для серологічних і імуноферментних реакцій у
- 50 діагностичних дослідженнях; протисальмонельозних, гіперімунних і аглютинуючих сироваток тощо.

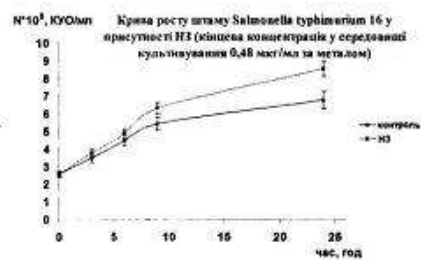
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 55 Спосіб отримання біомаси бактеріальних клітин сальмонел з використанням наночастинок золота і срібла, що включає виготовлення рідкого поживного середовища, культивування бактеріальної маси клітин сальмонел, який **відрізняється** тим, що у рідке поживне середовище додають наночастки золота у діапазоні концентрації $(0,12-0,97)$ мкг/мл за металом та наночастки срібла - $(0,27-2,16)$ мкг/мл за металом із середнім розміром ~ 30 нм.

UA 72608 U



Фіг. 1



Фіг. 2

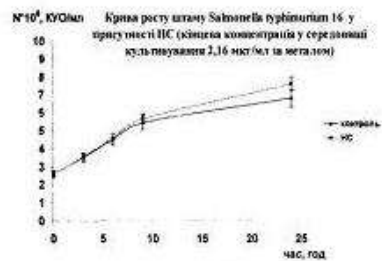


Фіг. 3

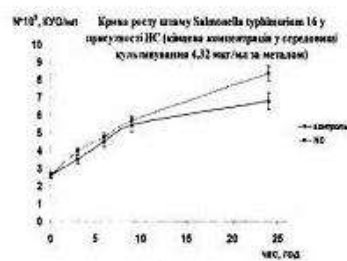


Фіг. 4

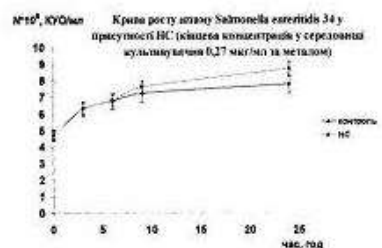
Примітка: НЗ – наночастки золота; НС – наночастки срібла.



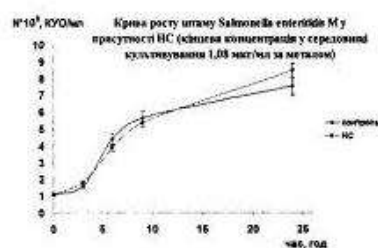
Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8

Примітка: НЗ – наночастки золота; НС – наночастки срібла.

UA 72608 U

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

ДОДАТОК К





УКРАЇНА

(19) UA (11) 58450 (13) U
 (51) МПК (2011.01)
 C12N 3/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
 І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ

ОПИС
 ДО ПАТЕНТУ
 НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
 відповідальність
 власника
 патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОМАСИ *BACILLUS ANTHRACIS* З ВИКОРИСТАННЯМ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

1

(21) u201011927
 (22) 08.10.2010
 (24) 11.04.2011
 (46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.
 (72) ГОЛОВКО АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ,
 УШКАЛОВ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, МАЧУ-
 СЬКИЙ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, РЕЗНИЧЕНКО
 ЛЮДМИЛА СЕРГІЙВНА, РОМАНЬКО МАРИНА ЄВ-
 ГЕНІЙВНА, ДИБКОВА СВІТЛАНА МИКОЛАЙВНА,
 БАБКІН МИХАЙЛО ВАЛЕРІЙОВИЧ
 (73) ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІН-
 СТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ШТАМІВ МІКРООР-
 ГАНІЗМІВ

2

(57) Спосіб отримання біомаси *Bacillus anthracis* в середовищах з використанням наночастинок золота, який відрізняється тим, що за рахунок додавання нанозолота в співвідношеннях від 1:8 до 1:10 з концентрацією золота 15 ± 5 - 30 ± 5 мкг/мл підвищується рівень накопичення бактеріальної маси сибіркового мікроба на $2-6 \log_2$, що дає можливість розмноження *Bacillus anthracis* до 10^{15} колоній утворюючих одиниць (КУО) в 1 см^3 залежно від поживного середовища, що було взято за основу, враховуючи, що в середовищах без додавання частинок нанозолота рівень накопичення сибіркового мікроба не більше ніж 10^9 КУО в 1 см^3 .

Передбачувана корисна модель відноситься до ветеринарії, а саме до ветеринарної мікробіології і біотехнології, зокрема до способів підвищення рівня накопичення бактеріальної маси *Bacillus anthracis* в порівнянні з загальноприйнятими способами. Даний спосіб може бути використаний при виготовленні будь-яких імунобіологічних засобів, що потребують використання біомаси *Bacillus anthracis*, в тому числі при виготовленні вакцини для імунопрофілактики сибірки тварин і людей.

Загальновідомим та широко вживаним є спосіб отримання біологічної маси *Bacillus anthracis* шляхом висіву та культивування в рідких живильних середовищах.

Існує «Спосіб виготовлення вакцини живої спорової проти сибірки тварин концентрованої» (Деклараційний патент України на корисну модель 46896, А61К 39/00, С12N 3/00, опубл. 11.01.2010, бюл.№1), що включає підготовку посівного матеріалу штаму, його культивування у рідкому живильному середовищі, яке містить джерело азоту, дріжджовий екстракт, з регуляцією в ньому рН і аерацією, як джерело азоту використовують пептон ферментативний і живильне середовище додатково містить: калій фосфорнокислий двозаміщений, кальцій хлористий, магній сірчаноокислий, цинк сірчаноокислий, мідь сірчаноокислу, залізо сірчаноокисле, амоній сірчаноокислий, антиспіновач.

Накопичення складає 110-140 млн., що дорівнює $1,1-1,4 \times 10^8$ колоній утворюючих одиниць (КУО). Також існує «Спосіб изготовления вакцины против сибирской язвы животных» (Авторское свидетельство СССР №980431, кл. С12N 3/00, 1981), спосіб включає одностадійне культивування вакцинного штаму в рідкому поживному середовищі, що містить 77-82% панкреатичного гідролізату казеїну та 18-23% дріжджового екстракту. Культивування проводять на протязі 41-48 годин при $30-33^\circ$. При цьому спостерігається накопичення мікроба сибірки 500-600 млн. в 1 см^3 , що дорівнює $5-6 \times 10^8$ КУО.

Найближчим аналогом корисної моделі, що реєструється, може бути «Питательная среда для накопления сибирезвеноного микроба» (патент Росії RU 2214453 С2, опубл. 20.10.2003), середовище містить в якості стимулятора росту вітамінний препарат «эксд», в якості джерела азоту - поживний бульйон для культивування мікроорганізмів, для отримання ізотонічних властивостей середовища - динатрій фосфат та натрій вуглекислий *ex tempore*. Середовище містить інгібітори росту сторонньої мікрофлори (триметоприм та поліміксин М сульфат). Таке середовище має високу чутливість та ефект накопичення біомаси.

В основу корисної моделі, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб підвищення рівня накопичення бактеріальної маси сибіркового мікроба шляхом культивування *Bacillus anthracis* в

(19) UA (11) 58450 (13) U

середовищах з наночастинками золота, котрі додаються в середовища в якості стимулятора росту. Присутність в поживному середовищі часток нанозолота стимулює розмноження мікробу сибірки. Так, в звичайних поживних середовищах *Bacillus anthracis* дає накопичення не більше ніж 10^9 колоній утворюючих одиниць (КУО) в 1 см^3 , при додаванні до середовища наночасток золота накопичення *Bacillus anthracis* підвищується і може досягати 10^{15} КУО в 1 см^3 в залежності від поживного середовища, що було взято за основу.

Приклад 1

Виготовлення поживного середовища

В якості джерела азоту використовують будь-яке рідке поживне середовище, що підходить для культивування й накопичення біомаси *Bacillus anthracis*. До середовища додають наночастинки

золота в співвідношенні 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 та 1:20. Стерилізацію проводять автоклавуванням при 0,7 атм. Після автоклавування ємності з середовищем витримують при 37°C протягом 48 годин для перевірки на стерильність. За основу ми використовували комерційне стандартизоване середовище бульйон з гідролізату рибного борошна та бульйон Хоттінгера (pH=7,2-7,6; аміний азот 100-120 мг%).

Приклад 2

Засівання рідкого поживного середовища з частками нанозолота культурою *Bacillus anthracis*

Після перевірки на стерильність в ємності з середовищем засівають по 1 см культури *Bacillus anthracis* з відомою концентрацією та залишають для культивування при 37°C протягом 20-24 годин.

Таблиця 1

Результати накопичення біомаси *Bacillus anthracis* в середовищі з частинками нанозолота

№ п/п	Розведення	Концентрація частинок нанозолота							прототипне середовище
		1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:20	
1.	10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+
5.	10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+
6.	10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+
7.	10^{-7}	+	+	+	+	+	+	+	+
8.	10^{-8}	+	+	+	+	+	+	+	+
9.	10^{-9}	+	+	+	+	+	+	+	+
10.	10^{-10}	-	-	-	+	+	-	-	-
11.	10^{-11}	-	-	-	+	+	-	-	-
12.	10^{-12}	-	-	-	-	+	-	-	-
13.	10^{-13}	-	-	-	-	+	-	-	-
14.	10^{-14}	-	-	-	-	+	-	-	-
15.	10^{-15}	-	-	-	-	+	-	-	-
16.	10^{-16}	-	-	-	-	-	-	-	-

+ - спостерігається ріст *Bacillus anthracis*

-- відсутній ріст будь-якої мікрофлори

прототипне середовище - середовище без частинок нанозолота

Приклад 3

Визначення КУО *Bacillus anthracis* після інкубації в рідкому поживному середовищі з частками нанозолота

Після інкубації *Bacillus anthracis* в рідкому поживному середовищі з частками нанозолота відбирають 1 см^3 поживного середовища та визначають КУО шляхом десятичних граничних розведень до 10^{-15} . Після серійних розведень пробірки зали-

шають для інкубації при 37°C протягом 20-24 годин (Таблиця 1).

Даний спосіб знайде широке використання в біотехнологічній промисловості де необхідне використання біомаси сибіркового мікробу, таке як виготовлення вакцин проти сибірки, виготовлення сибіркових антигенів, діагностичних наборів, протисибіркових, гіперімунних та преципітуючих сироваток тощо.

ДОДАТОК Л
СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ
ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових виданнях України:

1. **Романько М. Є.,** Ушкалов В. О., Головка А. М. Стрес у мікроорганізмів та вірулентність. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2006. № 8. С. 222–241.
2. **Романько М. Є.** Інтенсивність ліпопероксидації в мембранах бактеріальних клітин в оцінюванні ефектів стресу ліофілізації. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2008. № 13 (2). С. 214–223.
3. **Романько М. Є.,** Андрущенко В. В. Вивчення ростових властивостей нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2009. № 14. С. 286–292.
4. **Романько М. Є.** Оцінка ефектів стресу ліофілізації за інтенсивністю ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів у мембранах клітин мікоплазм. *Біотехнологія.* 2009. Т. 2. № 2. С. 105–110.
5. Визначення ушкоджень ДНК наночастинками металів, перспективних для біотехнологій / С. М. Дибкова, **М. Є. Романько,** Т. Г. Грузіна, Л. С. Резніченко, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Біотехнологія.* 2009. Т. 2. № 3. С. 80–85.
6. Вплив наночастинок золота та срібла на АТФ-азну активність нативних і регідратованих клітин виробничих штамів *Escherichia coli* / **М. Є. Романько,** Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Укр. біохім. журн.* 2009. Т. 81. № 6. С. 70–76.

7. **Романько М. Є.**, Ушкалов В. О., Андрущенко В. В. Інтенсивність дихання нативних і деліофілізованих клітин тест-штамів мікоплазм. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2009. Т. 11. № 1–2. С. 307–311.
8. Застосування методу ДНК-комет для визначення генотоксичності препаратів ветеринарних вакцин / С. М. Дибкова, **М. Є. Романько**, Т. Г. Грузіна, Л. С. Резніченко, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. *Biopolymers and cell.* 2010. Vol. 26. No. 3. P. 200–204.
9. **Романько М. Є.** Мембранотропний вплив наночастинок аурому та аргентуму на інтенсивність окиснювальних процесів у клітинах *Escherichia* за умов їх ліофілізації/регідратації. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2010. Т. 12. № 2. С. 460–473.
10. Оцінювання та контролювання біологічної безпеки наноматеріалів у ветеринарній медицині / А. М. Головка, В. О. Ушкалов, Л. С. Резніченко, **М. Є. Романько**, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова, З. Р. Ульберг. *Вісн. аграр. науки.* 2011. № 5. С. 24–28.
11. **Романько М.Є.** Проліферативні властивості клітин періодичних культур *Salmonella* виробничих штамів за умов культивування у присутності наночасток металів. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2012. Т. 14. № 1–2. С. 618–623.
12. **Романько М. Є.**, Резніченко Л. С. Наночастинки аурому та аргентуму як потенційні кріопротектори за довготривалого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів. *Біотехнологія.* 2012. Т. 5. № 5. С. 100–108.
13. **Романько М. Є.** Фізіолого-біохімічні маркери безпечності наночасток металів на моделі ізольованих бактеріальних клітин роду *Salmonella*. *Біологія та валеологія : зб. наук. пр.* Харків, 2012. Вип. 14. С. 67–77.
14. Куцан О. Т., Оробченко О. Л., **Романько М. Є.** Токсикокінетика Купруму в організмі щурів за умов тривалого введення нанокompозиту

металів (Ag, Cu, Fe та двоокис Mn) з кормом. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2015. Т. 17, № 1. С. 68–77.

15. **Roman'ko M. E.** Physiological and biochemical mechanisms of contact interaction of nanoparticles of gold with *Bacillus anthracis* vaccine strain Sterne 34F2 cells. *J. Vet. Med. Biotech. Biosafety*. 2016. Vol. 2, iss. 3. P. 12–18.

16. **Roman'ko M.** Intensity of lipid oxidation and oxidativemodification of proteins in blood of rats under the conditions of chronic influence of mixture of nanoparticles of metals and tier macrodisperse analogue. *Sci. Rep. of NULES of Ukraine*. 2017. № 5(69). Mode to access : <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/9480>.

17. **Романько М. Є.** Біохімічні маркери безпечності наночастинок металів на моделі ізольованих субклітинних фракцій еукаріотів. *Reg. Mech. Biosyst*. 2017. Vol. 8(4). P. 564–568.

18. **Романько М. Є.** Рівень інтенсивності процесів переокиснення ліпідів і окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *Escherichia coli* як біомаркер тестування біосумісності наночастинок металів. *Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна, серія: Біологія*. 2017. Вип. 29. С. 19–33.

19. **Романько М. Є.** Рівень показників імунної реактивності у крові щурів за умов одноразового внутрішньошлункового введення суміші наночастинок металів (Ag, Fe, Cu, двоокис Mn). *Біоресурси і природокористування*. 2017. Т. 9. № 5–6. 68–79.

20. **Романько М. Є.** Вплив наночастинок металів на показники енергетичного метаболізму бактерійних клітин за їх ліофілізації і регідратації. *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. 2017. № 4(80). С. 24–31.

21. **Романько М. Є.** Визначення біохімічних показників функціонального стану печінки в крові білих щурів за одноразового внутрішньошлункового введення суміші наночастинок металів (Ag, Cu, Fe, MnO₂). *ScienceRise: Biol. Sci.* 2017. Vol. 6(9). P. 14–22.

**Статті у наукових виданнях інших держав,
включені до наукометричних баз:**

22. Оценка генотоксических свойств наноматериалов ветеринарного назначения методом ДНК-комет *in vitro* / **М. Е. Романько**, С. Н. Дыбкова, Т. Г. Грузина, Л. С. Резниченко, З. Р. Ульберг, В. А. Ушкалов, А. Н. Головки. *Аграр. наука : журн. Межгос. совета по аграр. науке и инф-ции стран СНГ*. 2010. № 1. С. 28–31..

23. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., **Романько М. Е.** Токсикокинетика железа у крыс после внутрижелудочного введения нанокompозита металлов в условиях острого эксперимента. *Аграр. наука : журн. Межгос. совета по аграр. науке и инф-ции стран СНГ*. 2013. № 7. С. 22–26.

24. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., **Романько М. Е.** Токсикокинетика марганца в организме крыс после введения нанокompозита металлов (Ag, Cu, Fe, двуокись Mn) с кормом в условиях хронического эксперимента. *Актуальн. вопр. вет. биологии*. 2014. № 1 (21). С. 57–64.

25. Оробченко А. Л., **Романько М. Е.**, Куцан А. Т. Токсикологическая оценка нанокompозита металлов (Ag, Cu, Fe и двуокись Mn) по уровню биохимических маркеров крови крыс в условиях хронического эксперимента. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология : науч.-практ. журн.* 2014. № 3. С. 21–29.

Публікації у нефахових виданнях України:

26. **Романько М. Є.** Оксидативний стрес у мікроорганізмів. *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту*. 2005. Вип. 33. С. 317–327.

27. **Романько М. Є.**, Ушкалов В. О., Андрущенко В. В. АТФ-аза плазматичних мембран клітин тест-штамів мікоплазм за умов ефектів ліофілізації. *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту*. 2008. Вип. 56. С. 142–145.

28. **Романько М. Є.** Ефекти мікробіоцидної дії срібла. *Наук. вісн. вет. медицини*. 2010. Вип. 6 (79). С. 18–23.

29. Вплив наночасток металів на інтенсивність ростових процесів бактерій / **М. Є. Романько**, О. В. Кольчик, О. Т. Куцан, В. О. Ушкалов. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. наук.-досл. конгр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок*. Львів, 2011. Вип. 12, № 3, 4. С. 404–410.

30. **Романько М. Є.** Біологічні ефекти іонного і колоїдного (нанорозмірного) аурому та його препаратів. Перспективи застосування. *Вет. медицина : міжвідом. темат. наук. зб.* Харків, 2011. Вип. 95. С. 74–77.

31. Оцінка генотоксичності та мутагенності наночастинок металів, перспективних компонентів ветеринарних нанонутрицевтиків / С. М. Дибкова, **М. Є. Романько**, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, О. Т. Куцан. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2011. № 19. С. 61–69.

32. Оробченко О. Л., **Романько М. Є.**, Куцан О. Т. Зміни коефіцієнтів маси внутрішніх органів у щурів після внутрішньошлункового введення нанокмпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. наук.-досл. конгр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок*. Львів, 2013. Вип. 14, № 1–2. С. 295–300.

33. Куцан О. Т., Оробченко О. Л., **Романько М. Є.** Клінічні та органічні зміни у щурів після внутрішньошлункового введення нанокмпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту. *Вет. біотехнологія : бюл.* Київ, 2013. № 22. С. 298–309.

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези та матеріали конференцій:

34. Metal nanoparticles as method of renovation of biological potential of cells of production strains of microorganisms under the conditions of lyophilization stress / **M. Roman'ko**, L. Rieznichenko, T. Gruzina, V. Ushkalov,

A. Golovko. *Ukrainian Biochem. J.* 2009. Vol. 81, No. 4, spec. iss. : VII Parnas Conf. on Biochem. and Molec. Biology (Yalta, Ukraine, 3–7 Oct. 2009). P. 309.

35. Gold nanoparticles genotoxicity / S. Dibkova, **M. Roman'ko**, T. Gruzina, L. Rieznichenko, V. Ushkalov, Z. Ulberg. *Ukrainian Biochem. J.* 2009. Vol. 81, No. 4, spec. iss. : VII Parnas Conf. on Biochem. and Molec. Biology (Yalta, Ukraine, 3–7 Oct. 2009). P. 291.

36. **Roman'ko M. Ye.**, Reznichenko L. S., Ushkalov V. O. Membranotropic effect of metal nanoparticles on the bacterial cells under the condition of their lyophilization/rehydration. *Ukrainian-German Symp. on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Beregove, Crimea, Ukraine, 6th–10th Sept. 2010) : book of abstr.* 2010. P. 256.

37. Інтенсивність мембранних процесів виробничих штамів роду *Escherichia* в умовах впливу наночастинок золота / **М. Є. Романько**, Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов. *Укр. біохім. журн.* 2010. Т. 82, спец. вип. 4 : Матеріали Х Укр. біохім. з'їзду (м. Одеса, 13–17 верес. 2010 р.). С. 304–305.

38. Metal nanoparticles: synthesis, properties, and application in medicine and veterinary / L. S. Rieznichenko, T. G. Gruzina, S. N. Dybkova, Z. R. Ulberg, **M. E. Roman'ko**, V. A. Ushkalov, I. S. Chekman. *Mediterranean-East-Europe Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed 2011 (Uzhgorod, Ukraine, 12–14 May 2011) : prog. and materials.* Uzhgorod, 2011 P. 60–61.

39. Ушкалов В. О., Головко А. М., **Романько М. Є.** Гармонізація нормативної бази для оцінювання біологічної безпеки наноматеріалів з метою їх реєстрації. *Етика нанотехнологій та нанобезпека : тез. доп. міжнар. семінару (м. Київ, Україна, 13 жовт. 2011 р.).* Київ, 2011. С. 54–55.

40. **Roman'ko M.**, Kolchik O., Uskalov V. The study of properties of nanoparticles bakteriotsidnyh Ag, Zn, Cu, Mn, Fe against *Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus*. *3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the*

Environment (Aix-en-Provence, France, 26–29 June 2012) : final prog. and abstr.
Washington, DC : ASM, 2012. P. 58.

41. Протективная роль наночастиц металлов в физиолого-биохимических механизмах репарационных процессов лиофилизированных/регидратированных клеток *Salmonella* / М. Е. Романько, Л. С. Резниченко, В. А. Ушкалов, М. В. Рубленко. *Materiály VIII mezinárodní věd.-prakt. konf. «Moderní vymoženosti vědy — 2012» (Praha, 27 ledna–05 února 2012 r.)*. Praha : Publ. House «Education and Science», 2012. Díl 22. Biologické vědy. Zeměpis a geologie. Zvěrolékařství. S. 87–90.

42. Куцан А. Т., Романько М. Е., Оробченко А. Л. Оценка безопасности и токсичности наночастиц металлов, как прототипов ветеринарного нанонутрицевтика, по определению системных биомаркеров в экспериментах *in vitro* и *in vivo* *Materiály VIII mezinárodní věd.-prakt. konf. «Moderní vymoženosti vědy — 2012» (Praha, 27 ledna–05 února 2012 r.)*. Praha : Publ. House «Education and Science», 2012. Díl 22. Biologické vědy. Zeměpis a geologie. Zvěrolékařství. S. 84–87.

43. Романько М. Є. Рістстимулююча активність наночастинок аргентуму щодо періодичних культур клітин ентеробактерій виробничих штамів. *Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів : зб. матеріалів наук.-практ. конф. (у рамках V міжнар. форуму «Комплексне забезпечення лабораторій»)* (м. Київ, 26–27 верес. 2012 р.). Київ, 2012. С. 110–111.

44. Біодоступність композиції наночастинок Ag, Cu, Fe та двоокису Mn в організмі щурів за умов гострого токсикологічного експерименту / О. Т. Куцан, О. Л. Оробченко, М. Є. Романько, Р. В. Доценко. *Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів : зб. матеріалів наук.-практ. конф. (у рамках V міжнар. форуму «Комплексне забезпечення лабораторій»)* (м. Київ, 26–27 верес. 2012 р.). Київ, 2012. С. 93–95.

45. **Романько М. Є.** Застосування наночасток аурому в біотехнологіях отримання біомаси клітин ентеробактерій виробничих штамів після їх ліофілізації/регідратації. *Етика нанотехнологій та нанобезпека : тез. доп. II міжнар. семінару (м. Київ, 10 жовт. 2012 р.)*. Київ, 2012. С. 57–59.

46. **Романько М. Е.,** Мачусский А. В., Ушкалов В. А. Наночастицы золота в биотехнологиях культивирования биомассы *Vacillus anthracis* вакцинного штамма. *Биотехнология. Взгляд в будущее : материалы II междунар. науч. интернет-конф. (г. Казань, 26–27 марта 2013 г.)*. Казань, 2013. С. 294–297.

47. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., **Романько М. Е.** Токсикокинетика марганца в организме крыс после внутрижелудочного введения нанокompозита металлов (Ag, Cu, Fe, двуокись Mn) в условиях острого эксперимента. *Материалы IV съезда вет. фармакологов и токсикологов России «Актуал. вопр. вет. фармакологии, токсикологии и фармации»*. Воронеж : Истоки, 2013. С. 372–375.

48. **Roman'ko M. Ye.** Protective effect of metal nanoparticles for generation of oxidation of lipids and proteins in membrane fractions of bacterial cells at lyophilization/rehydration. *23rd Int. Symp. «New Technologies in Contemporary Animal Production» (Novi Sad, Serbia, 19–21 June 2013) : proc.* P. 337–340.

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації

Монографії:

49. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине : справ. пособ. / А. Н. Головки, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрышник, Б. Т. Стегний, В. В. Герман, Л. В. Олейник, М. В. Бабкин, **М. Е. Романько,** Ю. А. Собко, Р. А. Кучерявенко, Н. Г. Пинчук, А. В. Скрышник, Т. Ю. Трускова, М. Р. Ковпак, О. А. Головки, В. О. Коцимон, Д. А. Ордынская, Я. А. Древаль ; под ред. д-ра вет. наук, проф., акад. УААН А. Н. Головки. Х. : НТМТ, 2007. 512 с.

50. Токсико-біохімічна оцінка нанометалів за системними маркерами при застосуванні у ветеринарній медицині / О. Т. Куцан, М. Є. Романько, О. Л. Оробченко, В. О. Ушкалов. Харків : НТМТ, 2016. 328 с.

Патенти України на корисну модель:

51. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів : декл. пат. на корис. модель 48540, Україна / С. М. Дибкова, О. В. Годовський, **М. Є. Романько**, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. № u200909287 ; заявл. 10.09.09 ; опубл. 25.03.10, бюл. № 6. 5 с.

52. Спосіб отримання біомаси *Bacillus anthracis* з використанням наночастинок золота : декл. пат. на корис. модель 58450, Україна / А. М. Головка, В. О. Ушкалов, О. В. Мачуський, Л. С. Резніченко, **М. Є. Романько**, С. М. Дибкова, М. В. Бабкін. № u201011927 ; заявл. 08.10.10. ; опубл. 11.04.11, бюл. № 7. 2 с.

53. Спосіб отримання біомаси бактеріальних клітин сальмонел з використанням наночасток золота і срібла : декл. пат. на корис. модель 72608, Україна / **М. Є. Романько**, Б. Т. Стегній, О. В. Обуховська, В. О. Ушкалов. № u201201110 ; заявл. 03.02.12. ; опубл. 27.08.12, бюл. № 16. 4 с.

54. Наноккомпозит металів, як потенційний компонент біопрепаратів і кормових добавок для тварин : декл. пат. на корис. модель 92804, Україна / **М. Є. Романько**, О. Л. Оробченко, О. Т. Куцан, В. О. Ушкалов. № u201401499 ; заявл. 17.02.14 ; опубл. 10.09.14, бюл. № 17. 6 с.

Методичні рекомендації:

55. Методи оцінки інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та його регуляції у біологічних об'єктах : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держ. ком. вет. медицини України (протокол № 1 від 20.12.2007 р.) / Б. Т. Стегній, Л. В. Коваленко, **М. Є. Романько**, В. О. Ушкалов, С. П. Долецький, В. С. Бойко, Ю. М. Кротовська, Л. В. Матюша ; ННЦ «ЛЕКВМ». Харків, 2009. 59 с.

56. Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих клітин : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держ. ком. вет. медицини України (протокол № 3 від 20.06.2009 р.) / С. М. Дибкова, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг, А. М. Головка, В. О. Ушкалов, М. В. Бабкін, О. В. Годовський, Л. І. Акименко, О. А. Лаврик, Д. С. Тимченко, **М. Є. Романько** ; ДНКІБШМ. Київ, 2010. 23 с.

57. Токсико-біохімічна оцінка наночасток металів, як потенційних компонентів біопрепаратів і кормових добавок, за показниками безпеки в експериментах *in vivo* : метод. реком. ; затв. наук.-метод. радою Держветфітослужби України (протокол № 1 від 21.12.2012 р.) / О. Т. Куцан, **М. Є. Романько**, О. Л. Оробченко, Г. М. Шевцова, Р. В. Доценко ; ННЦ «ЛЕКВМ». Харків, 2013. 40 с.