

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН**

РОМАНЬКО МАРИНА ЄВГЕНІВНА

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

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

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Львів — 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» Національної академії аграрних наук України.

Науковий консультант – доктор ветеринарних наук, професор,
академік НААН
ГОЛОВКО Анатолій Миколайович,
Державний науково-контрольний інститут
біотехнології і штамів мікроорганізмів
Держпродспоживслужби України, директор.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Стойка Ростислав Стефанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції проліферації
клітин та апоптозу;

доктор біологічних наук, професор
Рибальченко Володимир Корнійович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
завідувач НДС «Мембранології і цитології»;

доктор біологічних наук, професор
Антоняк Галина Леонідівна,
Львівський національний університет
імені Івана Франка МОН України,
професор кафедри екології.

Захист відбудеться «07» травня 2018 р. об 12-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 в Інституті біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий «03» квітня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. І. Віщур

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Малі розміри, висока біосумісність та біодоступність наноматеріалів забезпечують їм можливість вступати в прямий контакт з інфекційними агентами, токсинами, біологічними системами та окремими структурами клітин (протеїнами, ліпідами, нуклеїновими кислотами) (Андреев С. М., 2008; Руководство МЭБ, 2009; Dukhin A. S. et al., 2010; Влізло В. В. зі співавт., 2015; Стойка Р. С., 2017).

Водночас, нанорозмірність цих матеріалів може призводити до їх токсичності (Chen Z., 2006; Powers Kevin W., 2006; Lewinski N., 2008; Филатов Б. Н. с соавт., 2010; Zhao X., 2012; Прилуцька С. В. зі співавт., 2012, 2017), що вимагає вивчення потенційного ризику використання наночастинок окремих видів на клітинному, органному та організменному рівнях і є актуальним завданням.

Значну зацікавленість для експериментальних біологічних досліджень становлять колоїдні дисперсії наночастинок металів (NPMe), які мають високу хімічну стабільність і біосумісність (Дыкман Л. А., 2007; Chen P. C. et al., 2008; Сердюк А. М. зі співавт., 2010; Чекман І. С., 2009, 2012), тому науковий супровід у цьому напрямку безперечно необхідний.

Відомості про токсичні ефекти NPMe суперечливі, що зумовлено біологічною активністю металу в їх складі, їх концентрацією і розміром, не вистачає також ґрунтовного розуміння їх біохімічних механізмів. Відома здатність NPAu і NPAg чинити дію на активність протеолітичних, у тому числі лізосомальних ензимів, ізоензимів цитохрому С, АТР-ази та мембранозв'язаних процесів (Ulberg Z. R. et al., 2005; Alt V. et al., 2004; Shah S., 2005; Данилович Г. В. зі співавт., 2007; Maiti S. et al., 2010), бракує досліджень у цьому напрямку наночастинок інших металів, зокрема есенційних.

Припускають, що цитотоксичність таких наноматеріалів, як фулерени, карбонові нанотрубки, модифіковані наноалмази, ліпосоми, зумовлена структурно-функціональним пошкодженням цілісності плазматичної мембрани поряд із інгібуванням синтезу АТР та процесів дихання, а також окисненням глутатіону, тільних груп білків і пероксидним окисненням ліпідів та пов'язаними з цим наслідками, такими як оксидативний стрес (Markovic Z. et al., 2007; Lowry G. V. et al., 2012; Шекунова Т. О. с соавт., 2013), генотоксичність і апоптоз (Rouse J. G., 2006; Garcon G., 2006; Meng H. et al., 2007; Tien D. C., 2008; Zhu M.-T. et al., 2008; Трефілов В. И., 2010; Matsuda S., 2011; Рибальченко В. К. зі співавт., 2016, 2017).

Водночас цитотоксичність і біосумісність NPMe складно виокремити серед інших проблем і вони поки що мають дискусійний характер. Так, наночастинок різного хімічного походження можуть виступати і як прооксиданти через мембранотоксичну дію, і як антиоксиданти, що призводить до блокування цитолітичного синдрому (Sahoo S. K., 2007; Bawa R., 2008; Prylutska S. V. et al., 2008, 2012; Jia H. Y. et al., 2009; Injac R. et al., 2009; Johnston H. J. et al., 2010; Cornejo-Garrido H. et al., 2011; Фальфушинська Г. І. зі співавт., 2013; Джорджевич А. зі співавт., 2015).

Зі зростанням використання наноматеріалів у біотехнології, медицині і сільському господарстві виникла потреба глибшої біохімічної і токсикологічної оцінки дії NPMe у розмірно-концентраційному діапазоні на клітини еукаріотичних і прокаріотичних організмів. Необхідно також визначити найбільш небезпечні NPMe, 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-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.

Мета і завдання дослідження. 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 поставленої мети у роботі вирішували такі завдання:

- з'ясувати генотоксичну дію NPMe у розмірно-концентраційному діапазоні на моделі ізольованих еукаріотичних тест-клітин лінії CHO-K1;
- дослідити мутагенну дію NPMe на моделі апікальної меристеми *Allium cepa*;
- визначити рівень біохімічних маркерів цитотоксичності NPMe на моделі субклітинних фракцій еукаріотичних організмів;
- вивчити інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних показників у мембранних фракціях клітин *Escherichia spp.* за дії NPMe залежно від розміру частинок;
- визначити рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції і дихальної активності клітин *Escherichia spp.* та *Salmonella spp.* за дії NPMe у розмірно-концентраційній залежності;

– надати біохімічну характеристику токсичної дії та біосумісності суміші NPMe на організм білих щурів порівняно з солями відповідних металів у гострому експерименті;

– надати біохімічну характеристику токсичної дії та біосумісності суміші NPMe на організм білих щурів порівняно з солями відповідних металів у хронічному експерименті;

– визначити інтенсивність накопичення біомаси клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. за попереднього культивування з NPMe (NPAu, NPAg) та після ліофілізації/регідратації;

– дослідити інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних показників у мембранних фракціях клітин *Escherichia* spp. за попереднього культивування з NPAu і NPAg та після ліофілізації/регідратації;

– оцінити рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції і дихальної активності клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. за попереднього культивування з NPMe та після ліофілізації/регідратації;

– вивчити вплив NPAu на інтенсивність накопичення біомаси, рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції і 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⁺-АТФ-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 NPMe при культивуванні прокариотичних 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 NPMe проведено в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ) спільно з к.б.н. Т. Г. Грузіною і Л. С. Резніченко; рентгенофлуоресцентний аналіз виконано за консультативною допомогою членкора НААН О. Т. Куцана та спільно з д.вет.н. О. Л. Орбаченком; 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 симпозиумах: 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.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Роботу виконано впродовж 2006–2017 рр. у лабораторіях клінічної біохімії і токсикологічного моніторингу ННЦ «ІЕКВМ» за схемою (рис. 1).

Матеріали. У експериментах *in vitro* застосовували колоїдні дисперсії NPMe сферичної геометрії: Ауруму (NPAu) розміру ~10, ~19, ~20, ~30 і ~45 нм у вихідній концентрації 38,6 мкг/мл; Аргентуму (NPAg) – ~20 і ~30 нм, 86,4 мкг/мл; Феруму (NPFe) – ~100,0 нм, 3174,0 мкг/мл; гексаціаноферату кобальту (NPCo[Fe(CN)₆]) – ~100 нм, 2489,0 мкг/мл; Кобальту (NPCo) – ~100,0 нм, 1991,6 мкг/мл; Купруму (NPCu) – ~70 нм, 2678,6 мкг/мл; Цинку (NPZn) – ~100,0 нм, 2407,0 мкг/мл; двоокису мангану (NPMnO₂) – ~50,0 нм, 2785,0 мкг/мл за металом відповідно. У експериментах *in vivo* використовували розчини суміші NPMe (NPAg, NPFe, NPCu, NPMnO₂) та суміші солей металів (AgNO₃, (CuSO₄•5H₂O), (MnSO₄•5H₂O), (FeSO₄•7H₂O) у вихідній концентрації 100 мкг/мл за металом.

Біологічні моделі. В експериментах *in vitro* як прокаріотичні клітини застосовували бактеріальні культури *E. coli* штамів 20, 24, 25 і 57; *S. Enteritidis* 34 і М, *S. Dublin* 12, *S. Typhimurium* 16; *P. multocida* «Смол», 5, 15, 396, 550, 606, 877, 1718 і штаму *B. anthracis* Sterne 34F2; як еукаріотичні – пухлинні клітини лінії U 937 гістіоцитарної лімфоми людини та клітини лінії СНО-К1 яєчника китайського хом'яка. В експериментах *in vivo* використовували білих щурів лінії *Bistar*. Дослідження на тваринах проводили з урахуванням основних принципів біоетики (висновок, затверджений Комісією з біоетичної експертизи ННЦ «ІЕКВМ» від 05.02.2010 р.). Утримання, догляд і годівлю здійснювали згідно з нормами та раціонами, рекомендованими для цього виду лабораторних тварин; евтаназію проводили з використанням CO₂ (Strasbourg, 1986).

Схема дослідів. Визначення цитотоксичної дії NPMe в експериментах *in vitro*. Генотоксичну дію NPMe визначали в діапазоні концентрацій: NPAu – 38,60–38,60•10⁻⁵ мкг/мл, NPAg – 0,28–86,0•10⁻⁵ мкг/мл, NPCu – 0,22–823,00 мкг/мл, NPFe – 0,25–1061,00 мкг/мл, NPCo[Fe(CN)₆] – 0,16–830,00 мкг/мл, NPCo – 0,12–664,00 мкг/мл, NPZn – 0,25–802,00 мкг/мл та NPMnO₂ – 0,24–928,00 мкг/мл за металом; за впливу NPMe на суспензію клітин СНО-К1 (1:2); за температури 37±1 °С; час інкубації – 18 год.



Рис. 1. Схема проведення наукових досліджень і вказання шляхів розв'язання проблеми (завдання роботи)

Мутагенну дію NPMe визначали, використовуючи апікальну меристему *Allium cepa*, за мікроскопічним аналізом нормальних і аберантних ана-телофаз.

Цитотоксичну дію NPMe оцінювали за рівнем структурно-функціональних показників клітин за впливу NPMe (у кінцевій концентрації 1,0 мкг/мл за металом) на суспензію субклітинних фракцій (у кінцевій кількості білка 150–200 мкг/мл) (1:2); за температури 37 ± 1 °C; час інкубації – 3 хв.

У еукаріотичних клітинах визначали питому Na^+ , K^+ -АТР-азну активність мембранної фракції і лактатдегідрогеназу (ЛДГ-аза) активність цитозольної фракції; у прокаріотичних – питому дихальну активність, питому H^+ -АТР-азну активність, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і окиснювальної модифікації білків (ОМБ), каталазну активність, рівень показника загальної антиокиснювальної активності (загальна АОА).

Токсичними вважали зразки NPMe за інгібіції АТР-ази під час дії на субклітинні фракції не менш ніж на 20 %, стимуляції ЛДГ-ази – не менш ніж на 50 %, зниження рівня антиоксидантних показників та збільшення утворення продуктів ПОЛ і карбоксильних похідних ОМБ порівняно з контрольними значеннями показників.

Біохімічна характеристика токсичної дії та біосумісності суміші NPMe (NP_{Ag}, NP_{Fe}, NP_{Cu}, NP_{MnO₂}) в експериментах *in vivo*. За умов віварію ННЦ «ЛЕКВМ» проведено дослід із вивчення гострого (одноразового) впливу суміші NPMe на організм статевозрілих щурів-самців лінії *Vistar* (n=144) масою 200–250 г. За принципом аналогів сформовано шість груп тварин по 24 щури в кожній. Тваринам I і II дослідних груп вводили одноразово внутрішньошлунково за допомогою зонда розчини суміші NPMe і суміші солей відповідних металів у дозі 0,3 мг/кг, III, IV і V дослідних груп – NPMe у дозах, що перевищували рекомендовану біотичну дозу в 3,3; 6,7 і 13,3 разу (1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла) відповідно.

Під час вивчення хронічного впливу суміші NPMe на організм статевозрілих щурів-самців лінії *Vistar* (n=80) масою 120–140 г за принципом аналогів сформовано чотири групи по 20 тварин в кожній. Тваринам дослідних груп задавали з кормом упродовж 90 діб розчини суміші солей металів і суміші NPMe відповідно. Щурам I дослідної групи задавали суміш солей металів у дозі 0,3 мг/кг, II – суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг, III – суміш NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла відповідно.

Тваринам контрольних груп у обох дослідах задавали дистильовану воду за аналогічних умов у дозі 2 мл/щура.

Упродовж дослідів спостерігали за клінічним станом та поведінкою експериментальних тварин. За умов легкого хлороформного наркозу по 5 щурів з кожної групи декапітували й відбирали зразки крові для гематологічних і біохімічних досліджень; зразки органів – для визначення вмісту Купруму, Феруму та Мангану, порівнюючи з показниками тварин контрольної групи.

Біохімічні показники функціонального стану прокаріотичних клітин за контактної взаємодії з NPMe та після ліофілізації/регідратації. У цій серії дослідів визначали вплив NPMe на клітини *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. і

Pasteurella spp. виробничих штамів після їх ліофілізації/регідратації. Біомасу нативних (контроль) та після ліофілізації/регідратації бактеріальних клітин із дотриманням умов асептики накопичували на стандартних поживних середовищах до певного виду мікроорганізмів. Ліофільне висушування та регідратацію біомаси клітин мікроорганізмів проводили згідно з ISO 13408–3:2006 за стандартною процедурою. Біомасу бактеріальних клітин культивували на поживному середовищі з вмістом NPAu та NPAg розміру ~30 нм у вихідній концентрації 19,3 мкг/мл і 86,4 мкг/мл за металом (1:4), за температури 37 ± 1 °C; час інкубації – 30–40 хв.

Експериментальне обґрунтування застосування NPAu під час отримання біомаси клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2. Біомасу бактеріальних клітин на поживному середовищі з вмістом NPAu розміру ~19 нм у вихідній концентрації 19,0 мкг/мл за металом у діапазоні розведень 1:2–1:20; за температури 37 ± 1 °C; час інкубації – 20–24 год. Інтенсивність накопичення біомаси оцінювали за рівнем КУО/мл методом десятичних граничних розведень від 10^{-1} до 10^{-15} та виражали в lg.

Методи дослідження.

Фізико-хімічні методи. Колоїдні дисперсії дослідних зразків NPMe отримували методом хімічної конденсації відновленням відповідних солей металів: AuK, AgNO₃, FeCl₃, CoCl₂, (CuSO₄•5H₂O), ZnCl₂, KMnO₄, у водному середовищі з використанням стабілізаторів (Перцов А. В., 1976). Розмір NPMe обчислювали методом лазерно-кореляційної спектроскопії на спектрометрі Zetasizer–3 (Malvern Instruments Ltd, Велика Британія) за визначенням константи швидкості дифузії та гідродинамічного діаметра частинок (Rawle A., www.malvern.co.uk).

Методи препаративної й аналітичної біохімії. Отримання сумарних мембранних фракцій (СМФ) прокаріотичних клітин. Ізольовані СМФ клітин одержували, як описано (Карамушка В. И. с соавт., 1991), за схемою: ресуспендування клітин у середовищі виділення (0,25 М сахароза, 25 мМ Трис-НСl, 2 мМ ЕДТА, рН 7.4), оброблення ультразвуком (УЗДН–1, 22 кГц, сила анодного струму 0,4–0,7 А, резонансні умови), диференційне центрифугування при 10 000 g, збирання осаду, ресуспендування у середовищі (10 мМ Трис-НСl, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ дитіотрейтол, рН 7.4).

Отримання цитозольної і сумарної мембранної фракцій евкаріотичних клітин. Виділення субклітинних фракцій проводили, як описано (Маянский Н. Я. с соавт., 2004; Трахтенберг І. М. зі співавт., 2013), за схемою: ресуспендування клітин у буфері для екстракції цитозолу (50 мМ Трис-НСl, 10 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ЕДТА, 1 % тритон X-100, 10 % гліцерин, рН 7.5), центрифугування при 16000 об./хв, збирання надосаду як цитозольної фракції; ресуспендування осаду на льоду в середовищі (20 мМ Трис-НСl, 3 мМ MgCl₂, рН 7.4) упродовж 10 хв за постійного перемішування, центрифугування при 10 000 g, збирання осаду як СМФ клітин.

Препарати субклітинних фракцій характеризували за вмістом білка методом (Lowry O. H. et al., 1951); зберігали за температури мінус 20 ± 1 °C.

Мікробіологічні методи. Культивування прокаріотичних клітин.

Біомасу бактеріальних клітин культивували на поживних середовищах: рідкому (МПБ, бульйон Хоттінгера) та щільному (МПА, агар Хоттінгера) з умістом амінного азоту 100–120 мг%, рН 7.4. Концентрація мікробних клітин у біомасі *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. і *Pasteurella* spp. становила 20,0–30,0 млрд КУО/мл, життєздатних спор *Bacillus* spp. – 11–12 млн КУО/мл відповідно.

Культивування еукаріотичних клітин. Клітини лінії U937 культивували в середовищі RPMI 1640, що містить 10 % ембріональної сироватки ВРХ, лінії СНО-K1 – у середовищі F10, що містить 5 % ембріональної сироватки ВРХ; за температури 37 ± 1 °С у CO₂-інкубаторі в атмосфері 5 % CO₂ до титру $5 \cdot 10^6$ кл/мл. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою фарбування з використанням 0,3 % розчину трипанового синього.

Цитогенетичні методи. Генотоксичну дію NPMе визначали за ступенем пошкодження ДНК – методом лужного гель-електрофорезу ізольованих еукаріотичних клітин («ДНК-кометний» тест), як описано (Collins A. R., 2004; Дурнев А. Д. с соавт., 2006), проводили аналіз параметрів ДНК-комет, обчислювали індекс ДНК-комет (I_{ДНК}).

Мутагенну дію NPMе визначали за анафазним методом підрахунку хромосомних аберацій та мітотичного індексу (I_{MIT}) в апікальній меристемі *Allium cepa* (Рахманін Ю. А., 2007).

Визначення показників структурно-функціонального стану клітин.

Інтенсивність накопичення біомаси бактеріальних клітин визначали в динаміці 25 год за оптичною густиною їх суспензії через проміжки часу за довжини хвиль 590–640 нм, виражали в КУО/мл.

Інтенсивність дихальної активності бактеріальних клітин (питома DA) визначали вимірюванням утвореного ендогенного O₂ в середовищі інкубації (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, Трис-НСl, рН 7.8) за допомогою O₂-чутливого електрода типу Кларка (МО 128, Mettler Toledo, Швейцарія) у динаміці 5 хв за температури 28 ± 1 °С, обчислювали середню швидкість поглинання O₂ клітинами за 1 хв із розрахунку на 1 мг сухої біомаси.

Питому H⁺-АТР-азну активність (К. Ф. 3.6.3.6) мембранної фракції бактеріальних клітин визначали, як описано (Прохорова М. И., 1989; Трахтенберг І. М. зі співавт., 2013), 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) упродовж 10 хв; за довжини хвилі 680 нм.

Na⁺, K⁺-АТР-азну активність (К. Ф. 3.6.1.3) мембранної фракції еукаріотичних клітин визначали, як описано (Прохорова М. И., 1989; Трахтенберг І. М. зі співавт., 2013), 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) упродовж 10 хв; за довжини хвилі 680 нм.

АТР-азну активність виражали у $\frac{\text{нмоль} P_i}{\text{хв} \cdot \text{мгбілка}}$ та відносних одиницях (A/A₀, %). Контролем на неферментативний гідроліз АТР слугувало середовище інкубації за відсутності СМФ, на P_i – із вмістом СМФ.

ЛДГ-азну активність (К. Ф. 1.1.1.27) цитозольної фракції еукаріотичних клітин визначали, як описано (Прохорова М. И., 1989), за швидкістю окиснення NADH/H⁺ впродовж 3–5 хв за довжини хвилі 340 нм, у середовищі інкубації (50 мМ К-фосфатний буфер, 0,3 мМ Na-піруват, 9 мМ NADH, рН 7.5); виражали у мкмоль NADH/хв•мг білка та в А/А₀.

Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у мембранних фракціях бактеріальних клітин і плазмі крові визначали за рівнем утворення його продуктів: первинних – дієнових кон'югатів (ДК) і кінцевих – малонового діальдегіду (МДА) за умов екстракції у суміші гептан–ізопропанол (1:1) за методикою В. Б. Гаврилова і М. І. Мішкорудної (1985); за довжини хвиль 233 і 247 нм; значення ДК виражали у мкмоль/л, а МДА – в одиницях питомого поглинання у 1,0 мл (ΔD /мл).

Інтенсивність процесів окиснювальної модифікації білків у мембранних фракціях бактеріальних клітин і плазмі крові визначали за рівнем утворення карбоксильних похідних нейтрального (НХ) та основного характеру (ОХ) за методикою О. І. Арчакова і І. М. Михосоева (1998), яка ґрунтується на здатності радикальних залишків аліфатичних амінокислот утворювати альдегідні й кетонні групи та 2,4-динітрофенілгідразони; за довжини хвиль 370 і 430 нм; виражали у ммоль/г білка за 1 год.

Каталазну активність (К. Ф. 1.11.1.6) у мембранних фракціях бактеріальних клітин і плазмі крові визначали, як описано (Королюк М. А., 1988), з використанням Н₂О₂ у середовищі інкубації (0,04412 N розчин Н₂О₂, 0,01 N розчин КН₂РО₄, 0,1 М Трис-НСІ буфер, рН 7.4, 4,5 % розчин амонію молібденовокислого); за температури 37±1 °С; за довжини хвилі 410 нм; виражали у мкмоль Н₂О₂/л за 1 хв.

Рівень показника загальної антиокиснювальної активності у мембранних фракціях бактеріальних клітин і плазмі крові визначали, як описано (Клебанов Г. И., 1988), за сумарною здатністю структурних антиоксидантів гальмувати накопичення ТБК-активних продуктів, індукованого в середовищі 25 мМ FeSO₄ у 0,002 N НСІ; за довжини хвилі 535 нм; виражали у % інгібіції утворення ТБК-активних продуктів.

У плазмі крові щурів визначали рівень загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну, глюкози, активність аспартатамінотрансферази (АсАТ, К. Ф. 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ, К. Ф. 2.6.1.2), лужної фосфатази (ЛФ, К. Ф. 3.1.3.1) і γ -глутамілтранспептидази (ГГТП, К. Ф. 2.3.2.2) з використанням наборів реактивів виробництва CORMAY (Польща) та НВП «Філісіт-Діагностика» (Україна). Концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси визначали, як описано (Гриневич Ю. А., 1981), осаджуванням білкових комплексів антиген-антитіло ПЕГ-6000; серомукоїдів, як описано в довіднику (Меньшиков В. В. зі співавт., 1987); за довжини хвиль 260 і 280 нм; виражали у мг/мл. Реєстрацію біохімічних показників здійснювали на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1800 (Японія).

Гематологічні дослідження. У крові щурів визначали рівень гемоглобіну гемоглобінціанідним методом із ацетонціангідрином, кількість еритроцитів – за інкубацією у 2,8 % NaCl, кількість лейкоцитів – підрахунком клітин у лічильній камері Горяєва, як описано в довідниках (Меньшиков В. В. зі співавт., 1987; Влізло В. В. зі співавт., 2012).

Метод рентгенофлуоресцентного аналізу. Вміст металів у органах тварин визначали рентгенофлуоресцентним аналізом на Спектроскан-МАКС (РФ) згідно з методичними рекомендаціями (Малинін О. О., Куцан О. Т., 2009), який ґрунтується на здатності мінералізованого зразка утворювати флуоресцентні спектри у рентгеновському діапазоні, що відображають його елементний склад.

Клінічні методи досліджень. Спостереження за лабораторними тваринами проводили згідно з методичними рекомендаціями (Коцюмбас І. Я. зі співавт., 2005); вагові коефіцієнти органів обчислювали, як описано (Косенко М. В. зі співавт., 2007).

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакета прикладних програм Microsoft Excel 2003 (for Windows XP). Вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Ст'юдента. Для одержання статистично вірогідних результатів під час виконання досліджень на культурах клітин і субклітинних фракціях зазначені параметри визначали у 5-разовій повторності з трьома паралельними зразками.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Цитологічні та біохімічні маркери безпечності NPMe в експериментах *in vitro* (генотоксичність, мутагенність, ензиматична активність). З'ясовано, що NPAu розміру ~30 і ~45 нм, NPAg – ~30 нм, NPFe – ~100 нм, NPCu – ~70 нм і NPMnO₂ – ~50 нм у вивчених концентраціях не чинили генотоксичного впливу на генетичний апарат тест-клітин лінії CHO-K1. У цих випадках не зафіксовано первинних ДНК-пошкоджень за відсутністю апоптичних ДНК-комет, а рівень показників «% ДНК у хвості» та I_{ДНК} статистично не відрізнявся від такого у «негативному» контролі (рис. 2, д, ж, з, к, л, м, 3, а).

Метаболіти, які є продуктами біотрансформації потенційних генотоксикантів, можуть виявляти генотоксичність, тому для відтворення методу ДНК-комет використовували систему метаболічної активації S9 (Collins A. R., 2004).

Так, значення показника «% ДНК у хвості» ДНК-комет тест-клітин за дії NPAu розміру ~30 і ~45 нм за наявності фракції S9 були на рівні «негативного» контролю – 1,6 і 0,6 % проти 1,0 % (рис. 2, з, м).

Дослідні зразки NPAu розміру ~10 і ~20 нм та NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] і NPZn – ~100 нм у вивчених концентраціях призводили до утворення апоптичних ДНК-комет з моментом «хвоста» (рис. 3, б, в).

Рівень показника I_{ДНК} за дії NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] і NPZn наближався до такого у «позитивному» контролі (3,4; 3,1 і 3,6 проти 3,9), на підставі чого їх

можна вважати промутагенами, яким властиво утворювати ДНК-адукти, алкіловану ДНК (Деклараційний патент України на корисну модель № 48540, опубл. 25.03.2010 р.).

Визначено, що за дії NPCo , $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ і NPZn мітотичні процеси в апікальній меристемі *Allium scera* уповільнювалися: рівень показника I_{MIT} знижувався в середньому в 2,9; 2,4 і 4,0 разу, а кількість аберантних клітин зростала – у 5,3; 3,9 і 9,3 разу ($P < 0,05$) щодо їх контрольних значень.

Поряд із визначеною генотоксичністю отримані результати вказують на мутагенну дію цих NPMe . Далі тестували ензиматичну активність субклітинних фракцій еукаріот лінії CHO-K1 і лінії U937 .

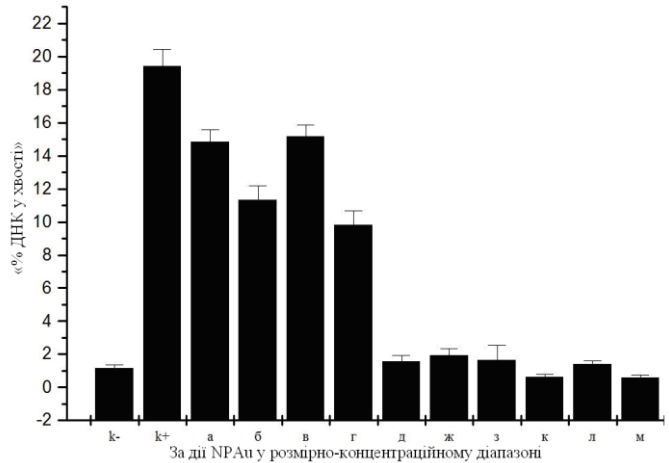


Рис. 2. Рівень показника «% ДНК у хвості» ДНК-комет клітин лінії CHO-K1 за дії NPAl у розмірно-концентраційному діапазоні (К- – «негативний» контроль (інтактні клітини); К+ – «позитивний» контроль (за дії N -нітрозометилсечовини); варіанти NPAl : а – ~ 10 нм, $11,06$ мкг/мл; б – ~ 10 нм, $11,06 \cdot 10^{-5}$ 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 у 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 у системі $S9$)

Примітки: тут і далі у рис. 4–12: $M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$ – щодо контролю.

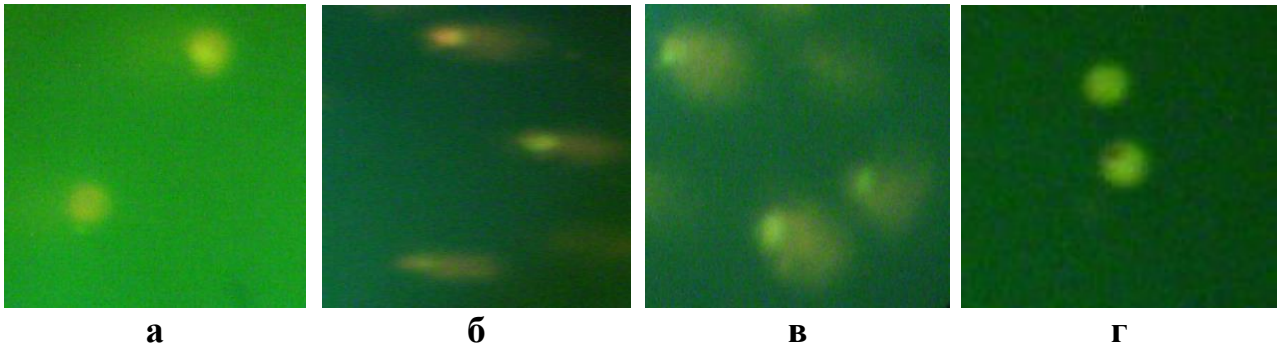


Рис. 3. Електрофореграма «ДНК-комет» клітин CHO-K1 за дії NPAl (а), апоптичних ДНК-комет із моментом «хвоста» за дії $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (б) і NPCo (в) порівняно з «ДНК-кометами» інтактних клітин CHO-K1 (г) («негативний» контроль) (флуоресцентна мікроскопія; «ЛЮМАМ Р8»; збуджувальний фільтр 490 нм, дихроїчне дзеркало 510 , відтинаючий фільтр 530 нм, збільшення $(200-400)$)

За дії NPAl , NPFe , NPCu та NPMnO_2 на мембранну фракцію клітин лінії CHO-K1 не реестрували вірогідного гальмування Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності, тоді як за дії NPCo , $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ і NPZn виявляли її зниження в середньому на 22,3; 26,1 і 10,8 % ($P < 0,05$) щодо контрольних значень ензиму (рис. 4).

За дії всіх NPMe на цитозольну фракцію тест-клітин вірогідних змін ЛДГ-азної активності не виявляли за винятком її посилення за впливу $\text{NPCo}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ на 10,8 % ($P < 0,05$) щодо її контрольного рівня.

Виявлено залежність величини Na^+ , K^+ -АТР-азної активності мембранної фракції клітин лінії U937 від розміру NPАu (рис. 5, а): за розміру ~ 10 нм визначали її інгібіцію до 70 %, а за ~ 30 і ~ 45 нм – збільшення на 20–40 % ($P < 0,05$) щодо контролю.

За дії NPАu розміру ~ 10 , ~ 20 і ~ 30 нм реєстрували підвищення рівня ЛДГ-азної активності цитозолі (рис. 5, б) в 1,5–4,5 рази, а розміру ~ 45 нм – зниження в 5,0 разів ($P < 0,05$) щодо її контрольного рівня.

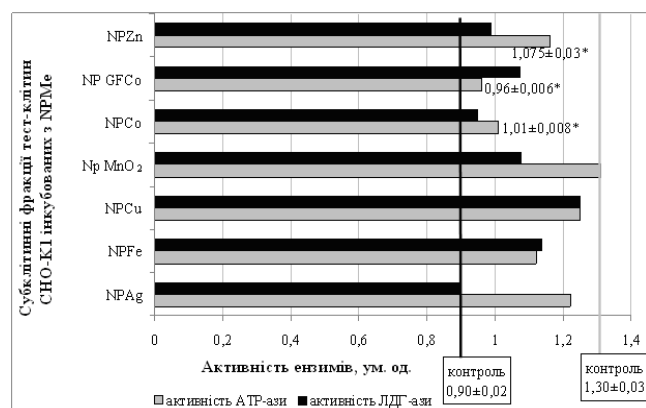
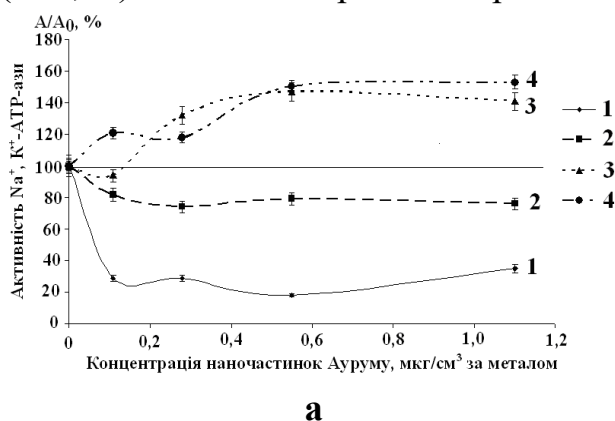


Рис. 4. Рівень мембранної Na^+ , K^+ -АТР-азної та цитозольної ЛДГ-азної активності клітин лінії СНО-К1 за дії NPMe, ум. од.

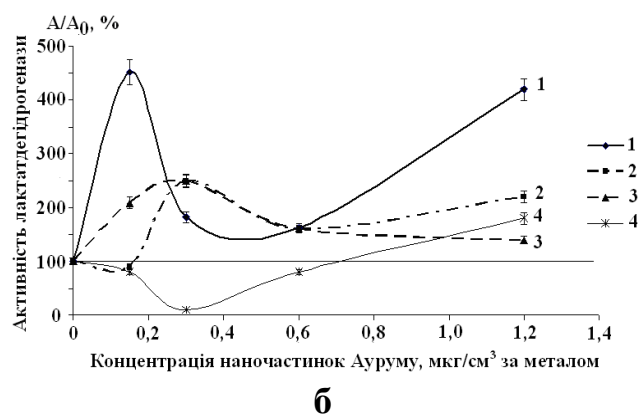


Рис. 5. Рівень мембранної Na^+ , K^+ -АТР-азної (а) та цитозольної ЛДГ-азної (б) активності тест-клітин лінії U937 за дії NPАu розміру, A/A_0 , % (1 – ~ 10 нм, 2 – ~ 20 нм, 3 – ~ 30 нм, 4 – ~ 45 нм)

Примітка. Тут і далі у рис. 6, 10–12: за 100 % прийнято величину ензиматичної активності інтактних клітин (контроль – A_0).

Отже, результати тестування цитогенетичних і біохімічних маркерів токсичної дії дослідних NPMe дають змогу припустити наявність первинних ДНК-пошкоджень у генетичному апараті та структурних змін у субклітинних фракціях евкаріот за інтенсивної акумуляції NPСo, NPСo[Fe(CN)₆] і NPZn розміру ~ 100 нм та NPАu – ~ 10 і ~ 45 нм, що, очевидно, зумовлено їх здатністю проникати крізь пори клітинної мембрани та ядерної мембрани відповідно, і безпосередньо взаємодіяти з молекулою ДНК (Rout M. P., 2001).

Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних показників у мембранних фракціях клітин *Escherichia spp.* за дії NPMe залежно від розміру частинок. Інший рівень організації прокаріотичних клітин порівняно з евкаріотичними втілюється в органій спеціалізації метаболічних процесів, через яку вони можуть активно контактувати з металами та слугувати модельною системою для вивчення їх взаємовідносин (Ульберг З. Р., 2008; Dukhin A. S. et al., 2010). Через перебудову метаболічних реакцій така взаємодія не завжди корисна для мікроорганізмів.

Характер дії дослідних NPMe на інтенсивність процесів ліпопероксидації і окисної модифікації білків у мембранних фракціях клітин *E. coli* різних штамів виявив розмірну залежність (табл. 1).

За дії NPAu розміру ~20 і ~45 нм та NPAg ~30 нм на СМФ клітин штаму 57 призводив до підвищення рівня продуктів ПОЛ – ДК і МДА в середньому – на 10,3 і 33,3 %, на 157,4 і 112,5 % та на 99,4 і 90,0 % ($P < 0,05$) щодо їх контрольних значень.

Таблиця 1

Інтенсивність процесів ПОЛ і ОМБ у мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів за дії NPAu і NPAg у діапазоні розмірів ($M \pm m$; $n=5$)

Показник	СМФ нативних клітин (контроль)	За преінкубації СМФ з NPMe розміру, нм			
		NPAu ~20 нм	NPAu ~30 нм	NPAu ~45 нм	NPAg ~30 нм
<i>E. coli</i> штам 57					
ДК, мкмоль/л	31,00±1,50	34,20±0,90*	30,20±1,90	79,8±2,5*	61,8±4,05*
МДА, ΔD/мл	4,80±0,20	6,40±0,30*	4,96±0,35	10,2±1,0*	9,12±0,45*
НХ, ммоль/г білка	2,12±0,05	2,61±0,07*	1,93±0,01	2,81±0,05*	1,44±0,01*
ОХ, ммоль/г білка	1,06±0,02	1,52±0,03*	0,92±0,01*	1,48±0,03*	0,98±0,01
<i>E. coli</i> штам 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/мл	7,20±0,52	2,0±0,12*	0,6±0,02*	1,44±0,10*	1,66±0,25*
НХ, ммоль/г білка	4,17±0,20	3,04±0,05*	4,12±0,50	4,40±0,41	1,38±0,01*
ОХ, ммоль/г білка	2,98±0,12	1,94±0,11*	2,82±0,52	2,10±0,15*	0,92±0,01*
<i>E. coli</i> штам 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/мл	3,20±0,09	3,40±0,20	3,60±0,48	3,40±0,08	3,60±0,18
НХ, ммоль/г білка	1,30±0,18	0,86±0,04*	0,91±0,06*	0,37±0,01*	0,60±0,02*
ОХ, ммоль/г білка	0,80±0,01	0,44±0,02*	0,61±0,03*	0,30±0,01*	0,36±0,01*
<i>E. coli</i> штам 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/мл	4,40±0,25	4,40±0,30	3,60±0,30*	4,00±0,32	3,80±0,06*
НХ, ммоль/г білка	3,20±0,08	3,88±0,15*	1,19±0,02*	1,06±0,04*	1,37±0,09*
ОХ, ммоль/г білка	1,43±0,04	1,65±0,07*	0,55±0,01*	0,53±0,01*	0,71±0,04*

Примітки: тут і у табл. 2: * – різниця значень показників вірогідна при $P < 0,05$, ** – при $P < 0,01$; *** – при $P < 0,001$ щодо їх контрольного рівня (нативні клітини); ДК – дієнові кон'югати; МДА – малоновий діальдегід; НХ – карбоксильні похідні нейтрального характеру; ОХ – карбоксильні похідні основного характеру.

За дії NPAu розміру ~20 нм та ~45 нм на мембранні фракції цього штаму визначали збільшення вмісту карбоксильних похідних ОМБ нейтрального й основного характеру в середньому – на 23,1 і 43,4 % та на 32,6 і 39,6 % ($P < 0,05$), а за дії NPAu та NPAg розміру ~30 нм, навпаки, його зниження ($P < 0,05$) щодо контрольного рівня показників.

У СМФ клітин *E. coli* інших штамів виявляли уповільнення процесів ПОЛ: зниження вмісту ДК і МДА у СМФ штаму 25 за дії NPAu та NPAg у всіх вивчених розмірах (у 3,6 і 6,3 разу); у СМФ штаму 20 – тільки розміру ~30 нм (на 14,3 і 15,9 %; $P < 0,05$) відповідно щодо контролю.

У СМФ клітин *E. coli* штамів 25, 24 і 20 за дії NPАu і NPАg у всіх вивчених розмірах визначали гальмування інтенсивності процесів ОМБ: зниження вмісту карбоксильних похідних НХ варіювало в межах 1,37–3,01 і 2,20–3,02 разу, а ОХ – 1,30–2,70 і 2,01–3,24 разу ($P < 0,05$) відповідно. Вийняток становило нагромадження похідних НХ та ОХ у мембранних фракціях штамів 57 і 20 за дії NPАu розміру ~ 20 нм – на 23,1 і 21,3 % та на 43,4 і 15,4 %, розміру ~ 45 нм для штаму 57 – на 32,5 та 39,6 % ($P < 0,05$) відповідно щодо контрольних значень показників.

Рівень загальної АОА штамів 25, 24 і 20 за дії NPАu та NPАg в діапазоні розмірів збільшувався у середньому в 3,0, 1,8 і 1,3 разу та в 3,0, 2,0 і 1,7 разу ($P < 0,05$) відповідно щодо її контрольних значень (рис. 6).

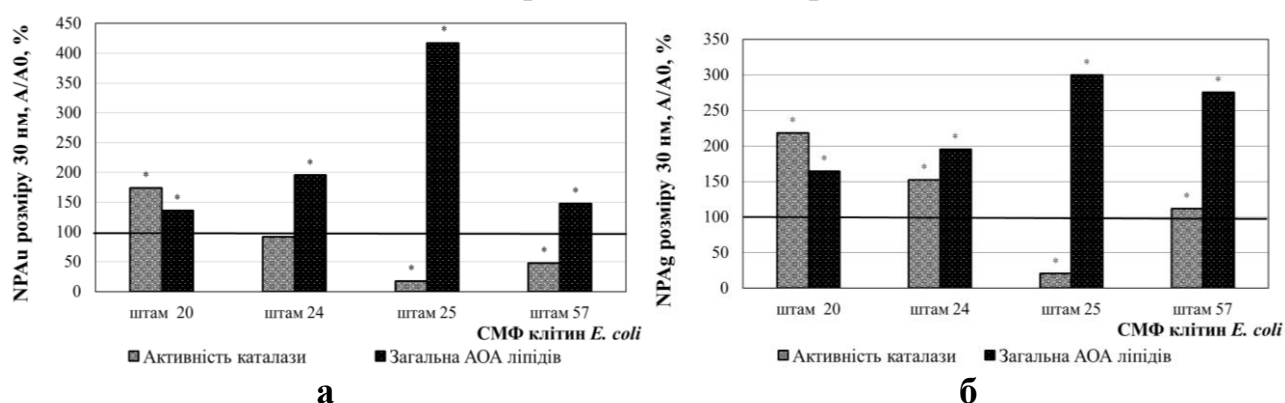


Рис. 6. Каталазна активність та загальна АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів за дії NPАu (а) і NPАg (б) розміру ~ 30 нм, А/А₀, %

У мембранних фракціях клітин штаму 57 збільшення значень цього показника реєстрували за впливу NPMe лише розміру ~ 30 нм ($P < 0,05$).

За дії NPАu всіх розмірів (рис. 6, а) та NPАg розміру ~ 30 нм (рис. 6, б) на мембранні фракції штаму 25 визначали гальмування каталази у середньому в 5,0 і 4,9 разу ($P < 0,05$) відповідно. За дії NPАu та NPАg у вивчених розмірах на мембранні фракції штамів 24 і 20 та 57, 24 і 20, навпаки, виявляли посилення ензиматичної активності в середньому в 1,6 разу ($P < 0,05$) відповідно.

Визначений фізіологічний або уповільнений рівень процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків у СМФ клітин *E. coli* (штами 25, 24, 20) за впливу NPMe розміру ~ 30 нм, можна пояснити адаптаційною індукцією структурних ендогенних антиоксидантів (аскорбат, SH-групи, GSH, церулоплазмін, цитохром, металотіонеїни тощо) та компенсаторним витрачанням ензиматичної ланки АОС.

Як опосередковано, так й безпосередньо, через процеси нормалізації вільнорадикального окиснення активно блокується цитолітичний синдром, тобто NPMe в цьому розмірі можуть виступати як антиоксиданти – «пастки» радикалів (Prulutska S. V. et al., 2008; Фальфушинська Г. І. зі співавт., 2013).

Вища інтенсивність процесів ПОЛ (штам 57) і ОМБ (штами 57, 20) у мембранних фракціях клітин за дії NPАu розмірів ~ 20 і ~ 45 нм та NPАg розміру ~ 30 нм зумовлена, очевидно, їх прооксидантним впливом. Отже, цитотоксична дія NPMe є розмірнозалежною та індивідуальною для різних штамів мікроорганізмів у межах одного таксономічного виду.

Рівень питомої H^+ -АТФ-азної активності мембранної фракції і дихальної активності клітин *Escherichia spp.* та *Salmonella spp.* за дії NРМе у розмірно-концентраційній залежності. Одним із чинників, що спричинює інгібіцію клітинної активності й ушкодження цілісності мембран агресивними агентами довкілля, є їх дія на параметри рівня енергізації бактеріальної клітини (Данилович Г. В. зі співавт., 2004; Kushkevych I. V., Antonyak H. L., 2014). Доведено, що NРАu розмірів ~ 30 і ~ 45 нм і NРАg розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій 0,07–1,16 і 0,16–2,59 мкг/мл за металом властиво посилювати H^+ -АТФ-азну активність мембранної фракції клітин *E. coli* штамів 57, 25, 24, 20 і 4 у межах 15,5–33,0 % ($P < 0,05$) щодо її контрольних значень.

За взаємодії NРАu і NРАg розміру ~ 30 нм у діапазоні концентрацій 0,24–0,97 і 0,54–2,16 мкг/мкг білка за металом з мембранною фракцією клітин штамів *S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* 34 і М визначали збільшення величини H^+ -АТФ-азної активності в межах 14,2–76,9 % ($P < 0,05$) щодо контролю.

Поряд з цим, за інкубації NРАu і NРАg з клітинами тільки штамів *S. Dublin* і *S. Enteritidis* 34 реєстрували підвищення рівня питомої ДА в середньому на 31,2 і 10,3 % ($P < 0,05$) щодо контрольних значень показника. Для клітин штамів *S. Typhimurium* і *S. Enteritidis* М не виявляли зміни рівня ендогенного дихання за дії NРМе, що дає змогу припустити визначальну роль H^+ -АТФ-азної активності у формуванні величини різниці електрохімічного потенціалу на мембрані клітин цих штамів.

З'ясування безпечності NРМе ускладнюється тим, що системна відповідь організму може значно відрізнятись від результатів, отриманих в експериментах на ізольованих клітинах та їх фракціях. Тому на підставі тестування NРАg, NРFe, NРCu і NРMnO₂ в експериментах *in vitro* визначали вплив суміші цих NРМе на організм білих щурів.

Біохімічна характеристика токсичної дії та біосумісності суміші NРМе на організм білих щурів порівняно з солями відповідних металів у гострому експерименті. 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 NРМе у дозах 0,3; 1,0; 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла (I, III, IV і V групи) знаходився у фізіологічних межах: тварини були рухливими, адекватно реагували на зовнішні подразники. Загибелі тварин за весь термін спостереження не фіксували.

Визначаючи коефіцієнти маси внутрішніх органів щурів з'ясували, що «органами-мішенями» за впливу NРМе є селезінка і легені, опосередковано – серце, печінка і нирки, а за впливу солей металів – серце та селезінка; «органами-концентраторами» для NРМе – за збільшенням вмісту Cu є нирки та печінка, Fe – селезінка й легені та Mn – печінка щурів ($P < 0,05$) порівняно з їх іонною формою, що може бути пов'язане з необхідністю використання елементів у функціонуванні цих органів.

Виявлено, що за одноразового введення щурам суміш NРМе у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла спричиняла токсичну дію, яка виражалася на 3-тю і 7-му

добі досліджу в гіперглікемії на тлі посилення сечовиноутворення (за підвищення вмісту глюкози і сечовини на 26,8 і 28,3 %). Починаючи з 3-ї та до 14-ї доби, у плазмі крові щурів цих груп реєстрували гіперферментемію АсАТ і ГГТП (на 61,0 і 53,0 %) та гіпоферментемію АлАТ і ЛФ (на 29,9 і 21,7 %), альбумінемію (до 17,0 %) на тлі фізіологічного рівня загального білка, лейкоцитоз поряд із еритроцитопенією (зростання кількості лейкоцитів та зменшення еритроцитів на 34,3 та 38,2 %), індукцію каталази й зниження рівня показника загальної АОА (на 115,9 і 45,7 %); зниження вмісту ДК і МДА (на 17,9 і 31,5 %) на тлі нагромадження карбоксильних похідних НХ і ОХ (на 16,8 і 22,3 %), ЦК середньої молекулярної маси та гострофазних білків серомукоїдів (на 50,8 і 30,5 %; $P < 0,05$). Одержані дані свідчать про цитотоксичну дію суміші NРМе у дозах 1,0 і 4,0 мг/кг маси тіла, що може бути наслідком порушення цілісності мембран гепатоцитів через розвиток оксидативного стресу та ілюструє вибіркочув дозову тропність металів у нанодисперсній формі.

За введення NРМе у дозі 0,3 мг/кг переважала функціональна кумуляція (за нижчого вмісту Cu, Fe і Mn у печінці, ($P < 0,05$)), тоді як при дозі 4,0 мг/кг маси тіла – матеріальна, яка зберігалась до 14-ої доби (за вищого вмісту Cu, Fe і Mn у більшості органів ($P < 0,05$)); у формі солей – метали всмоктувались раніше за часом (на 3-тій добу), у більшій кількості, але нетривалий час. Тобто, суміш NРМе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла є біосумісною та має вищу біодоступність ніж метали в іонній формі. Результати одноразового впливу NРМе не можуть остаточно ілюструвати їх потенційну небезпечність, оскільки деякі клініко-біохімічні показники крові щурів наприкінці досліджу не поверталися до фізіологічного рівня.

Біохімічна характеристика токсичної дії та біосумісності суміші NРМе на організм білих щурів порівняно з солями відповідних металів у хронічному експерименті. Характер спрямованості змін метаболічних показників щурів дослідних груп за хронічного (90-добового) надходження суміші солей металів у дозі 0,3 мг/кг та суміші NРМе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла виявився подібним до такого за одноразового впливу.

Унаслідок хронічного впливу NРМе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла у крові щурів, починаючи з 15-ї і до 60-ї доби, фіксували поступове зростання кількості лейкоцитів (до 27,5 %) та зниження кількості еритроцитів (до 21,9 %), починаючи з 30-ї доби досліджу, – вмісту гемоглобіну (на 22,5 %; $P < 0,05$). На 60-ту і 90-ту доби в плазмі крові тварин цієї групи реєстрували зниження вмісту загального білка (на 11,2 і 15,7 %), підвищення рівня утворення ЦК середньої молекулярної маси та серомукоїдів (на 36,1 та 62,8 %; $P < 0,05$) відповідно щодо контролю, що вказує на розвиток у організмі щурів імуносупресії та запальних реакцій.

У крові щурів I і II груп статистичних змін гематологічних показників і показників стану неспецифічної резистентності впродовж експерименту не виявлено, за винятком збільшення вмісту загального білка на 13,0 % ($P < 0,05$) на 60-ту добу від початку надходження суміші NРМе у дозі 0,3 мг/кг маси тіла.

Хронічний вплив суміші металів у різних дисперсних формах спричиняв у крові щурів різноспрямовані зміни інтенсивності процесів ПОЛ. У плазмі крові щурів, які отримували суміш солей металів (І група), на 60-ту й 90-ту доби досліджу реєстрували зростання вмісту ДК і МДА (на 29,9 і 34,8 % та на 50,3 і 28,0 %; $P < 0,05$) щодо їх контрольного рівня. За відсутності надлишкового утворення продуктів ПОЛ у плазмі крові тварин ІІІ групи на 15-ту добу досліджу зафіксовано нагромадження карбоксильних похідних НХ і ОХ (на 22,3 і 41,6 %), а з 30-ї доби – ДК і МДА (на 30,0 і 30,4 %; $P < 0,05$) відповідно щодо контролю.

У плазмі тварин, які отримували суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг (ІІ група), на 90-ту добу визначали зниження рівня лише ДК в середньому на 15,9 %, а у дозі 4,0 мг/кг маси тіла (ІІІ група), починаючи з 30-ї доби досліджу, вмісту ДК і МДА – на 30,0 і 30,4 % ($P < 0,05$) відповідно щодо їх контрольних значень.

У плазмі крові щурів І і ІІ груп вірогідних змін інтенсивності процесів ОМБ впродовж експерименту не спостерігали.

При дослідженні показників АОС за впливу суміші металів у обох дисперсних формах у дозі 0,3 мг/кг маси тіла реєстрували підвищення каталази (рис. 7, а): більш виражено та в усі терміни досліджень у щурів, які одержували солі металів, – від 25,3 до 49,2 % ($P < 0,05$) щодо контролю. За впливу суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла ензиматична активність, навпаки, з часом знижувалась щодо її контрольних значень, що на 15-ту, 30-ту і 60-ту доби становило 18,3; 25,9 та 22,9 % ($P < 0,05$) відповідно.

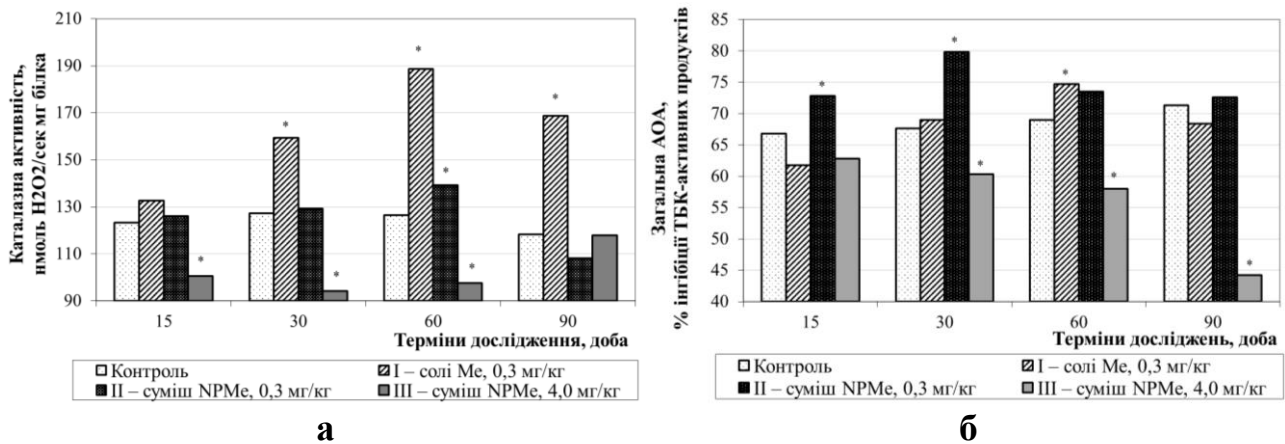


Рис. 7. Каталазна активність (а) і загальна АОА (б) у плазмі крові щурів у динаміці хронічного впливу суміші NPMe і суміші солей металів

Інший характер змін мав показник загальної АОА у плазмі крові щурів у динаміці хронічного експерименту (рис. 7, б). У плазмі крові тварин на 60-ту добу після задавання суміші солей металів реєстрували тенденцію до зростання рівня загальної АОА, а на 15-ту й 30-ту доби впливу суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла – на 9,0 та 18,1 % ($P < 0,05$) відповідно щодо контрольних значень показника. У плазмі крові щурів за впливу суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла, з 30-ї доби визначали поступове витрачання ресурсів АОС: найменші значення показника загальної АОА фіксували на 90-ту добу досліджу (на 38,0 %; $P < 0,05$) щодо контролю. Це є ознакою розвитку деструктивних процесів, пов'язане з денатурацією антиоксидантних ензимів токсичними продуктами окиснювальної модифікації білків та інших метаболітів.

На підвищення інтенсивності деструктивних процесів у печінці через розвиток оксидативного стресу за впливу NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла вказує динаміка ензимів у плазмі крові щурів. Поступову активацію АЛАТ і ЛФ у плазмі крові щурів реєстрували впродовж досліджу, рівень якої набував найвищих значень на 60-ту добу (на 96,8 і 69,1 %; $P < 0,05$) відповідно (рис. 8).

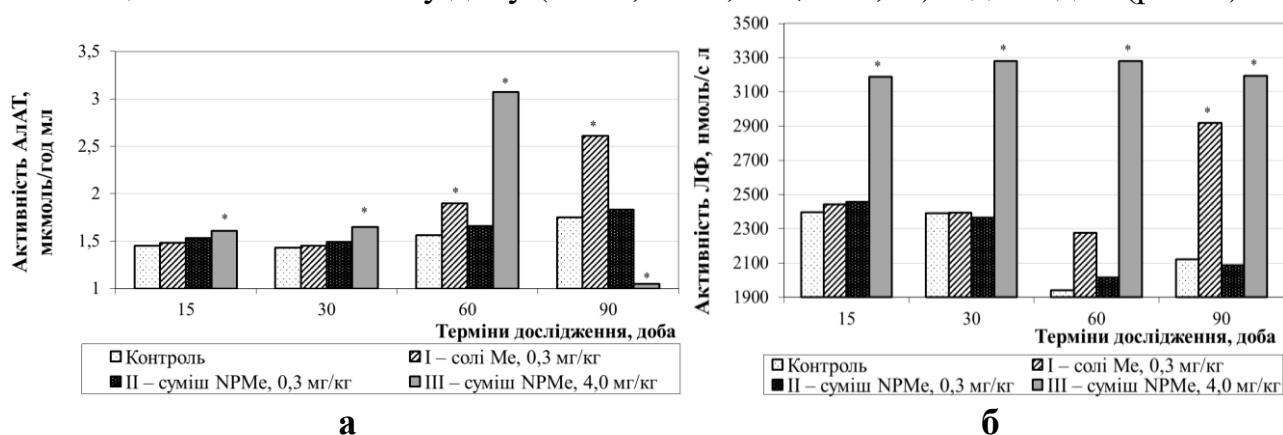


Рис. 8. Активність АЛАТ (а) і ЛФ (б) у плазмі крові щурів у динаміці хронічного впливу суміші NPMe і суміші солей металів

На цей час у плазмі крові щурів визначали найвищий рівень АсАТ і ГГТП (рис. 9) – 114,8 і 122,3 % ($P < 0,05$) щодо їх контрольних значень, що додатково вказує на кардіотоксичну дію NPMe. У щурів, яким задавали суміш солей металів, виявляли посилення активності АЛАТ, АсАТ, ГГТП – на 60-ту й 90-ту доби, а ЛФ (рис. 8) – лише на 90-ту добу досліджу ($P < 0,05$) відповідно.

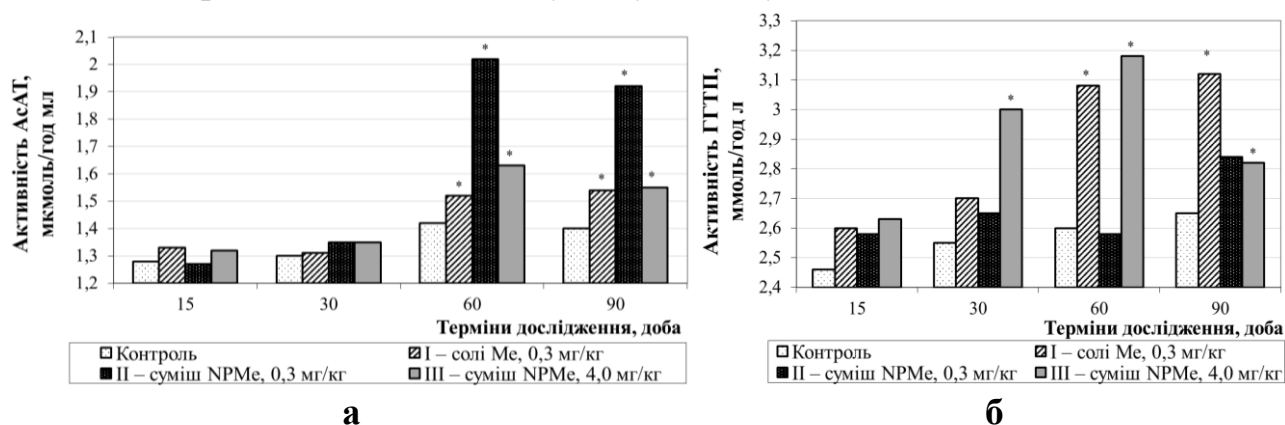


Рис. 9. Активність АсАТ (а) і ГГТП (б) у плазмі крові щурів у динаміці хронічного впливу суміші NPMe і суміші солей металів

У щурів, які одержували суміш NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла, на 60-ту й 90-ту доби визначали активацію АсАТ на 42,2 і 37,1 % ($P < 0,05$) та на 90-ту добу досліджу – незначну активацію ГГТП відповідно щодо контролю.

Уміст глюкози в плазмі крові щурів III групи зростав з 15-ї до 60-ї доби досліджу (до 36,1 %), а у тварин I і II груп був вищим за контрольні значення на 60-ту добу (на 26,8 і 21,5 %; $P < 0,05$) відповідно. При надходженні суміші NPMe у максимальній дозі та солей металів реєстрували зростання вмісту кінцевих продуктів білкового розкладу в плазмі крові щурів – сечовини (на 75,8 та 21,2 %), починаючи з 15-ї, і креатиніну (на 14,8 і 17,6 %; $P < 0,05$) – з 30-ї до 90-ї доби досліджу включно щодо контрольних значень показників. Це свідчить про

адаптаційну мобілізацію ресурсів енергетичного і пуринового обміну та превалювання катаболічних процесів над анаболічними внаслідок тривалого надходження металів у обох дисперсних формах та узгоджується з динамікою їх вмісту в органах щурів.

Виявлено (табл. 2), що вищу біодоступність мають NPMe порівняно з їх іонною формою у дозі 0,3 мг/кг маси тіла. На органотропність суміші NPMe вказує підвищення на 60-ту добу досліду їх вмісту в шлунку, тонкому кишечнику та плазмі крові (Cu, Fe і Mn) і зниження – у товстому кишечнику (Mn), печінці та нирках (Cu, Fe і Mn) щурів ($P < 0,05$).

Таблиця 2

Вміст Купруму, Феруму та Мангану в органах (мг/кг) і плазмі крові (мг/л) щурів на 60-ту добу впливу суміші NPMe і суміш солей металів

Орган/плазма крові	Контроль	I група (Суміш солей металів, 0,3 мг/кг)	II група (Суміш NPMe, 0,3 мг/кг)	III група (Суміш NPMe, 4,0 мг/кг)
Купрум				
Шлунок	3,76±0,03	4,27±0,02***	6,65±0,07***	5,94±0,07***
Тонкий кишечник	2,17±0,10	4,26±0,11***	4,33±0,14***	2,78±0,05**
Товстий кишечник	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
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***
Ферум				
Шлунок	40,58±0,57	38,42±0,55	38,68±0,80	42,50±1,20
Тонкий кишечник	28,31±0,38	36,22±0,89**	32,09±0,60*	27,54±0,70
Товстий кишечник	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***
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***
Манган				
Шлунок	1,53±0,09	1,43±0,03	8,18±0,42***	8,25±0,24***
Тонкий кишечник	3,72±0,15	3,42±0,09	8,32±0,30***	4,45±0,10*
Товстий кишечник	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
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***

На 90-ту добу досліду, за збільшенням вмісту металів ($P < 0,05$) у органах і плазмі крові дослідних щурів констатовано, що метали у формі солей і наночастинок у біотичній дозі виводяться 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), що свідчить про вищу активність наночастинок і значну роль цих органів у їх нагромадженні.

Максимальну вираженість метаболічних змін в організмі тварин за тривалої дії суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла виявляли на 30-ту добу, а солей металів – на 60-ту добу від початку надходження. Результати досліджень вказують на біосумісність і адаптогенну дію суміші NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла з оптимальним терміном задавання не більше 30 діб, вважати її біотичною

порівняно з солями металів (Деклараційний патент України на корисну модель № 92804, опубл. 10.09.2014 р.).

Отже, результати визначення цитологічних і біохімічних маркерів біосумісності NPMe на окремі клітини та цілісний організм за умов *in vitro* та *in vivo*, стали підґрунтям для з'ясування їх протективної дії через регуляторний вплив на структурно-функціональний стан прокариотичних клітин за різних умов культивування.

Інтенсивність накопичення біомаси клітин *Escherichia spp.*, *Pasteurella spp.* і *Salmonella spp.* за попереднього культивування з NPMe та після ліофілізації/регідратації. З'ясовано, що за введення NPAu та NPAg у середовище культивування у кінцевій концентрації 1,16 та 2,59 мкг/мл за металом значення показника КУО/мл зростали у регідратованих клітин *P. multocida* штамів 606 і 877 у середньому на 22,2 і 8,0 % та на 11,6 і 61,5 %, клітин *E. coli* 4, 20 і 57 – на 42,0; 21,7 і 22,8 % та на 36,4 і 8,1 % ($P < 0,05$) відповідно щодо його контрольного рівня. Унаслідок впливу NPAu і NPAg у концентраціях 0,24–1,93 і 0,27–2,16 мкг/мл за металом на інтенсивність приросту біомаси регідратованих клітин штаму *S. Dublin* 12 рівень КУО/мл підвищувався на 41,7 і 34,3 %, *S. Typhimurium* 16 – на 25,4 і 15,2 %, *S. Enteritidis* 34 – на 19,7 і 16,5 % та *S. Enteritidis* M – на 13,5 і 14,7 % ($P < 0,05$) відповідно.

Слід зазначити, що за впливу NPAu і NPAg реєстрували зниження показника КУО/мл регідратованих клітин *P. multocida* штаму 5 та за впливу NPAg – на *E. coli* штаму 25 у середньому на 24,7 і 9,0 % ($P < 0,05$) порівняно з його контрольним рівнем. Поряд з цим, NPMe за наднизьких і надвисоких концентрацій здатні виявляти бактеріостатичні ефекти щодо утворення клітин *Salmonella spp.* після ліофілізації/регідратації, а саме: за дії NPAu у концентраціях 0,12 і 1,93 мкг/мл та NPAg – 0,14 і 4,32 мкг/мл за металом.

Отже, отримані результати дають змогу стверджувати про здатність NPAu та NPAg розміру ~30 нм чинити як стимулювальну, так і бактеріостатичну дію на інтенсивність розмноження клітин *Pasteurella spp.*, *Escherichia spp.* та *Salmonella spp.* виробничих штамів (Деклараційний патент України на корисну модель № 72608, опубл. 27.08.2012 р.). Можна припустити, що один із механізмів, який визначає природу взаємодії NPMe з прокариотичною клітиною, полягає в механічній акумуляції та ґрунтується на фізико-хімічному їх зв'язуванні структурними компонентами біомембрани (Shukla R. et al., 2005; Dukhin A. S. et al., 2010; Johnston H. J. et al., 2010).

Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків та рівень антиоксидантних показників у мембранних фракціях клітин *E. coli* за попереднього культивування з NPMe та після ліофілізації/регідратації. Провідну роль ефективності ліофілізації/регідратації відіграє вихідний стан структурних компонентів біомембран, а надмірне утворення токсичних продуктів ПОЛ та деградованих білків є первинним маркером їх пероксидації та цитолітичного синдрому (Davies K. J. A., 1988; Дубинина Е. Е., 2008; Jia H. Y. et al., 2009).

Аналіз характеру впливу NP Au та NP Ag на рівень утворення продуктів ПОЛ у мембранах клітин *E.coli* показав його розмірну залежність (рис. 10, на прикладі штамів 25 і 57). За впливу NP Au і NP Ag у СМФ регідратованих клітин *E.coli* штамів 25, 24 і 20 фіксували зниження інтенсивності процесів ПОЛ до контрольних значень його продуктів ($P < 0,05$).

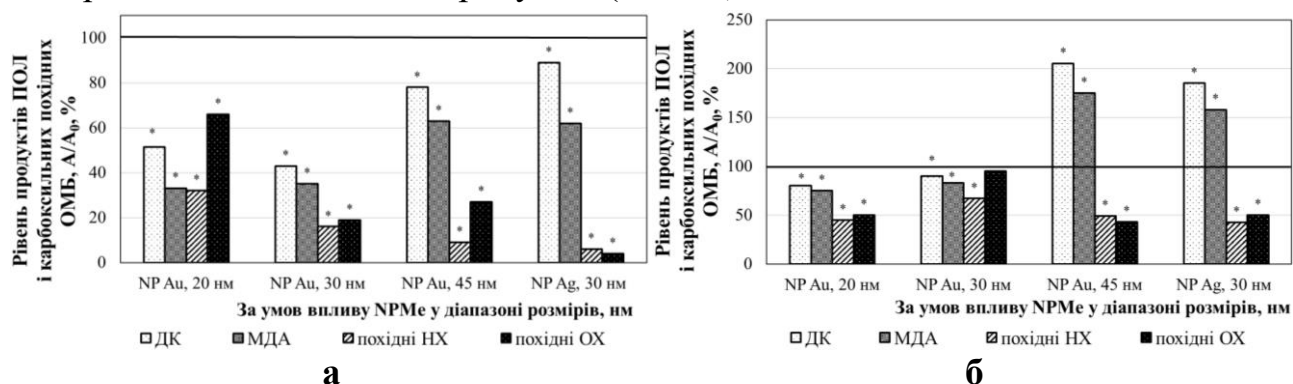


Рис. 10. Вміст дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду (ДК, МДА) та карбоксильних похідних нейтрального і основного характеру (НХ, ОХ) у мембранних фракціях клітин *E.coli* штаму 25 (а) і штаму 57 (б) за дії NP Me та після ліофілізації/регідратації, A/A_0 , %

За преінкубації NP Au розміру ~ 20 і ~ 30 нм з клітинами штаму 57 після ліофілізації/регідратації відбувалось зниження, а NP Au – ~ 45 нм і NP Ag – нагромадження ДК і МДА щодо їх контрольного рівня (рис. 10, б). На підставі цього не можна зробити однозначний висновок щодо відновлення структурних показників у клітинних мембранах цього штаму за попередньої інкубації з NP Me вищого розміру та після ліофілізації/регідратації.

Застосування NP Me обох видів у вивчених розмірах сприяло зниженню вмісту карбоксильних похідних НХ і ОХ у мембранних фракціях регідратованих клітин усіх штамів у межах 1,5–19,0 і 0,5–30,0 разів ($P < 0,05$) щодо їх контрольних значень (рис. 10).

Внаслідок дії NP Au і NP Ag у всіх вивчених розмірах за підвищенням відсотка інгібіції ТБК-активних продуктів у середньому в 3,0 і 3,6 рази ($P < 0,05$) виявляли посилення загальної АОА у штамів 57 і 25 щодо її контрольних значень (рис. 11). За впливу NP Au розміру ~ 45 нм та NP Ag визначали зниження показника до 25 % ($P < 0,05$) у СМФ регідратованих клітин штамів 24 і 20 відповідно.

Каталаза виконує основну роль у адаптації клітин до підвищеної інтенсивності катаболічних і деструктивних процесів (Marques G. L. et al., 2015). Виявлене зниження величини каталазної активності за дії NP Au і NP Ag розміру ~ 30 нм у регідратованих клітин штамів 20 і штамів 57, 25 та за дії NP Au розміру ~ 45 нм – штамів 57, 24 і 20 у межах 20–70 % ($P < 0,05$) щодо її контрольних значень має компенсаторний характер. Її підвищення за впливу NP Au розмірів ~ 20 , ~ 30 і ~ 45 нм у СМФ штамів 25 і 20 та NP Ag розміру ~ 30 нм – штаму 20 є адаптаційною реакцією пристосування клітин до стресу ліофілізації/регідратації.

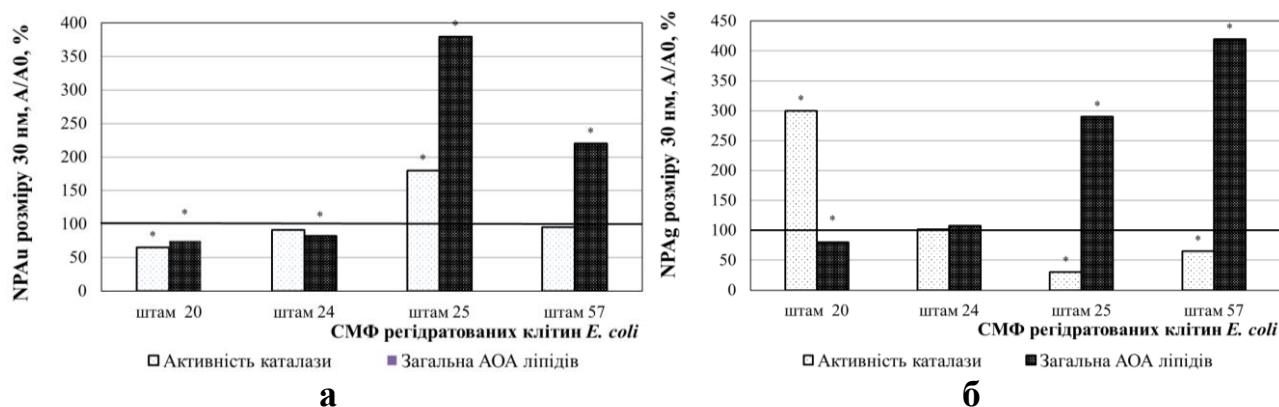


Рис. 11. Каталазна активність та загальна АОА у мембранних фракціях клітин *E. coli* дослідних штамів за дії NP Au (а) і NP Ag (б) розміру ~30 нм та після ліофілізації/регідратації, А/А₀, %

Відтак уповільнення накопичення токсичних продуктів ПОЛ і карбоксильних похідних ОМБ за дії NP Au і NP Ag розміру ~30 нм відбувалось через витрачання потужності антиоксидантних ензимів, що компенсується ресурсами неферментативної ланки АОС, та, очевидно, зумовлює резистентність бактеріальних клітин щодо ліофілізації/регідратації через антиоксидантну дію NP Me цього розміру.

Рівень питомої Н⁺-АТФ-азної активності мембранної фракції та дихальної активності клітин *Escherichia spp.*, *Pasteurella spp.* і *Salmonella spp.* за попереднього культивування з NP Me й після ліофілізації/регідратації. За впливу дослідних NP Me обох видів виявлено стимулювання Н⁺-АТФ-азної активності у СМФ клітин *E. coli* різних штамів після ліофілізації/регідратації відносно контрольного рівня ензиму, що вказує на зростання рівня гідролізу АТФ у клітинних мембранах.

Підвищення рівня Н⁺-АТФ-азної активності у СМФ штамів 19, 20, 24, 25 і 57 за дії NP Au розміру ~30 нм у вивчених концентраціях становило у межах 1,4–4,7 разу, розміру ~45 нм – 0,5–6,0 разів та NP Ag розміру ~30 нм – 0,65–6,20 разу (P<0,05) відповідно щодо її контрольних значень.

За впливу NP Au і NP Ag на клітини *E. coli* штамів 4, 20, 25 і 57 після ліофілізації/регідратації зростав рівень іншого показника енергетичного метаболізму – питомої дихальної активності у межах 24,6–82,4 % (P<0,05) щодо контролю.

Інтенсифікація накопичення біомаси регідратованих клітин *E. coli* штамів 20, 25 і 57 за впливу NP Au і штамів 20 і 57 – за впливу NP Ag, *P. multocida* штамів 15, 396 і 1718 за впливу NP Me обох видів характеризувалася стимуляцією обох ланок енергетичного метаболізму (підвищення рівня питомої Н⁺-АТФ-азної і дихальної активності) на тлі посилення загальної АОА (P<0,05) у мембранних фракціях бактерій.

За дії NP Au у регідратованих клітин *E. coli* штамів 19 і 24 та *P. multocida* штамів 606 і 877 зростав лише рівень Н⁺-АТФ-азної активності, а за дії NP Ag – тільки ендogenous дихання, але це позначилося на вищому рівні приросту біомаси клітин цих штамів (P<0,05) порівняно з таким у контрольних зразках.

Вищий рівень накопичення біомаси регідратованих клітин штамів *S. Enteritidis* 34, *S. Typhimurium* 16 та *S. Dublin* 12 порівняно з контрольним за дії NPAu реєстрували на тлі зростання рівня питомої ДА, за дії NPMe обох видів – зниження H^+ -АТР-азної активності ($P < 0,05$), що вказує на появу структурних змін у клітинних мембранах бактерій цього таксономічного виду внаслідок ліофілізації.

Удосконалення технологічних процесів виробництва засобів захисту тварин, спрямованих на підвищення ефективності (біологічного потенціалу сировини, специфічності, імуногенності, посилення імунної пам'яті тощо) та зниження собівартості кінцевого продукту є пріоритетним напрямом сучасної біотехнології.

Вплив NPAu на інтенсивність накопичення біомаси, рівень питомої H^+ -АТР-азної активності мембранної фракції і дихальної активності клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2. Під час вивчення впливу NPAu на інтенсивність накопичення біомаси клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 з'ясовано, що за додавання у середовище культивування NPMe у співвідношенні 1:8 і 1:10 ($1,90 \cdot 10^{-3}$ і $2,38 \cdot 10^{-3}$ г/л за металом) рівень показника КУО/мл перевищував його контрольні значення у середньому на 2 і 6 lg.

Під час визначення H^+ -АТР-азної активності у СМФ клітин *B. anthracis* реєстрували найбільш виражене зростання її рівня до 30 % ($P < 0,05$) за впливу NPAu у діапазоні концентрацій 5,69–11,16 мкг/мл за металом (рис. 12, а).

Підвищення рівня показника питомої ДА до 74 % ($P < 0,05$) клітин *B. anthracis* за дії NPAu порівняно з її контрольним значенням зафіксовано у діапазоні концентрацій 0,39–7,70 мкг/мл за металом (рис. 12, б). При цьому динаміка показника не залежала від концентрації NPMe у середовищі.

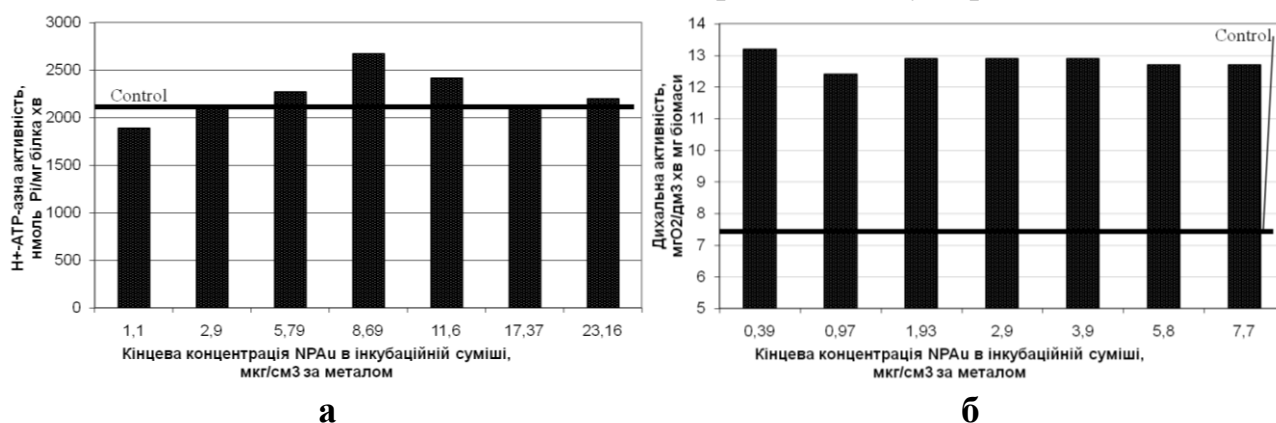


Рис. 12. Рівень питомої мембранної H^+ -АТР-азної (а) та дихальної активності (б) клітин штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 за дії NPAu у діапазоні концентрацій 1,10–23,16 мкг/мл та 0,39–7,70 мкг/мл за металом

Отже, за характером змін H^+ -АТР-азної активності клітин *B. anthracis* можна стверджувати про індукцію швидкості гідролізу АТР у мембранах, що поряд із кількістю отриманої біомаси та потужним ендогенним диханням характеризує високий рівень енергізації та функціональну активність клітин цього штаму внаслідок культивування у присутності NPAu. Ці результати дали змогу експериментально обґрунтувати застосування NPAu при отриманні

біомаси функціонально активних клітин вакцинного штаму *B. anthracis* Sterne 34F2 (Деклараційний патент України на корисну модель № 58450, 11.04.2011 р.).

Завдяки отриманим у дисертації результатам вдалося визначити біохімічну і токсикологічну дію NPMe у вигляді колоїдних дисперсій на структурно-функціональні показники як окремих клітин, так й цілісного організму (щури). На моделі еукаріотичних і прокаріотичних клітин доведено генотоксичність, мутагенність і мембранотоксичність NPAu розміру ~10, ~20 і ~45 нм та NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] і NPZn розміру ~100 нм та недоцільність їх використання в експериментах *in vivo*. Дослідні зразки NPAu розміру ~30 нм, NPAg – ~30 нм, NPFe – ~100 нм, NPCu – ~70 нм та NPMnO₂ – ~50 нм у вивчених концентраціях є безпечними для еукаріотичних, а NPAu і NPAg розміру ~30 нм – біосумісними для прокаріотичних клітин.

Тропність NPMe до біологічних молекул різної молекулярної маси, шляхи їх трансмембранного перенесення всередину клітини, біотрансформація та біодеградація, які мають геометрично- та розмірно-залежний характер, свідчать про варіабельність їх біологічної дії – від токсичності до біосумісності. Очевидно, міцела колоїдних NPMe, що має потенціалутворювальну оболонку із розвиненою питомою поверхнею і слабо негативний заряд, виявляє високу адсорбційну і каталітичну активність до різних метаболітів навколо й усередині організмів клітинної природи. Це ґрунтується на механізмах рецептор-опосередкованого ендцитозу та фізико-хімічному зв'язуванні NPMe з гідрофільними групами ліпідного бішару та аміногрупами білкових молекул плазмалеми (Ульберг З. Р. зі співавт., 2008; Dukhin A. S. et al., 2010; Прилуцька С. В. зі співавт., 2012; Науменко А. М. зі співавт., 2016), що індукує цитотоксичні ефекти.

Відтак, провідну роль у механізмах токсичної дії дослідних NPMe відіграє оксидативний стрес, розвиток якого має залежний від їх розміру характер: NPAu і NPAg розміру ~30 нм здатні справляти антиоксидантний вплив, а NPAu меншого (~10, ~20 нм) і більшого (~45 нм) розміру – прооксидантний, наслідками якого є розвиток цитолітичного синдрому і генотоксичність. Але це є індивідуальним для різних штамів мікроорганізмів у межах одного таксономічного виду (*Escherichia* spp., *Salmonella* spp.).

Доведено характеристику токсичної дії суміші NPMe у дозі 4,0 мг/кг маси тіла на організм білих щурів, яка за хронічного впливу полягає у поступовому розвитку гепатотоксикозу, імуносупресії та запальних реакцій через оксидативний стрес, у превалюванні анаболічних процесів над катаболічними. Метаболічні перебудови пов'язані з адаптаційною мобілізацією ресурсів енергетичного і пуринового обміну, що вказує на очевидну інтенсифікацію видалення та дозову тропність металів у організмі тварин. Адаптогенна дія NPMe у дозі 0,3 мг/кг маси тіла порівняно з такою для солей металів полягала у регуляції показників неспецифічної резистентності та ендогенної АОС в організмі щурів.

Підвищення рівня приросту біомаси регідратованих клітин виробничих штамів *E. coli* та *P. multocida* за культивування з NPAu і NPAg розміру ~30 нм та *B. anthracis* – NPAu розміру ~19 нм пов'язане з відновленням структурно-функціональних показників клітинних мембран та залученням обох ланок енергетичного обміну, що є прогностичною ознакою менш виражених структурно-функціональних ушкоджень мікроорганізмів під час ліофілізації/регідратації порівняно з нативними культурами клітин. Це дає змогу вважати такі NPMe кріопротекторами та може знайти широке впровадження у біотехнологіях отримання і зберігання біомаси промислово значимих штамів.

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 рази; 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_{мт} 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⁺-АТФ-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 рази, 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 *Escherichia* 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 мембраннотоксичних 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 металів на 60-ту добу досліду в 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 досліду 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 NPAu і NPAg 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 NPAu і NPAg 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^+ -АТР-ази у 3,2 разу та дихальної активності на 53,5 % ($P < 0,05$). Ці NPMе, завдяки їх антиоксидантному впливу, можна вважати біосумісними щодо клітинних мембран прокаріот.

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 ендogenous 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 М 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 ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Книги, монографії:

1. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине: справ. пособ. / А. Н. Головки, В. А. Ушкалов, В. Г. Скрыпник, 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. Скрыпник, 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. Харьков: НТМТ, 2007. 512 с. (Дисертантка є авторкою розділів 1–4 та 11).

2. 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. (Дисертантка є авторкою розділів 3–4 частини 1 та розділів 2.2 і 3).

Статті в наукових фахових виданнях України:

3. **Романько М. Є.**, Ушкалов В. О., Головки А. М. Стрес у мікроорганізмів та вірулентність. *Вет. біотехнологія: бюл.* Київ, 2006. № 8. С. 222–241. (Дисертантка провела ретроспективний аналіз літератури, узагальнила результати і підготувала статтю до друку).

4. **Романько М. Є.** Інтенсивність ліпопероксидації в мембранах бактеріальних клітин в оцінюванні ефектів стресу ліофілізації. *Вет. біотехнологія: бюл.* Київ, 2008. № 13 (2). С. 214–223.

5. **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. (Дисертантка провела визначення інтенсивності приросту біомаси культур бактеріальних клітин, узагальнила результати і підготувала статтю до друку).

6. **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.

7. 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. Головки. *Біотехнологія.* 2009. Т. 2, № 3. С. 80–85. (Дисертантка розробила схему досліду, виготовила препарати ізольованих тест-клітин і наночастинок металів, узагальнила результати досліджень і підготувала статтю до друку).

8. 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. Головки. *Укр. біохім. журн.* 2009. Т. 81, № 6. С. 70–76. (Дисертантка провела дослідження H^+ -АТФ-азної активності у мембранних фракціях бактеріальних клітин, узагальнила результати і підготувала статтю до друку).

9. **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. (Дисертантка провела визначення рівня питомої дихальної активності бактеріальних клітин та узагальнила результати).

10. 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. *Biorolymers and cell.* 2010. Vol. 26, No. 3. P. 200–204. (Дисертантка розробила схему досліджу, виготовила препарати ізольованих тест-клітин і наночастинок металів та узагальнила результати досліджень).

11. **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.

12. 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. (Дисертантка провела дослідження мембранозв'язаної H^+ -АТР-зи і цитозольної ЛДГ-ази еукаріотичних клітин та інтенсивності ПОЛ і ОМБ у мембранних фракціях прокаріотичних клітин; узагальнила результати).

13. **Романько М.Є.** Проліферативні властивості клітин періодичних культур *Salmonella* виробничих штамів за умов культивування у присутності наночастинок металів. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2012. Т. 14, № 1–2. С. 618–623.

14. **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. (Дисертантка провела визначення мембранозв'язаної H^+ -АТР-зи та визначення інтенсивності ПОЛ і ОМБ, показників АО-регуляції у мембранних фракціях бактеріальних клітин; узагальнила результати і підготувала статтю до друку).

15. **Романько М. Є.** Фізіолого-біохімічні маркери безпечності наночастинок металів на моделі ізольованих бактеріальних клітин роду *Salmonella*. *Біологія та валеологія : зб. наук. праць.* Харків, 2012. Вип. 14. С. 67–77.

16. Куцан О. Т., Оробченко О. Л., **Романько М. Є.** Токсикокінетика Купруму в організмі щурів за умов тривалого введення нанокмполітиту металів (Ag, Cu, Fe та двоокис Mn) з кормом. *Біологія тварин : наук.-теорет. журн.* 2015. Т. 17, № 1. С. 68–77. (Дисертантка провела пробопідготовку зразків органів для рентгенофлуоресцентного аналізу, статистичне обчислення результатів і підготувала статтю до друку).

17. **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.

18. **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>.

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

20. **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.

21. **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. С. 68–79.

22. **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.

23. **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,
включених до наукометричних баз:**

24. 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. (Дисертантка розробила схему дослідження, підготувала препарати ізольованих тест-клітин і наночастинок металів, провела статистичне обчислення результатів і підготувала статтю до друку).

25. 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. (Дисертантка провела пробопідготовку зразків органів для рентгенофлуоресцентного аналізу, статистичне обчислення результатів і підготувала статтю до друку).

26. 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. (Дисертантка провела пробопідготовку зразків органів для рентгенофлуоресцентного аналізу, статистичне обчислення результатів і підготувала статтю до друку).

27. 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. (Дисертантка провела визначення гематологічних показників, показників протеїнограми та неспецифічної резистентності, рівня глюкози, сечовини та креатиніну в плазмі крові щурів, статистичне обчислення та узагальнення результатів).

Публікації у наукових нефахових виданнях України:

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

29. **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. (Дисертантка розробила схему дослідження, провела визначення АТФ-азної активності в мембранних фракціях бактеріальних клітин та підготувала статтю до друку).

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

31. 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. контр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок.* Львів, 2011. Вип. 12, № 3, 4. С. 404–410. (Дисертантка розробила схему дослідження, провела підготовку препаратів наночастинок металів і поживного середовища з їх вмістом, а також статтю до друку).

32. **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.

33. 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. (Дисертантка розробила схему дослідження, підготувала препарати ізольованих тест-клітин і наночастинок металів, а також статтю до друку).

34. Оробченко О. Л., **Романько М. Є.**, Куцан О. Т. Зміни коефіцієнтів маси внутрішніх органів у щурів після внутрішньошлункового введення нанокompозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого токсикологічного експерименту. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. наук.-досл. контр. ін-ту вет. препаратів та корм. добавок.* Львів, 2013. Вип. 14, № 1–2. С. 295–300. (Дисертантка провела пробопідготовку зразків органів для рентгенофлуоресцентного аналізу, статистичне обчислення результатів і підготувала статтю до друку).

35. 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. (*Дисертантка провела пробопідготовку зразків органів для рентгенофлуоресцентного аналізу, статистичне обчислення результатів і підготувала статтю до друку*).

Патенти України на корисну модель:

36. 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.

37. 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.

38. 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.

39. Нанокмпозит 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:

40. 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. (*Дисертантка є співавтором розділів 5, 6 част. I, част. II і III*).

41. 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. (*Дисертантка є співавтором розділів 1, 3, 4.1 та 5.1*).

42. 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. (*Дисертантка є співавтором усіх розділів*).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези та матеріали конференцій:

43. 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. (Дисертантка розробила схему досліджу, провела визначення показників інтенсивності ПОЛ і ОМБ у мембранних фракціях бактеріальних клітин, проаналізувала результати та проаналізувала результати).

44. 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. (Дисертантка виготовила препарати ізольованих тест-клітин, проаналізувала результати досліджень і підготувала матеріали до друку).

45. **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. (Дисертантка провела визначення показників інтенсивності ПОЛ і ОМБ у мембранних фракціях бактеріальних клітин, проаналізувала результати та підготувала матеріали до друку).

46. 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 вер. 2010 р.). Одеса, 2010. С. 304–305. (Дисертантка провела визначення показників інтенсивності ПОЛ і ОМБ у мембранних фракціях бактеріальних клітин, проаналізувала результати та підготувала матеріали до друку).

47. 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. *Mediateranean-East-Europe Meeting Multifunctional Nanomaterials: NanoEuroMed 2011 (Uzhgorod, Ukraine, 12–14 May 2011) : prog. and materials.* Uzhgorod, 2011 P. 60–61. (Дисертантка проаналізувала результати досліджень і підготувала матеріали до друку).

48. 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. (Дисертантка проаналізувала результати досліджень і підготувала матеріали до друку).

49. **Roman'ko M.**, Kolchik O., Uskalov V. The study of properties of nanoparticles bakterioticsidnyh 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. (Дисертантка розробила схему досліджу, виготовила препарати наночастинок металів, проаналізувала результати і підготувала матеріали до друку).

50. Протективная роль наночастиц металлов в физиолого-биохимических механизмах репаративных 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. (Дисертантка провела визначення АТФ-азної і дихальної активності та показників інтенсивності ПОЛ і ОМБ у мембранних фракціях бактеріальних клітин, статистичне обчислення та аналіз результатів).

51. 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. (Дисертантка провела визначення гематологічних, ензиматичної активності та вмісту субстратів і продуктів метаболічних реакцій у крові щурів, статистичне обчислення та аналіз результатів).

52. 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.

53. 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. (Дисертантка провела пробопідготовку зразків органів для рентгенофлуоресцентного аналізу та підготувала матеріали до друку).

54. Романько М. Є. Застосування наночастинок 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.

55. Романько М. Е., Мачуский 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. (Дисертантка розробила схему досліду, провела підготовку препаратів наночастинок металів поживного середовища з їх вмістом, а також матеріали до друку).

56. Куцан А. Т., Оробченко А. Л., Романько М. Е. Токсикокинетика марганца в организме крыс после внутрижелудочного введения наноконкомпозита 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. (Дисертантка провела пробопідготовку зразків органів для рентгенофлуоресцентного аналізу, статистичне обчислення та аналіз результатів).

57. 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.

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2018.

У дисертаційній роботі доведено, що колоїдні дисперсії NP_{Au} розміру ~30 нм, NP_{Ag} – ~30 нм, NP_{Fe} – ~100 нм, NP_{Cu} – ~70 нм та NP_{MnO₂} – ~50 нм є безпечними (біосумісними), тоді як NP_{Co}, NP_{Co}[Fe(CN)₆] і NP_{Zn} – ~100 нм у вивчених концентраціях мають генотоксичну, мутагенну та мембранотоксичну дію щодо еукаріотичних клітин. На прокаріотичних клітинах *Esherichia* spp. та *Salmonella* spp. показано біосумісність NP_{Au} і NP_{Ag} розміру ~30 нм, яка характеризується уповільненням процесів ПОЛ і ОМБ через зміни каталазної активності, підвищення рівня загальної АОА, мембранної H⁺-АТФ-азної і дихальної активності клітин, що має індивідуальний характер для різних штамів мікроорганізмів у межах одного таксономічного виду. Тоді як NP_{Au} розміру ~20 і ~45 нм спричиняють прооксидантну дію.

Визначено біосумісність і вищу біодоступність суміші NP_{Me} у дозі 0,3 мг/кг порівняно з солями металів у організмі шурів. Токсична дія суміші NP_M у дозі 4,0 мг/кг маси тіла полягає у розвитку імуносупресії, запальних реакцій та гепатотоксикозу через оксидативний стрес, у превалюванні анаболічних процесів над катаболічними, що пов'язано з адаптаційною мобілізацією ресурсів енергетичного і пуринового обміну й узгоджується з

динамікою вмісту Fe, Cu і Mn в організмі тварин. Виявлено здатність NPAu і NPAg впливати на утворення біомаси регідратованих клітин *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. і *Salmonella* spp. та вакцинного штаму *B. anthracis*, рівень накопичення якої залежить від показників структурно-функціонального стану мембран та енергетичного метаболізму прокариот.

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

АННОТАЦИЯ

Романько М. Е. Биохимическая и токсикологическая характеристика воздействия наночастиц металлов на клетки эукариотических и прокариотических организмов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2018.

В диссертационной работе доказано, что коллоидные дисперсии NPAu размером ~30 нм, NPAg – ~30 нм, NPFe – ~100 нм, NPCu – ~70 нм и NPMnO₂ – ~50 нм безопасные (биосовместимые), тогда как NPCo, NPCo[Fe(CN)₆] и NPZn – ~100 нм в изученных концентрациях проявляют генотоксичное, мутагенное и мембранотоксичное воздействие по отношению к эукариотическим клеткам. На модели прокариотических клеток *Escherichia* spp. и *Salmonella* spp. показана биосовместимость NPAu і NPAg размером ~30 нм, характеризующуюся снижением интенсивности процессов ПОЛ и ОМБ путем изменения каталазной активности, увеличения уровня общей АОА, мембранной Н⁺-АТФ-азной и дыхательной активности клеток, что носит индивидуальный характер для разных штаммов микроорганизмов в пределах одного таксономического вида. Тогда как NPAu размером ~20 і ~45 нм проявляют прооксидантное действие.

Установлены биосовместимость и высшая биодоступность смеси NPMe в дозе 0,3 мг/кг по-сравнению с солями металлов в организме крыс. Токсическое воздействие смеси NPMe в дозе 4,0 мг/кг массы тела характеризуется развитием иммуносупрессии, воспалительных реакций и гепатотоксикозом путем формирования окислительного стресса, превалированием анаболических процессов над катаболическими, связано с адаптационной мобилизацией ресурсов энергетического и пуринового обмена и согласовывается с динамикой содержания Fe, Cu и Mn в организме животных. Выведено способность NPAu и NPAg влиять на образование биомассы регидратированных клеток *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. и *Salmonella* spp. и вакцинного штамма *B. anthracis*, уровень накопления которой зависит от показателей структурно-функционального состояния и энергетического метаболізма прокариот.

Ключевые слова: наночастицы металлов, биохимические маркеры, генотоксичность, мутагенность, цитотоксичность, биосовместимость, клетка, эукаріоти, прокариоти, крысы.

ANNOTATION

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

Dissertation for scientific degree of doctor of biological sciences, specialty 03.00.04 – biochemistry. – Institute of animal biology NAAS, Lviv, 2018.

On the model of eukaryotic cells, it was found that NP_{Au} of average size ~30 nm, NP_{Ag} – ~30 nm, NP_{Fe} – ~100 nm, NP_{Cu} – ~70 nm and NP_{MnO₂} – ~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 NP_{Co}, NP_{Co}[Fe(CN)₆] and NP_{Zn} 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 (within 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 NP_{Au}: 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 (within 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 *Esherichia* spp. and *Salmonella* spp. an increase in the level of total AOA 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<0.05). Consequently, NP_{Me} of ~30 nm in size are biocompatible and membranotropic for cells of eukaryotic and prokaryotic organisms. Whereas, NP_{Au} of size ~20 and ~45 nm produce a prooxidant effect by testing cytological and biochemical markers.

The effect of the NP_{Me} mixture on rats is shown, depending on the dose and duration of administration. It has been established that the toxic effect of the mixture of NP_{Me} (Ag, Cu, Fe, MnO₂) at a chronic administration in a dose of 1.0 and 4.0 mg/kg of body weight in the body of white rats leads to: hyperfermentemia of AST, GGTP, ALT and AP an average of 14.8; 22.3; 96.8 and 69.1 %), 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 of lipids (22.6 and 38.0 %), slowing the

LPO process along with OMP intensification, ($P < 0.05$) respectively. That is, the toxic effect of the mixture of NPMe and metal salts consists in the development of immunosuppression, inflammatory reactions and hepatotoxicosis through oxidative stress, in the prevalence of anabolic processes over catabolic, associated with adaptive mobilization of energy and purine metabolism, indicating the apparent intensification of removal and selective dosage tropism of metals in the body of animals. At a dose of 0.3 mg/kg of body weight, the NPMe mixture has adaptogenic effect by biocompatibility and bioavailability compared with the salts of the corresponding metals.

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 of lipids 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. The level of accumulation of *Escherichia* spp., *Pasteurella* spp. and *Salmonella* spp. biomass after lyophilization and the vaccine strain *B. anthracis* under the effect of NPMe depends on the parameters of the structural and functional state of the membranes and with the participation of the energy metabolism resources of prokaryotic cells.

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

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 1.9. Тир. 100 прим. Зам. 193-18.
Підписано до друку 30.03.18. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.
61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2, корп.1, к.19. Т. (057) 758-01-08, (066) 822-71-30
Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру
видавців та виготовників видавничої продукції серія ДК 3587 від 23.09.09 р.