

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

ОЦІНКА ВПЛИВУ ПОХІДНИХ ІМІДАЗОЛІНОНІВ НА
БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ РИБ

Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 200М групи

Гах Валерія Володимирівна

Керівники:

доктор біологічних наук, професор Марченко М.М.

кандидат біологічних наук, доцент Худа Л. В.

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2025 р.

Зав. кафедрою _____ Волощук О. М.

Анотація

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню впливу гербіциду «Євролайтинг», до складу якого входять імазамокс та імазапір — представники групи імідазолінонових сполук, на біохімічні показники крові карася сріблястого (*Carassius gibelio*). Оцінювали вплив різних концентрацій гербіциду (1, 2, 5 та 10 ГДК), а також можливості корекції його токсичної дії шляхом додавання до водного середовища зелених мікроводоростей *Desmodesmus armatus*. Визначено рівень ТБК-активних продуктів як маркера інтенсивності пероксидного окислення ліпідів, а також активність ферментів антиоксидантної системи — супероксиддисмутази та каталази, й ферментів функціональної активності печінки — АЛТ, АСТ, ГГТ та лужної фосфатази. Отримані результати продемонстрували дозозалежний розвиток оксидативного стресу та порушення метаболізму в організмі риб за дії гербіциду, що проявлялося підвищенням рівня ПОЛ та зміною ферментативної активності. Доведено, що максимальна концентрація (10 ГДК) спричинює найвиразніші ушкодження, тоді як додавання *Desmodesmus armatus* значно знижувало інтенсивність оксидативних процесів і демонструвало захисний ефект завдяки антиоксидантним властивостям мікроводоростей.

Ключові слова: імідазолінони, «Євролайтинг», *Carassius gibelio*, оксидативний стрес, антиоксидантні ферменти, ТБК-активні продукти, біоремедіація, *Desmodesmus armatus*.

Abstract

The qualification thesis is devoted to studying the effect of the herbicide Eurolighting, which contains imazamox and imazapyr—representatives of the imidazolinone group of compounds—on the biochemical parameters of the blood of silver crucian carp (*Carassius gibelio*). The effect of different concentrations of the herbicide (1, 2, 5, and 10 MPC) was evaluated, as well as the possibility of correcting its toxic effect by adding the green microalgae *Desmodesmus armatus* to the aquatic environment. The level of TBK-active products was determined as a marker of the intensity of lipid peroxidation, as well as the activity of the enzymes of the antioxidant system — superoxide dismutase and catalase, and the enzymes of functional liver activity — ALT, AST, GGT, and alkaline phosphatase. The results demonstrated a dose-dependent development of oxidative stress and metabolic disorders in fish under the action of the herbicide, which manifested itself in an increase in the level of LPO and a change in enzymatic activity. It has been proven that the maximum concentration (10 MPC) causes the most significant damage, while the addition of *Desmodesmus armatus* significantly reduced the intensity of oxidative processes and demonstrated a protective effect due to the antioxidant properties of microalgae.

Keywords: *imidazolinones, “Eurolighting,” Carassius gibelio, oxidative stress, antioxidant enzymes, TBARS, bioremediation, Desmodesmus armatus.*

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів
мають посилання на відповідне джерело. _____ В.В Гах

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Загальна характеристика похідних імідазолінів, їх властивості та застосування.....	7
1.2 Механізм дії похідних імідазолінів.....	12
1.3 Фізіолого-біохімічні особливості відповіді гідробіонтів на токсичні впливи	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	20
2.1 Матеріали дослідження.....	20
2.2 Методи дослідження:	21
2.2.1 Умови утримання та експозиції риб у модельних системах за дії різних концентрацій імідазолінонів.....	21
2.2.2 Підготовка біологічного матеріалу для аналізів: методики відбору проб крові риб із серця	22
2.2.3 Методи оцінки антиоксидантного статусу організму риб.....	23
2.2.4 Методи визначення показників функціональної активності печінки та клінічних показників крові	26
2.2.5 Методи статистичної обробки результатів.....	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	29
3.1 Активність ферментів антиоксидантного захисту у сироватці крові <i>Carassius gibelio</i> за дії різних концентрацій Євролайтингу.....	29
3.2 Оцінка впливу похідних імідазолінонів в різних концентраціях на показники функціональної активності печінки риб.....	37
ВИСНОВКИ.....	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	48
ДОДАТКИ.....	56

ВСТУП

Імідазоліони належать до групи синтетичних гербіцидів, що широко використовуються у сільському та лісовому господарствах завдяки високій ефективності та вибірковій дії. Їхній механізм ґрунтується на пригніченні ферменту ацетолактатсинтази (ALS), що порушує синтез амінокислот і зрештою спричиняє загибель рослин. [13] Препарати на основі діючих речовин імазамокс та імазапір засвоюються як через кореневу систему, так і через листову поверхню, завдяки чому мають комплексний характер дії. [3]. Вони характеризуються низькою токсичністю для теплокровних тварин, що робить їх привабливими для використання в аграрному секторі. Однак, незважаючи на їхню ефективність у боротьбі з бур'янами, існує значний ризик потрапляння імідазоліонів у водне середовище, що може призвести до негативного впливу на водні екосистеми.

Завдяки кумулятивним властивостям ці сполуки циркулюють і накопичуються в організмах майже всіх гідробіонтів, проте найбільші концентрації пестицидів та їхніх метаболітів виявляються у риб, які займають верхні ланки трофічних ланцюгів у водоймах. Тому питання токсичного впливу пестицидів на іхтіофауну, зокрема особливості метаболізму риб та їхні стресові реакції на дію пестицидів на фізіолого-біохімічному рівні, залишаються надзвичайно актуальними. [1, 2]. Дослідження впливу цих сполук на біохімічні показники крові та органів риб є обмеженими, що підкреслює необхідність проведення комплексних токсикологічних досліджень у цій галузі. Зокрема, існують роботи, які вивчають гемотоксичні ефекти гербіцидів на риб, зокрема на тилапію, що свідчить про потенційний вплив цих сполук на кровоносну систему водних організмів [14].

Карась сріблястий (*Carassius gibelio*) є еврибіонтним та екологічно пластичним видом, що широко представлений у природних та штучних водоймах України. Завдяки стійкості до коливань середовища він часто використовується як модельний об'єкт для токсикологічних досліджень, а

зміни його гематологічних та біохімічних показників дозволяють оцінювати небезпеку ксенобіотиків для іхтіофауни в цілому.

У контексті пошуку природних біокоректорів токсичної дії пестицидів особливий інтерес становлять зелені мікроводорості роду *Desmodesmus*, відомі високою адсорбційною здатністю, участю у трансформації органічних забруднювачів та позитивним впливом на мікробіологічний і кисневий режим води. Аналіз ефективності їх використання при впливі підвищених концентрацій гербіцидів є перспективним напрямом екотоксикології та біоремедіації.

Метою даної роботи є оцінка впливу гербіциду «Євролайтинг» у концентраціях 1, 2, 5 та 10 ГДК на біохімічні показники крові карася сріблястого (*Carassius gibelio*) та дослідження можливості корекції його токсичної дії шляхом додавання до водного середовища зелених мікроводоростей *Desmodesmus armatus*.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Встановити зміни вмісту ТБК-активних продуктів за умов 14-добової дії гербіциду «Євролайтинг» у концентраціях 1, 2, 5 та 10 ГДК.
2. Дослідити стан антиоксидантної системи риб шляхом визначення активності супероксиддисмутази та каталази за вищевказаних умов експозиції препарату.
3. Визначити активність ферментативних маркерів функціонального стану печінки (АЛТ, АСТ), лужної фосфатази та γ -глутамілтрансферази при 14-добовій дії різних концентрацій гербіциду.
4. Оцінити коригувальний вплив зелених мікроводоростей *Desmodesmus* на біохімічні показники крові карася за умов дії максимальної концентрації (10 ГДК) гербіциду «Євролайтинг».

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика похідних імідазолінонів, їх властивості та застосування

Похідні імідазоліну, що належать до катіонних поверхнево-активних речовин, набувають все більшого значення на світовому ринку завдяки широким можливостям їх використання [4]. Імідазолінонові поверхнево-активні речовини були уперше синтезовані ще у 1950-х роках 20-го століття Mannheim. Створення цих хімічних систем ґрунтувалося на реакції 1-(2-гідроксиетил)-2-алкіл-2-імідазоліну (H.E.A.I.) з монохлорацетатом натрію [5]. Імідазолінонові поверхнево-активні речовини належать до класу катіонних ПАР. Зазвичай катіонні ПАР є солями четвертинного азоту й знаходять широке застосування як у неводних системах, так і в ролі пом'якшувачів текстилю, диспергаторів чи емульгаторів. Для імідазолінових сполук характерна наявність бічної групи, основної імідазолінової групи та вуглеводневого ланцюга.

Впродовж останніх десятиліть імідазолінонові поверхнево-активні речовини були всебічно досліджені та вдосконалені, що сприяло створенню різноманітних похідних імідазоліну з унікальними характеристиками. Нині вони знаходять широке застосування в промисловості та побуті — від засобів особистої гігієни й промислових очищувачів до сільського господарства та інших сфер. Завдяки таким властивостям, як стійкість у кислому та лужному середовищі, ці сполуки стали популярним вибором для багатьох технологічних процесів.

Імідазоліони — це група синтетичних органічних сполук, похідних імідазолу, що містять карбонільну групу ($-C=O$) у структурі гетероциклічного кільця. Вони належать до класу азотовмісних гетероциклічних гербіцидів, відомих своєю високою біологічною активністю навіть у низьких концентраціях.

Хімічно імідазоліони характеризуються:

- наявністю імідазолінового кільця з включенням атомів нітрогену;
- присутністю карбонільної групи, що зумовлює їх реакційну здатність;
- досить істотною стабільністю в ґрунті та воді, але повільною біодеструкцією.

Імідазолін є ізомером піразолу та належить до гетероциклічних сполук, що містять п'ятичленний цикл із двома атомами азоту в кільці. Імідазолінове ядро зустрічається й у природних сполуках, зокрема в амінокислоті гістидин, пуринових основах та рибозидах. Відновлена форма імідазолу відома під назвою імідазолін.

З хімічної точки зору імідазолінові сполуки відносяться до гетероциклічних систем, що включають п'ятичленне кільце з двома атомами азоту. Катіонні імідазоліни являють собою моночетвертинні амонієві солі типу $RnN^+ X^-$, які характеризуються асиметричною будовою відповідно до тетраедричної конфігурації вуглецю, зумовленої катіоном. У водних розчинах вони проявляють оптичну активність, оскільки піддаються іонізації. [8]

Заміщення в імідазоліновому кільці відбувається у положеннях 1, 2 і 3 (рис. 1):

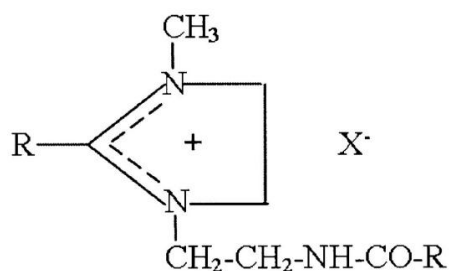


Рис.1 Структура імідазоліну [7]

*Примітка: $X = CH_3OSO_3^-$; $R = C_{15}-C_{17}$

У першій позиції приєднаний ланцюг жирної кислоти з аміноетильною групою, у другій — довголанцюговий алкільний замісник, у третій — метильна група.

У загальному вигляді імідазолінові сполуки складаються з трьох структурних фрагментів: бічної групи, імідазолінової «головки» та вуглеводневого «хвоста», як показано на рис. 2. За даними сучасних досліджень із використанням молекулярного моделювання, головна й бічна групи беруть участь у закріпленні молекули на поверхні, тоді як вуглеводневий «хвіст» утворює захисний мономолекулярний шар. [9]

Введення додаткового атома азоту в гетероциклічну молекулу надає імідазоліну та імідазолідину специфічних властивостей і переваг, зокрема підвищеної здатності до функціональних перетворень. Це забезпечує можливість досліджувати хімічну реакційну здатність різних функціональних груп радикалів імідазоліну без втрати їхніх парамагнітних властивостей. [10]

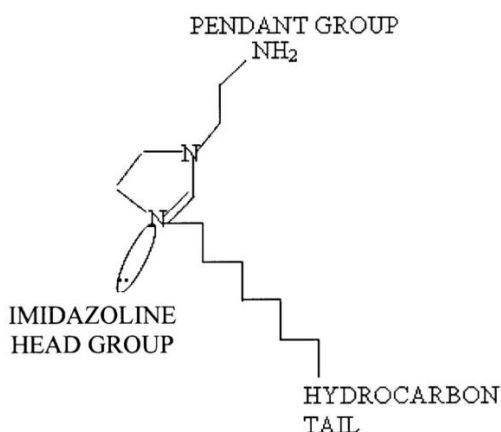


Рис.2. Молекулярна структура імідазолінів [7]

Імідазоліни можуть бути представлені різними типами, зокрема, катіонними та амфотерними.

Катіонні імідазоліни несуть позитивний заряд на імідазоліновому ядрі, який не змінюється при коливаннях рН. Цей позитивний заряд зберігається в кислому, нейтральному та лужному середовищі. Їх застосовують як промислові та побутові пом'якшувачі тканин, а також як водовідштовхувальні агенти, антикорозійні засоби, емульгатори та диспергатори. [11, 12]

Амфотерні імідазоліни з хімічної точки зору не містять власного імідазолінового кільця в молекулі, проте під час синтезу формується проміжна

структура з імідазоліновим кільцем, що і визначає їхню приналежність до похідних імідазоліну. Амфотерні імідазоліни несуть як позитивний, так і негативний заряд у молекулі, завдяки чому можуть проявляти властивості аніонних ПАР при високому рН і катіонних — при низькому рН. Їх використовують у виробництві шампунів, рідкого мила, гелів для душу, а також у засобах очищення з високою кислотністю або лужністю. [12]

Більшість четвертинних амонієвих солей імідазоліну є твердими речовинами без чітко визначеної температури плавлення. Аліфатичні четвертинні солі з довгим ланцюгом (>C8) зазвичай виглядають як тверді білі кристали, іноді безбарвні та без запаху. Якщо ж молекула містить ненасичений довголанцюговий радикал або бензильну групу, сполука набуває вигляду в'язкої рідини жовтого або коричневого кольору. Четвертинні солі імідазоліну з алкільною групою довжиною 10 атомів вуглецю демонструють надзвичайно високі поверхнево-активні властивості. [7].

Компоненти імідазолінів із високою молекулярною масою зазвичай мають низьку розчинність в органічних розчинниках при кімнатній температурі, тоді як більш полярні імідазоліни розчиняються значно краще [4].

Розчинність солей імідазолінів залежить від типу замісників:

- сполуки з коротколанцюговими радикалами (C₈–C₁₄) добре розчинні у воді;
- сполуки з довгими ланцюгами — малорозчинні;
- сполуки з двома або більше довгими ланцюгами — майже нерозчинні у воді, але розчинні у неполярних розчинниках.

Зі збільшенням молекулярної маси розчинність імідазолінів у полярних середовищах зменшується, тоді як у неполярних — зростає. Присутність полярних груп, таких як гідроксильні або етилові ефіри, підвищує їхню розчинність у полярних розчинниках.

Імідазоліни є термічно стабільними органічними азотовмісними основами. Нейтралізовані форми (вільні основи) є ліпофільними, добре

розчиняються у неполярних розчинниках та мінеральних оліях, проте у воді лише диспергуються.

Імідазоліни плавляться при нижчих температурах та у значно ширшому інтервалі (45–90 °C), ніж відповідні первинні амідні (98–112 °C). Імідазоліни олеїнової кислоти були рідким за кімнатної температури (порівняно з олеїдамідом, який плавиться при 75–76 °C), тоді як його елаїдиловий аналог плавився при 46–47 °C (проти 93–94 °C для елаїдаміду). [4, 7]

До найпоширеніших представників імідазолінонів належать: імазамокс, імазапір, імазетапір, імазахін, імазаметабенз-метил.

Імазапір використовується для до- та післясходового контролю широкого спектра бур'янів, включно з наземними однорічними та багаторічними злаковими рослинами, дводольними трав'янистими видами, деревними формами, а також прибережними та надводними водними рослинами.

Основна увага зосереджена на використанні імазапіру як гербіциду для прямого внесення у водойми, зокрема озера та ставки. Його водні застосування спрямовані на контроль небажаної надводної та плаваючої водної рослинності у стоячих і проточних водах, включно з естуаріями та морськими прибережними зонами. До цього також відноситься контроль небажаної болотної, прибережної та наземної рослинності, що росте у та навколо водойм. [15]

Імідазолінові гербіциди, зокрема імазамокс, широко використовуються в сільському господарстві для контролю однорічних і багаторічних бур'янів у зернових культурах, сої, бобових та кукурудзі. Вони ефективно знижують чисельність широкого спектра дводольних та злакових бур'янів, зменшуючи конкуренцію за поживні речовини та вологу й тим самим підвищуючи врожайність культур. Імазамокс можна застосовувати як ґрунтово, так і листово: ґрунтове внесення забезпечує захист сходів культури, а листове — контроль уже пророслих бур'янів.

Особливу увагу приділяють умовам внесення, оскільки гербіцид погано адсорбується у ґрунтах із низькою ємністю катіонного обміну та може вимиватися у ґрунтові води. Важливими факторами також є рН ґрунту, його вологість та біологічна активність, оскільки вони визначають швидкість розкладу імазамоксу та тривалість його залишкової дії. Так, у нейтральних і слабколужних ґрунтах діюча речовина розкладається відносно швидко, тоді як у кислих ґрунтах може зберігатися понад 120 днів. [16]

Імазапір — гербіцид, який можна застосовувати у зрошувальних каналах для контролю різних видів водних бур'янів. Проте його залишкова активність у поєднанні з фітотоксичністю навіть при низьких концентраціях вимагає ретельного управління водою в каналах після внесення імазапіру. [18] У водному середовищі імазапір проявляє різну стійкість залежно від умов навколишнього середовища. Він швидко розкладається під дією сонячного світла, з періодом напіврозпаду від 2 до 5 днів, що робить його менш стабільним у відкритих водоймах із достатнім сонячним випромінюванням. Водночас у затінених або глибоких водоймах, де доступ сонячного світла обмежений, імазапір може зберігатися значно довше.

Для зменшення екологічного ризику застосовують селективні норми витрат та методи внесення, що мінімізують стік і вимивання гербіциду. Крім того, враховується енантіоселективна деградація, при якій один зі стереоізомерів розкладається швидше, що впливає на залишкову активність речовини. [17]

1.2. Механізм дії похідних імідазолінонів

Імазамокс є новим гербіцидом, який наразі оцінюється для використання у водних системах за експериментальним дозволом (EUP) Агентства з охорони навколишнього середовища США. Обидва гербіциди, імазапір та імазамокс, належать до родини імідазолінонових гербіцидів.

Імазапір є системним гербіцидом, що маркований для застосування у водних системах [19, 20].

Мішенню дії імідазолінонових гербіцидів є фермент ацетолактатсинтаза (ALS, також відома як ацетогідроксікислотна синтаза (AHAS), який каталізує перший етап біосинтезу амінокислот із розгалуженим ланцюгом — ізoleyцину, лейцину та валіну.

ALS у рослин локалізується у хлоропластах, а в мікроорганізмів — у цитоплазмі. Абсолютно необхідним для каталізу є наявність кофакторів: ТПФ (тіамінпірофосфат) і Mg^{2+} або Mn^{2+} .

Цей фермент є ключовим контрольним пунктом у синтезі незамінних амінокислот, оскільки його інгібування повністю блокує подальший біосинтез білка у відповідних організмах. Зокрема, ALS каталізує першу лімітуючу стадію синтезу розгалужених амінокислот: конденсацію двох молекул піровиноградної кислоти → утворення ацетолактату (попередника валіну та лейцину) та конденсацію пірувати та α -кетобутирату → утворення ацето- β -гідроксибутирату (попередника ізoleyцину).

Імідазолінонові гербіциди інгібують активність ALS, що призводить до критичного зниження синтезу білка і загибелі рослин.

Фермент ALS відсутній у ссавців, птахів, риб та безхребетних, що робить гербіциди специфічно токсичними лише для рослин. [23] У водних тварин, зокрема у риб, фермент ALS є характерним лише для бактерій та рослин і відсутній у хребетних. Як відомо, риби отримують необхідні амінокислоти з їжею, тобто механізм, через який імідазоліни викликають токсичність у рослин, у риб та інших водних організмів не реалізується.

Імазапір та імазамокс швидко поглинаються листям і транспортуються по рослині через флоему та ксилему до цільових тканин. Обидва гербіциди пригнічують ріст рослин вже протягом перших 24 годин після застосування, проте візуальні симптоми зазвичай проявляються щонайменше через тиждень. Основною мішенню є меристематичні ділянки рослини, що проявляється повільним хлорозом листя та некрозом. [21, 22]

Імідазоліони, зокрема імазапір та імазамокс, потрапляють в організм водних тварин переважно через водне середовище. Вони можуть надходити у водойми внаслідок стоку, аерозольного внесення або випадкового потрапляння під час обробки. Основними шляхами надходження є абсорбція через шкіру та зябра, а також опосередковано через споживання корму.

Через шкіру та слизову оболонку водних тварин гербіцид може дифундувати у тіло, але цей шлях обмежений через високу полярність імідазоліонів, які здебільшого перебувають у водорозчинній аніонній формі, що зменшує проникність через ліпідні мембрани.

Найважливішим шляхом контакту є зяброва система, де вода постійно проходить через тканини з високою капіляризацією, забезпечуючи обмін газів і дифузію водорозчинних речовин. Проте дослідження показують, що навіть при високих концентраціях імазапіру та імазамоксу у воді абсорбція через зябра залишається низькою і не призводить до токсичного накопичення в тканинах риб або безхребетних. Так, наприклад, імазамокс має LC50 більше 100 мг/л для різних видів риб, що свідчить про його низьку токсичність для водних організмів. [15]

Опосередкований шлях надходження імідазоліонів у водні організми можливий через споживання рослин або водоростей, оброблених гербіцидом. Проте завдяки системним властивостям гербіцидів вони переважно накопичуються в рослинних тканинах, і кількість речовини, що може потрапити до водних організмів через корм, є мінімальною та не здатна викликати токсичних ефектів. [24]

Отже, імідазоліони потрапляють у водні організми переважно через воду, зябра та частково через корм, проте їхня біодоступність і токсичність для водних тварин залишаються низькими. Дослідження показують, що навіть при високих концентраціях у воді абсорбція через зябра залишається мінімальною і не призводить до токсичного накопичення в тканинах риб або безхребетних. [15, 24]

1.3 Фізіолого-біохімічні особливості відповіді гідробіонтів на токсичні впливи

Розвиток сільського господарства та глобальні зміни клімату спричиняють надходження біогенних сполук у водойми як з зовнішніх, так і з внутрішніх джерел. Будь-які хімічні речовини антропогенного походження, що потрапляють у водне середовище в концентраціях, які перевищують фонові значення, можна розцінювати як забруднювачі. Особливо чітко це проявляється в ставових та озерних гідроекосистемах, що істотно впливає на якість води, яка є середовищем існування численних гідробіонтів. За таких умов можуть формуватися зони підвищеного або критичного забруднення, створюючи екологічні умови, що виходять за межі оптимальних для більшості видів іхтіофауни. [25]

Джерела забруднення водойм України можна схематично представити таким чином:



Рис. 3 Джерела забруднення водойм та основні групи токсикантів [30]

Гідробіонти постійно перебувають у контакті з середовищем, яке містить різноманітні токсичні речовини, такі як метали, органічні сполуки, пестициди чи фармацевтичні залишки. Організм реагує на ці впливи комплексно: токсиканти можуть порушувати дихальні процеси, осмотичний баланс, функціонування мембран, активність ферментативних систем, спричиняти оксидативний стрес, ушкодження ДНК та білків, а також змінювати регуляторні сигнальні шляхи. Характер реакції організму визначається видом, віком, фізіологічним станом, тривалістю та концентрацією токсиканту, а також температурою, солоністю й іншими екологічними факторами. [26]

Переважає частина токсичних речовин, особливо йонів металів, надходить у тканини організму з навколишнього середовища шляхом іонного транспорту, дифузії, адсорбції на поверхні, через дихальні органи (зябра, шкіра) або через шлунково-кишковий тракт під час харчування. Потрапивши в організм, вони можуть накопичуватися у внутрішніх органах, таких як печінка, нирки, гепатопанкреатичні залози у моллюсків чи м'язи риб, порушуючи нормальні метаболічні процеси. Зазвичай токсиканти зв'язуються з білками-мішенями, заміщують необхідні мікроелементи або іони (наприклад, Zn, Cu), змінюють активність ферментів або порушують структуру клітинних мембран. [33]

Риbam для акліматизації в умовах стресу необхідно більше енергії, яку вони отримують із запасів поживних речовин, включно з білками, жирами та вуглеводами. Деякі метали (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn) мають окисно-відновний потенціал і здатні формувати активні форми кисню (АФК), які беруть участь у підтриманні фізіологічних процесів у риб. АФК водночас виступають індикаторами окисного стресу, що обмежує клітинну активність через деградацію білків, ліпідів та ДНК. Важкі метали накопичуються в організмах водних тварин через харчовий ланцюг і можуть спричиняти серйозні проблеми зі здоров'ям людини при споживанні такої забрудненої риби. [31]

Ключовим елементом відповіді організму на токсиканти є розвиток окислювального стресу. Цей процес є важливою фізіологічною реакцією у всіх тварин і впливає на розмноження, ріст, а також якість і кількість продукції у сільськогосподарських і культурних тварин, включно з рибами. Окислювальний стрес виникає через дисбаланс між утворенням активних форм кисню (АФК) і їх нейтралізацією антиоксидантною системою; водночас у нормальних фізіологічних умовах АФК виконують роль вторинних месенджерів. [32]

Окислювальний стрес переважно виникає внаслідок накопичення активних форм кисню (АФК) у клітинах і тканинах організмів, тому він є поширеним явищем у природі. Водні тварини мають різні клітинні механізми захисту від окисного стресу, головним чином через дію малих антиоксидантів та активність антиоксидантних ферментів. [27] Проте внаслідок антропогенного впливу та загострення факторів навколишнього середовища, таких як рН, температура та хімічні забруднювачі, клітинна антиоксидантна система зазнає пошкоджень. [28] Різноманітні забруднювачі, такі як пестициди, хлорорганічні та фосфорорганічні сполуки, є шкідливими для організмів, включно з рибами, а також негативно впливають на довкілля. Їхній вплив на риб проявляється у змінах ДНК, пригніченні активності антиоксидантних ферментів, модифікації експресії генів та синтезі білків теплового шоку, що в підсумку порушує нормальні фізіологічні процеси у риб. [29]

Оскільки багато токсичних впливів порушують метаболічні шляхи, зокрема дихання, електролітний та енергетичний обмін, у гідробіонтів спостерігаються численні зміни. Серед них — зниження споживання кисню, порушення активності дихального ланцюга (мітохондріальної електрон-транспортної системи), зміни в синтезі АТФ, дисфункція мембранних насосів (Na^+ / K^+ -АТФаза), порушення іонного гомеостазу (зміни концентрацій Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), підвищена проникність клітинних мембран (електролітне витікання) та ускладнення транспорту іонів і молекул через мембрани.

Для оцінки токсичного впливу багато дослідників використовують біомаркери на різних рівнях: молекулярному, біохімічному та фізіологічному. Сюди входять активація ферментів антиоксидантної системи, рівні заблокованих або модифікованих білків, накопичення продуктів окислення, активність детоксикаційних ферментів (наприклад, GST), показники репарації ДНК, функціонування мітохондрій та зміни генної експресії. Крім того, оцінюють інтегративні показники на рівні організму: ріст, виживаність, зміни маси тіла, репродукцію та поведінку. Хук і співавтори у своєму огляді акцентують увагу на використанні біомаркерів для оцінки якості водного середовища. [35]

Слід враховувати, що дія токсикантів у водному середовищі часто не є ізольованою: тут присутні суміші металів, органічних сполук та різні фактори якості води (рН, твердість, вміст органічної речовини). Ці умови можуть змінювати біодоступність токсикантів, їхню токсичність (через синергічні або антагоністичні ефекти) і, відповідно, силу реакції гідробіонтів. Наприклад, сучасні огляди органічних пестицидів, таких як гліфосат (GLY) та його формуляції, демонструють, що оксидативний стрес є загальним механізмом токсичності для водних організмів, а коформулянти та домішки можуть значно підсилювати її ефект. [36]

Нещодавні дослідження показують, що часовий аспект відповіді організму на токсиканти має важливе значення: на ранніх етапах токсикації змінюються метаболіти, активність ферментів та експресія генів, тоді як при тривалому впливі проявляються більш грубі ефекти, такі як мікроскопічні ушкодження та загибель клітин. Наприклад, у прісноводного равлика *Potamocorbula asinaria* при впливі $CdCl_2$ вивчали часові зміни як *in vivo*, так і на рівні транскриптома.

У водних безхребетних, таких як комахи-орошувачі, ракоподібні та молюски, під впливом важких металів та органічних токсикантів часто спостерігають специфічні біомаркери: підвищену активність ферментів SOD, CAT та глутатіон-S-трансферази (GST); збільшення концентрації MDA; зміни

рівнів глутатіону (GSH) та його окисненої форми (GSSG), а також співвідношення GSH/GSSG; варіації у вмісті білків стресу (heat-shock proteins, HSPs); коливання концентрацій металопротеїнів та металотіонінів. Ці показники дозволяють оцінити сублетальний рівень ушкоджень у організмів. Огляд літератури щодо впливу важких металів на безхребетних показує, що металотоксичність охоплює широкий спектр фізіологічних і біохімічних змін.[33]

Варто підкреслити, що чутливість різних груп гідробіонтів до токсикантів значно відрізняється. Наприклад, серед безхребетних ракоподібні зазвичай виявляють більшу чутливість до важких металів, ніж комахи, тоді як двостулкові молюски демонструють середній рівень чутливості. У дослідженні Malaj і співавторів визначали «фізіологічну чутливість» безхребетних до кількох металів і показали, що *Cladocera* виявилися значно чутливішими за більшість комах, тоді як молюски охоплювали широкий спектр чутливості. [34]

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали дослідження

Дослідження проводилось із метою вивчення впливу гербіцидів групи імідазолінонів на гідробіонтів, зокрема на модельному об'єкті — карась сріблястий (*Carassius gibelio*), який належить до родини коропових. Карась є типовим мешканцем прісноводних водойм помірної зони, відзначається високою витривалістю до коливань вмісту кисню, температури та хімічного складу води, що робить його оптимальним видом для лабораторних дослідів у модельних акваріальних системах [39,40].

Середня маса дослідних особин становила 50–70 г.

У дослідженні використовувався препарат «Євролайтинг» виробництва BASF, який відноситься до групи імідазолінонових сполук. Препарат містить дві діючі речовини — імазамокс (33 г/л) та імазапір (16 г/л). Обидві сполуки належать до системних гербіцидів, які інгібують фермент ацетолактатсинтазу (ALS), що порушує синтез розгалужених амінокислот і призводить до загибелі чутливих рослин [13]. Імазамокс та імазапір характеризуються помірною розчинністю у воді та можуть потрапляти у водні екосистеми внаслідок стоку з полів, що зумовлює необхідність оцінки їх токсикологічного впливу на водні організми [37].

Був передбачений окремий дослід із комбінованим впливом гербіциду Євролайтинг та мікроводоростей, а саме *Desmodesmus armatus*. Риб утримували в акваріумі, що містив Євролайтинг у концентрації 10 ГДК, до якого додавали культуру мікроводоростей, у кількості 5×10^7 клітин/л. Протягом усього 10-денного періоду воду не замінювали, а риб не годували, щоб уникнути додаткових зовнішніх факторів, здатних впливати на їхній метаболізм.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Умови утримання та експозиції риб у модельних системах за дії різних концентрацій імідазолінонів

Експеримент проводився в умовах чотирьох ідентичних акваріумів об'ємом по 30 літрів. В одному повторі у кожному акваріумі утримувалося по шість особин карася сріблястого ($n = 6$).

Утримання риб здійснювалося за стандартним протоколом: вода — відстояна водопровідна з додатковою аерацією, температура підтримувалася на рівні 22 ± 1 °C, розчинений кисень — не нижче 6 мг/л, рН — 7,0–7,5.

Дослід тривав три тижні: перший тиждень відведено на адаптацію в умовах акваріума (під час цього періоду риби отримували звичний корм двічі на добу), другий тиждень — експозиція гербіциду при відсутності корму (щоб ізолювати ефект хімічного стресу без додаткового впливу травлення та метаболізму корму), третій тиждень — повторна експозиція гербіциду при одночасному відновленні годування для вивчення взаємодії токсикант–живлення і можливих відтермінованих ефектів.

Протягом усього періоду експерименту здійснювався щоденний моніторинг фізико-хімічних показників води та поведінкових реакцій риб (активність, реакція на подразники, прийом корму, зовнішні ознаки інтоксикації). По завершенню дослідів відбирали зразки крові для подальших біохімічних аналізів.

Для отримання екологічно значимих рівнів експозиції використовувалась ідея кратних ГДК (1 ГДК, 2 ГДК, 5 ГДК, 10 ГДК), де за основу взято нормативні гранично допустимі концентрації пестицидів у воді відповідно до чинних державних санітарних правил України (ДСанПіН). У методиці використано значення ГДК для імідазолінонів (в експерименті оперували з орієнтовною ГДК для імазамоксу 0,00006 г/л, яке взято згідно з переліком допустимих рівнів у документі ДСанПіН). [38]

Початково готували маточний розчин імазамоксу (1 мг/л), далі готували робочі об'єми у 30-літрові акваріуми: щоб отримати 1 ГДК (0,00006 г/л у 30 л, тобто 0,0018 г), додавали 0,0018 л (18,3 мл) маточного розчину 1 г/л у 30 л; відповідно для 2 ГДК — 9,15 мл маточного розчину, для 5 ГДК — 3,6 мл, для 10 ГДК — 1,83 мл. Така схема мінімізувала похибку дозування.

У другий тиждень експозиції під час відсутності корму спостерігалися первинні реакції на токсикант (зміна активності, апатія, порушення орієнтації), а в третій тиждень, коли годування було відновлене, звертали увагу на зміни споживання корму та темпи відновлення рухової активності. Всі маніпуляції виконувалися у відповідності до принципів гуманного ставлення до тварин та місцевих етичних норм.

2.2.2 Підготовка біологічного матеріалу для аналізів: методики відбору проб крові риб із серця

Підготовка біологічного матеріалу є одним із найвідповідальніших етапів токсикологічних і фізіолого-біохімічних досліджень водних організмів. Достовірність подальших результатів аналізів безпосередньо залежить від правильності процедури відбору крові, дотримання стерильності, уникнення гемолізу та вибору правильного методу евтаназії.

Перед відбором крові, риб піддавали евтаназії із застосуванням препарату Oriscin – 0,2%, який є спеціалізованим засобом для безпечного знерухомлення та гуманного умиротворення риб. Згідно з інструкцією виробника (IRS-ZPiR, Zabieniec, Польща) та загальноприйнятими рекомендаціями з етики досліджень водних тварин, препарат застосовували у ваннах для іммерсії.

Риб занурювали у розчин Oriscin у концентрації 0,2% при температурі води 20–22°C до настання втрати рухової активності, відсутності реакції на механічні подразники та припинення дихальних рухів. Такий метод забезпечує безболісну евтаназію, мінімізує стресові реакції й запобігає викиду гормонів стресу, що можуть спотворювати біохімічні показники крові.[41, 42]

Після настання евтаназії риб, переходили до забору крові. Для цього використовували стерильні одноразові шприци об'ємом 5 мл. Відбір крові здійснювали через прокол серця. Рибу фіксували на вологій марлевій підкладці черевцем догори. Грудні плавці обережно розводили в сторони для візуалізації ділянки грудної порожнини. Голку вводили під кутом приблизно 45° у напрямку до спинної поверхні тіла в центрі між грудними плавцями, де розміщена верхівка серця. Прокол виконували плавно, до відчуття невеликого опору. При правильному введенні голки з'являється кров у шприці; аспірацію проводили повільно, щоб уникнути гемолізу. Оптимальний об'єм відібраної крові становив 1–2 мл для особин масою 50–70 г, що забезпечує достатній матеріал для проведення біохімічних аналізів. [43]

Центрифугування виконували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Важливо відзначити, що кров, отримана шляхом серцевої пункції, має найменший ризик контамінації міжтканинною рідиною порівняно з іншими способами відбору (з хвостової вени або зябрових судин), тому саме цей метод є пріоритетним для визначення біохімічних параметрів. [44]

2.2.3 Методи оцінки антиоксидантного статусу організму риб

Методика визначення рівня ТБК-активних продуктів

Визначення концентрації ТБК-активних продуктів (МДА) у сироватці крові є класичним спектрофотометричним методом для оцінки інтенсивності перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Принцип методу ґрунтується на реакції кінцевого продукту ПОЛ — малонового діальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) у кислому середовищі при нагріванні. Внаслідок реакції утворюється стійкий рожевий тріметиновий комплекс, інтенсивність поглинання якого прямо пропорційна концентрації МДА у зразку.

Для проведення дослідження до 0.5 мл сироватки крові додавали 2.5 мл буферного розчину Трис-НСІ (рН 7.4), що містить 0.025М Трис-НСІ та 0.175М КСІ. Для осадження білків додавали 1 мл 17 % розчину трихлороцтової

кислоти (ТХО). Після додавання ТХО зразки піддавали центрифугуванню протягом 10 хвилин при 4000 g для отримання надосадової рідини.

Для кольорової реакції готували дослідну та контрольну проби:

- 1) Для дослідної проби беремо 2 мл отриманої надосадової рідини та додаємо 1 мл 0.8\% розчину тіобарбітурової кислоти (ТБК).
- 2) Для контрольної проби беремо 2 мл буферу Трис-НСІ та додаємо 1 мл 0.8\% розчину ТБК.

Обидві проби поміщають на киплячу водяну баню на 10 хвилин. Після появи характерного рожевого забарвлення, що свідчить про утворення тріметинового комплексу, проби охолоджують при кімнатній температурі.

Оптичну густина дослідної проби ($E_{\text{дослід.}}$) вимірюють на спектрофотометрі відносно контролю при довжині хвилі 532 нм.

Концентрацію ТБК-активних продуктів (C) розраховують за наступною формулою:

$$C = \frac{E_{\text{д}} \cdot V_{\text{р}} \cdot 10^5}{1,56 \cdot V_{\text{н}} \cdot C_{\text{б}}}, \text{ де}$$

$E_{\text{д}}$ – оптична густина дослідної проби;

$V_{\text{р}}$ – об'єм реакційної суміші, мл;

$V_{\text{н}}$ – об'єм надосадової рідини, мл;

$1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – молярний коефіцієнт поглинання МДА;

$C_{\text{б}}$ – загальний вміст білків, мг/мл. [48]

Визначення супероксиддисмутазної активності

Методика визначення ферментативної активності супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) базується на здатності ферменту інгібувати автоокиснення адреналіну в лужному середовищі. [46]

Для оцінки активності супероксиддисмутази спочатку готували контрольну пробу, до якої вносили 2,8 мл 0,2 М карбонатного буфера (рН

=10,65) та 200 мкл 0,1% розчину адреналіну. Спектрофотометричні вимірювання проводили при довжині хвилі 347 нм. Перше значення фіксували до внесення адреналіну, друге — одразу після його додавання, а подальші — через кожні 30 секунд упродовж трьох хвилин. Така реєстрація дає можливість визначити швидкість авто окиснення адреналіну в лужних умовах.

Після завершення контролю виконували вимірювання дослідних зразків, до складу яких входили 2,7 мл карбонатного буфера, 100 мкл сироватки крові та 200 мкл 0,1% адреналіну. Їх аналізували аналогічно: за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 347 нм із фіксацією оптичної щільності за тією ж часовою схемою, як і для контрольної проби.

Активність СОД розраховували за формулою:

$$E = \frac{E_d \cdot V_p \cdot 1000}{4,5 \cdot V_c \cdot C_b}, \text{ де}$$

E_d – середнє арифметичне значення усіх оптичних густин за 3 хв;

V_p – об'єм реакційної суміші, мл;

$4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – коефіцієнт молярної абсорбції адренохромун;

V_c – об'єм сироватки крові, мл;

C_b – загальний вміст білків, мг/мл

Визначення каталазної активності

Для визначення каталазної активності (КФ 1.11.1.6) використовували спектрофотометричний колориметричний метод, заснований на вимірюванні залишкового пероксиду водню після взаємодії із зразком сироватки. [45]

У пробірку вносили 2,0 мл 0,03% розчину $\text{H}_2 \text{O}_2$ і додавали 100 мкл сироватки крові, після чого суміш інтенсивно перемішували та інкубували при 37 °С протягом 10 хвилин. Паралельно готували холосту пробу (контроль), куди вносили лише 2,0 мл 0,03% $\text{H}_2 \text{O}_2$ без біологічного матеріалу, а також контрольну пробу для вимірювання фону, що складалася з 2,0 мл $\text{H}_2 \text{O}_2$, 100 мкл води та 4% розчину молібдат амонію.

Після закінчення інкубації реакцію у дослідній пробі зупиняли додаванням 4% розчину молібдат амонію, який утворює зі залишковим H_2O_2 стабільний жовтий комплекс; таким чином зупиняється подальший розклад перекис водню і забезпечується можливість кількісного вимірювання. Для оцінки кількості залишкового H_2O_2 вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 410 нм на спектрофотометрі.

Формула для обчислення каталазної активності:

$$E = \frac{(A_{\text{хол.}} - A_{\text{дос.}}) \cdot V \cdot t \cdot 1000}{22,2 \cdot C_6}, \text{ де}$$

$A_{\text{хол}}$ – оптична густина холостої проби;

$A_{\text{дос}}$ – оптична густина дослідної проби;

V – об'єм проби, мл;

t – час інкубації, 10хв;

$22,2 \times 10^{-3} \text{ мМ} \cdot \text{см}^{-1}$ – коефіцієнт мілімолярної екстинції перокс водню;

C_6 – загальний вміст білка у пробі, мг/мл.

2.2.4 Методи визначення показників функціональної активності печінки та клінічних показників крові

Визначення активності АЛТ, АСТ, ГГТ та лужної фосфатази

Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ, КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (АСТ, КФ 2.6.1.1), γ -глутамілтрансферази (ГГТ, КФ 2.3.2.2) та лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1) проводили із використанням автоматичного біохімічного аналізатора BioChem FC-200 (Intermedica), робота якого ґрунтується на кінетичному методі.

Аналізатор здійснює вимірювання зміни оптичної щільності реакційної суміші у реальному часі, що дає змогу реєструвати швидкість ферментативних реакцій і розраховувати активність ферментів у досліджуваній сироватці. Температура під час аналізу становить 37 °С, що відповідає стандартним

умовам клініко-біохімічних досліджень та забезпечує оптимальну кінетику ферментів. [47]

Перед початком роботи проводять калібрування та автоматичний самоконтроль системи, після чого в комірки реакційного ротора дозують реагенти та зразки відповідно до робочого протоколу приладу. Реагенти для визначення АЛТ і АСТ містять субстрати α -кетоглутарат та відповідні амінокислоти, що забезпечують реакції переамінування з подальшим вимірюванням утворення пірувату або оксалоацетату, які перетворюються дегідрогеназою з утворенням НАДН, оптична густина якого реєструється фотометрично. У випадку визначення ГГТ аналізатор фіксує швидкість перенесення γ -глутамільної групи на хромогенний субстрат з утворенням продукту, що забарвлюється, а активність лужної фосфатази визначають за швидкістю гідролізу фосфорильованого субстрату у лужному середовищі з подальшою фотометричною реєстрацією.

Після завантаження зразків аналізатор автоматично змішує реакційні компоненти та проводить безперервне вимірювання зміни оптичної густини впродовж реакції. Активність кожного ферменту обчислюється за швидкістю зміни оптичної щільності в одиницях мікромоль субстрату, перетвореного за хвилину в одному літрі сироватки (U/L). Отримані дані реєструються програмним забезпеченням приладу та експортуються для подальшої статистичної обробки.

2.2.5 Методи статистичної обробки результатів

Усі отримані дані піддавалися статистичній обробці для оцінки достовірності різниць між групами. Розрахунки проводилися за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel.

Для порівняння середніх значень двох незалежних груп застосовувався критерій Стьюдента (t -тест). Цей метод дозволяє визначити, чи є статистично значущою різниця між середніми показниками двох груп при нормальному розподілі даних. Результати представляли у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення. Рівень статистичної значущості приймався $p < 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ та активність ферментів антиоксидантного захисту у сироватці крові *Carassius gibelio* за дії різних концентрацій Євролайтингу

Одним з доведених механізмів впливу широкого кола пестицидів, що потрапляють у водойми, на гідробіонтів є спричинення ними надмірного утворення активних форм кисню, які здатні ініціювати процеси окислення біомакромолекул. Зокрема, можливим є ініціювання пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), особливо в мембранах еритроцитів та інших клітин, що зумовлює утворення ТБК-продуктів.

ТБК-активні продукти є маркером інтенсивності пероксидного окислення ліпідів і слугують прямим індикатором окислювального стресу в організмі риб під впливом токсиканту. Зростання показника ТБК свідчить про пошкодження клітинних мембран внаслідок дії вільних радикалів, що є типовим механізмом токсичності пестицидів. Вимірювання рівня ТБК-активних продуктів дозволяє кількісно оцінити ступінь оксидативного ушкодження клітин, спричинений гербіцидом, та порівняти ефект різних концентрацій препарату.

Дослідження показали чітке дозозалежне зростання рівня ТБК, що є прямим доказом розвитку гострого окислювального стресу. Порівняно з контрольною групою концентрація ТБК-продуктів протягом першого тижня експозиції послідовно зростала вже від 2 ГДК (близько 15 %), а у групі 10 ГДК зафіксовано пікове значення, що перевищує контроль більш як удвічі (рис. 3.1.1).

Це експоненційне зростання вказує на те, що токсична речовина стимулює масову продукцію вільних радикалів, які атакують поліненасичені жирні кислоти клітинних мембран, а початковий рівень антиоксидантного захисту риб виявився недостатнім для нейтралізації цього гострого впливу.

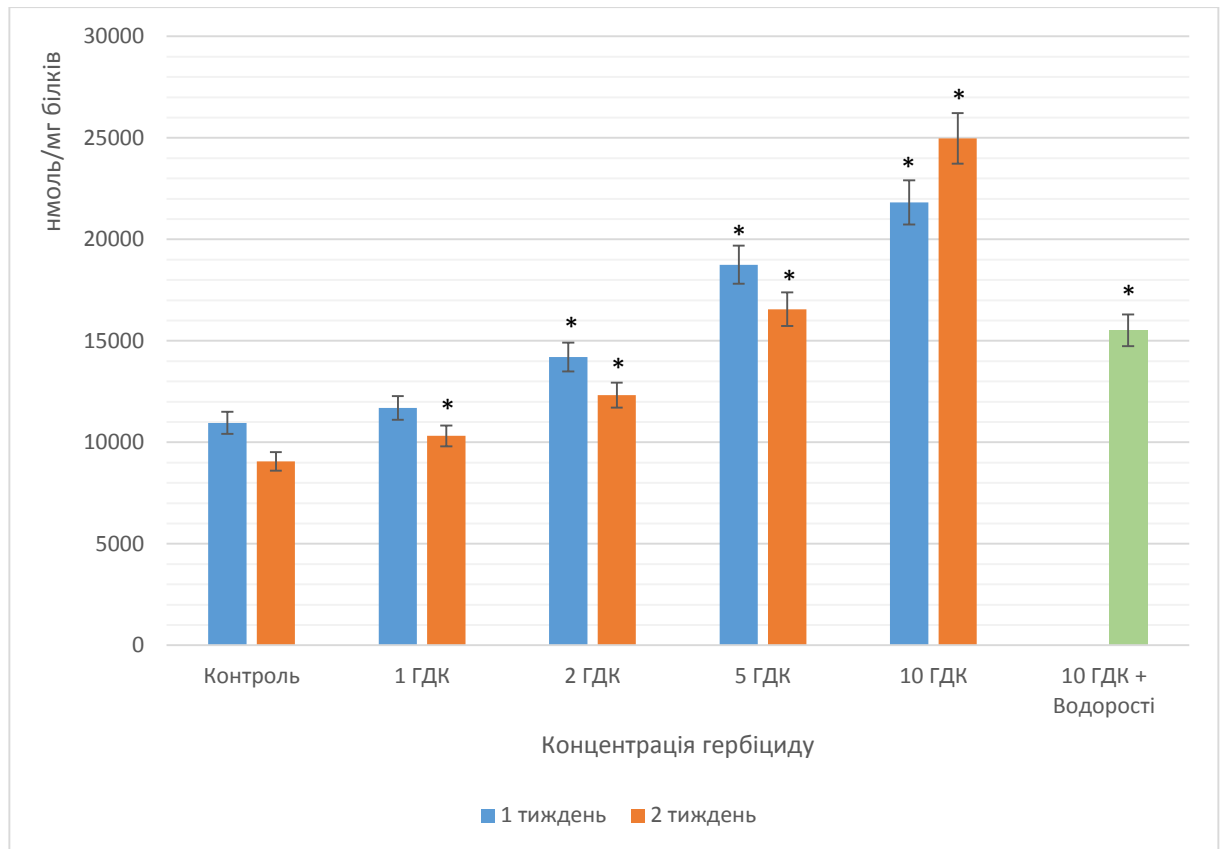


Рис. 3.1.1 Рівень ТБК-активних продуктів в сироватці крові у *Carassius gibelio* при 14-денній експозиції у воді з різними концентраціями Євролайтингу

Примітка: * – різниця показника є статистично значущою порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

У дослідженні El-Sayed та ін. [61] показано, що під дією гербіциду пендиметаліну у *Oreochromis niloticus* спостерігається різке підвищення рівня ТБК-активних продуктів (TBARS) у печінці та зябрах, що прямо свідчить про активацію процесів ліпідної пероксидації. Автори зазначають, що токсикант стимулює посилену генерацію вільних радикалів, які атакують поліненасичені жирні кислоти мембран, спричиняючи структурне пошкодження клітин і порушення функції антиоксидантної системи.

На другому тижні спостерігалася фаза хронічної декомпенсації та прогресуючого стресу. Хоча показник контролю знизився, у групах із високою концентрацією інтенсивність ПОЛ продовжила зростати. У групі 5 ГДК вміст ТБК-продуктів збільшився у 1.83 рази порівняно з контролем, а у групі 10 ГДК - досяг максимального значення (збільшення у 2.76 рази в порівнянні з

контролем). Це стійке зростання на другому тижні, яке для 10 ГДК є навіть вищим, ніж на першому, свідчить про те, що антиоксидантна система організму була виснажена і не змогла відновити гомеостаз. Цей прогресуючий хронічний ПОЛ викликає незворотні структурні зміни у клітинних мембранах печінки та м'язів, що пояснює паралельне зростання активності трансаміназ (АЛТ та АСТ), які ми спостерігали. За даними Khatib [62], прогресуюча хронічна ліпідна пероксидація призводить до накопичення ТБК-реактивних продуктів, що викликають незворотні структурні ушкодження поліненасичених фосфоліпідів клітинних мембран. Це, у свою чергу, спричиняє порушення цілісності мембран гепатоцитів і м'язових клітин, втрату бар'єрних властивостей, розлад іонного транспорту та розвиток хронічної дегенерації тканин.

У групі 10 ГДК + Водорості рівень ТБК-активних продуктів залишається вищим за контроль приблизно у 1.71 рази. Додавання водоростей знижує активність ферменту у порівнянні з групою 10 ГДК близько 38%. Такий різкий спад є прямим доказом антиоксидантного та цитопротекторного ефекту біодобавки. Водорості, завдяки високій концентрації каротиноїдів, токоферолів та інших біологічно активних речовин, ефективно нейтралізували вільні радикали та стабілізували клітинні мембрани, запобігаючи окисленню ліпідів і, як наслідок, блокуючи розвиток хронічного окислювального стресу. У дослідженні Miranda та співавторів [63], показано, що екстракт мікроводорості *Spirulina maxima* містить значні кількості β -каротину, α -токоферолу та фенольних сполук, які в експерименті *in vitro* і *in vivo* зменшували утворення ТБК-реактивних продуктів у печінці лабораторних тварин. Крім того, згідно з дослідженнями Coulombier та співавторів [64], водорості характеризуються високою антиоксидантною спроможністю завдяки каротиноїдам, токоферолам та іншим біологічно-активним компонентам, які можуть ефективно нейтралізувати вільні радикали та запобігати ліпідній пероксидації — тобто блокувати підвищення ТБК-продуктів.

Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) є першою лінією антиоксидантного ферментативного захисту, оскільки вона каталізує дисмутацію високореактивного супероксидного радикала на менш токсичний перекис водню. Динаміка активності СОД має вирішальне значення для розуміння гострої та хронічної відповіді організму на окислювальний стрес, спричинений гербіцидом Євролайтинг.

На першому тижні експозиції спостерігалася потужна дозозалежна індукція активності СОД, що є прямим доказом розвитку гострого окислювального стресу (рис. 3.1.2)

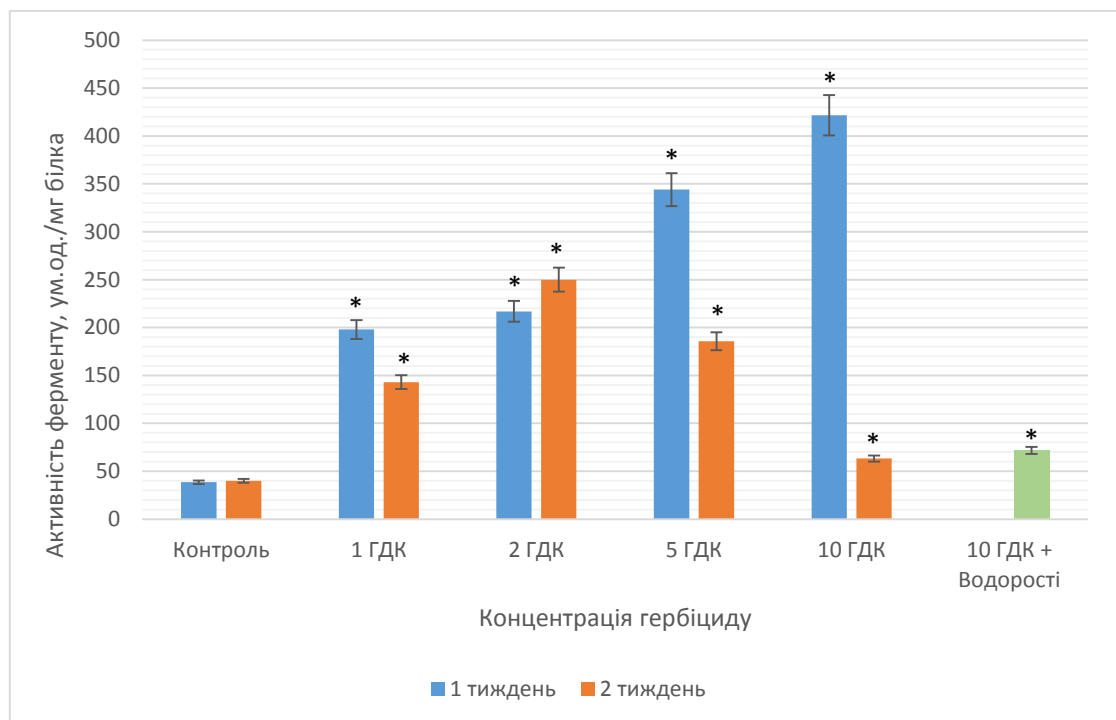


Рис. 3.1.2 Активність СОД у сироватці крові *Carassius gibelio* при 14-денній експозиції у воді з різними концентраціями Євролайтингу

Примітка: * – різниця показника є статистично значущою порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

Порівняно з контрольною групою, активність ферменту стрімко зростає, у групі 5 ГДК збільшилася майже у 9 разів. У групі 10 ГДК зафіксовано максимальне значення, яке перевищило контрольну групу більш ніж в 10,9 разів. Таке значне зростання активності СОД є доказом інтенсивної генерації супероксидних радикалів і свідчить про максимальну мобілізацію внутрішнього антиоксидантного ресурсу для запобігання клітинному

ураженню. У дослідженнях Atamaniuk та ін. [68], при експозиції золотої риби *Carassius auratus* гербіцидом 2,4- D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid) дані свідчать про те, що токсикант індукує значну генерацію реактивних форм кисню, що супроводжується активацією антиоксидантної відповіді у вигляді підвищення ферментативної активності, але одночасно фіксується ушкодження ліпідів мембран (зростання ТБК-активних продуктів) — тобто, токсичний вплив проявляється через механізм оксидативного стресу.

На другому тижні спостерігається фаза хронічного виснаження антиоксидантних резервів. На відміну від першого етапу експерименту, активність СОД у групах із високою концентрацією токсиканту різко знизилася, що свідчить про декомпенсацію системи. У групі 10 ГДК активність СОД критично впала до ± 63.3 U/мг білків, що становить лише близько 15% від пікового значення 1-го тижня. Це критичне падіння є індикатором того, що тривалий інтенсивний окислювальний стрес призвів до виснаження або незворотної інактивації ферменту. Дослідження M. Ali та ін. [69] показало, що у риб при тривалій дії хлорпірифосу активність СОД змінювалася залежно від тривалості експозиції. На ранніх етапах спостерігалось підвищення активності ферментів, що вказує на активацію антиоксидантного захисту у відповідь на надлишкову генерацію реактивних кисневих форм. Нездатність системи СОД ефективно нейтралізувати супероксидні радикали призводить до їхнього накопичення та, як наслідок, до прогресуючого ПОЛ, що підтверджується зростанням показників ТБК на 2-му тижні.

Активність СОД у групі з водоростями була вищою приблизно на 13.4% порівняно з групою 10 ГДК на 2-му тижні. Це підтверджує, що наявність біодобавки забезпечила часткову стабілізацію та підтримку антиоксидантного статусу. Завдяки внесенню екзогенних антиоксидантів (від водоростей), первинне навантаження на внутрішню систему СОД було зменшене, що допомогло зберегти функціональність ферменту, запобігши його повному виснаженню та, відповідно, пом'якшивши розвиток хронічного

окислювального стресу. У дослідженні Abdel-Daim M. M. та співавторів [70], присвяченому впливу інсектициду хлорпірифос на тиліпію (*Oreochromis niloticus*), показано, що додавання *Spirulina platensis* до раціону риб значно підвищувало активність антиоксидантних ферментів СОД та каталази у порівнянні з групою, що отримувала лише токсикант. Результати демонструють, що екзогенні антиоксиданти мікродоростей ефективно підтримують внутрішню антиоксидантну систему риб, зменшуючи оксидативне навантаження, яке спричинює євролайтинг. Підвищення активності СОД свідчить про те, що водорості допомагають зберегти функціональність ферментів, запобігаючи їх виснаженню або інактивації, і тим самим підтримують захисні механізми організму проти реактивних форм кисню.

Активність каталази (CAT, КФ 1.11.1.6) є ще одним ключовим індикатором ферментативного антиоксидантного захисту організму риб, оскільки цей фермент відповідає за детоксикацію ендогенно утвореного перекису водню — однієї з найбільш агресивних реактивних форм кисню.

На першому тижні експозиції зафіксовано різке зростання активності каталази, що є прямим проявом гострої активації антиоксидантної системи у відповідь на токсичний шок (рис. 3.1.3).

Порівняно з контрольною групою, найбільш значуще зростання спостерігалось у групі 10 ГДК, де активність каталази збільшена у 4,4 рази. Таке істотне збільшення активності є фізіологічною захисною компенсаторною реакцією організму на підвищену генерацію активних форм кисню, спричинену гербіцидом, і спрямована на мінімізацію пошкодження клітинних структур.

Помірне зростання також спостерігалось у групах 2 ГДК (± 2.2 мкмоль/мг білка) та 5 ГДК (± 2.5 мкмоль/мг білка).

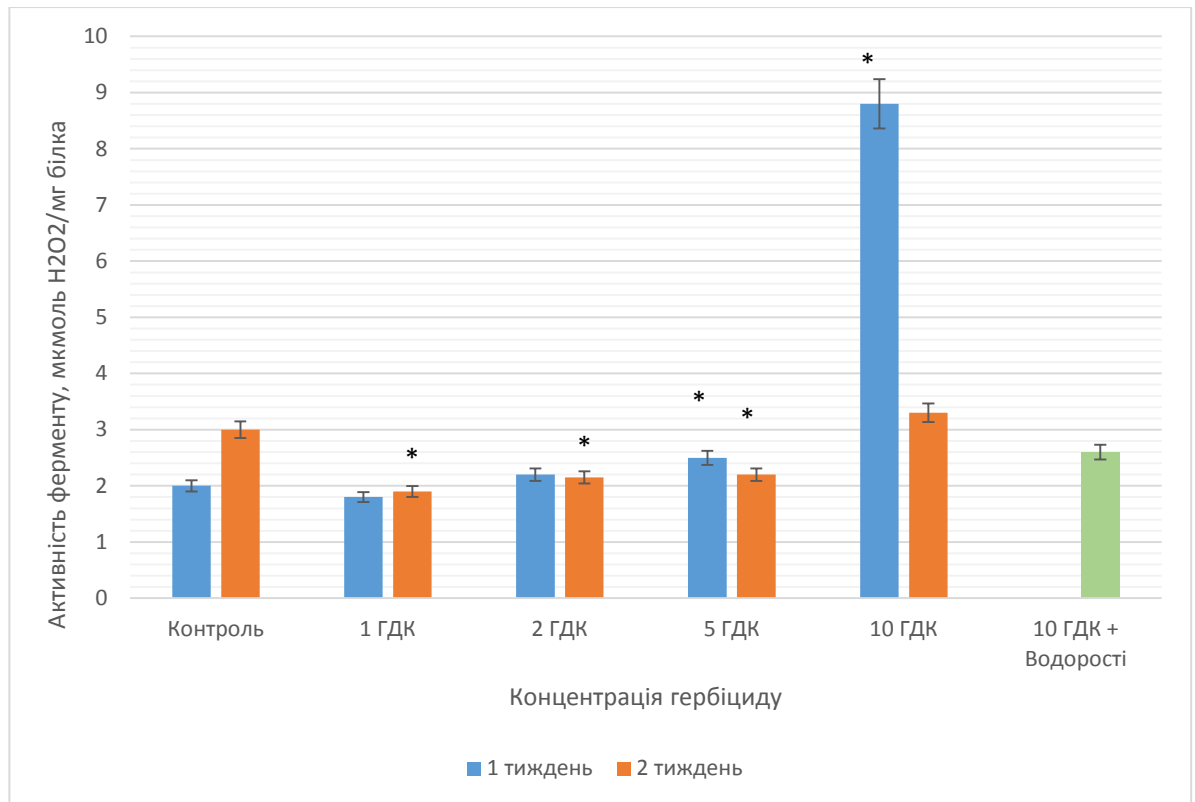


Рис. 3.1.3. Активність каталази в сироватці крові у *Carassius gibelio* при 14-денній експозиції у воді з різними концентраціями Євролайтингу
Примітка: * – різниця показника є статистично значущою порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

У дослідженні Samanta, Pal. [65] на трьох прісноводних рибах (*Anabas testudineus*, *Heteropneustes fossilis* та *Oreochromis niloticus*) показано, що 30-денна експозиція Almix® (8 г/акр) призводить до значного підвищення активності каталази у всіх досліджених тканинах — найвищий приріст зафіксований у зябрах *O. niloticus* (~150,5 % від контролю), а найнижчий — у печінці тієї ж риби (~108,9 %). Це підвищення САТ інтерпретується як адаптивна захисна відповідь на підвищену генерацію активних форм кисню під впливом гербіциду, оскільки каталаза розщеплює перекис водню ($H_2 O_2$) і таким чином знижує оксидативне навантаження.

Результати досліджень показали, що на другому тижні експерименту спостерігалася фаза хронічного виснаження антиоксидантних резервів. У групах, що піддавалися високому токсичному впливу, відбулося значне зниження активності. Зокрема, у групі 10 ГДК активність каталази різко

знизилася до ± 3.3 мкмоль/мг білка. Це зниження (порівняно з піковим значенням ± 8.8 мкмоль/мг білка на 1-му тижні) є критичним індикатором виснаження синтетичної функції ферменту або його інактивації через тривалий та неконтрольований окислювальний стрес. Ця декомпенсація захисту на пряму пояснює, чому саме на другому тижні спостерігалось максимальне прогресуюче зростання ПОЛ (за вмістом ТБК-активних продуктів), оскільки перекис водню більше не міг бути ефективно детоксикований. Подібні зміни описані й у оглядовій статті Slaninova та співавт. [66], де підкреслюється, що при хронічному впливі пестицидів накопичення реактивних форм кисню перевищує можливості ферментативних механізмів детоксикації. У результаті каталаза, після короткої фази активації, переходить у стадію функціонального пригнічення, що є характерним проявом тривалого окисдативного стресу у риб.

У групі 10 ГДК + Водорості, активність каталази становила ± 2.6 мкмоль/мг білка, що знаходилося в межах норми і не демонструвало виснаження. Цей факт підтверджує ефективну стабілізацію антиоксидантного статусу організму. Наявність водоростей, як потужного джерела екзогенних антиоксидантів, забезпечила додатковий захист, мінімізувавши надмірне вироблення АФК. Як наслідок, відпала необхідність у надмірній індукції внутрішньої системи каталази, що дозволило ферменту підтримувати активність у межах фізіологічної норми і запобігло хронічному виснаженню. Згідно з оглядом Накао та співавторами [67], каротиноїди — жиророзчинні пігменти з численними кон'югованими подвійними зв'язками — проявляють потужну антиоксидантну активність, і, зокрема, в тканинах риб, астаксантин (ASX) синергічно взаємодіє з такими антиоксидантами, як α -токоферол, аскорбінова кислота та глутатіон, для регуляції вироблення реактивних кисневих форм та попередження ліпідної пероксидації.

3.2 Оцінка впливу похідних імідазолінонів в різних концентраціях на показники функціональної активності печінки риб

Активність лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1) у сироватці крові є важливим біомаркером, який інтегрально відображає функціональний стан печінки, жовчовивідних шляхів та загальний метаболічний стрес, особливо при дії ксенобіотиків. Аналіз динаміки ЛФ у сироватці крові карасів, експонованих до різних концентрацій гербіциду Євролайтинг, виявив значні зміни, які були залежними від концентрації гербіциду, тривалості експозиції та умов годівлі (рис. 3.2.1).

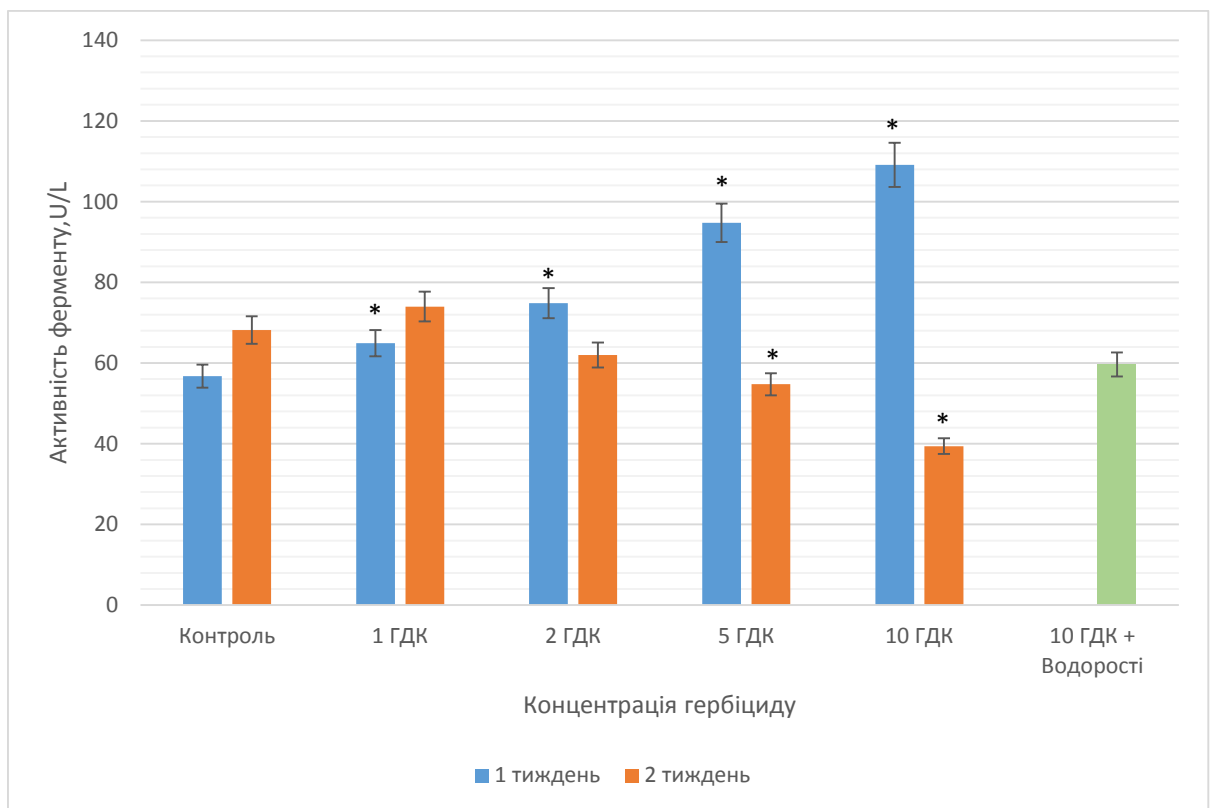


Рис. 3.2.1 Активність лужної фосфатази в сироватці крові у *Carassius gibelio* при 14-денній експозиції у воді з різними концентраціями Євролайтингу

Примітка: * – різниця показника є статистично значущою порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

Перший тиждень, що супроводжувався додаванням гербіциду та голодуванням, був фазою гострого токсичного стресу. У цей період активність ЛФ демонструвала чітку дозозалежну активацію, що є типовою реакцією

організму риб на токсичний вплив. У контрольних групах та групах із низькими концентраціями (1 ГДК та 2 ГДК) зростання показника було не значущим, що свідчить про ефективну компенсацію токсичного впливу на початковому етапі. Однак, при концентрації 5 ГДК активність ЛФ різко зросла приблизно в 1.67 рази порівняно з контролем. Максимальна активація була зафіксована у групі 10 ГДК, де активність ЛФ перевищила контроль приблизно у 1.92 рази, такий стрибок ЛФ свідчить про гостру гепатотоксичність, оскільки пошкодження клітинних мембран гепатоцитів спричиняє масове вивільнення ферменту в кров. Подібні дозозалежні підвищення активності ферментів як показників гострого стресу та ураження печінки були відзначені у дослідженнях Вівек та співавторів, при впливі гербіцидів на риб [49].

На 2-му тижні експозиції, при відновленні годівлі, у контролі активність ЛФ зросла до ± 68.161 U/L. На цьому тлі групи з низькими та середніми концентраціями (1 ГДК, 2 ГДК, 5 ГДК) продемонстрували успішну адаптацію. Це вказує на те, що механізми детоксикації карасів повністю впоралися з хронічним навантаженням низьких доз гербіциду. Проте, у групі 10 ГДК спостерігалось патологічне пригнічення активності ЛФ, що є статистично значущим зниженням і становить лише близько 58% від рівня контролю 2-го тижня. Ця декомпенсація, що настала після гострого зростання на 1-му тижні, може бути інтерпретована як ознака хронічної патології або виснаження ферментативної системи печінки, що узгоджується з висновками Хурпаде та співавторів, про токсичні процеси в гідробіонтів. [50]

Оцінка групи 10 ГДК + Водорості є критично важливою для підтвердження гіпотези про можливість біокорекції токсичного впливу гербіциду. Активність ЛФ у групі з водоростями була вищою приблизно на 51% порівняно з групою 10 ГДК на 2-му тижні. Це свідчить про виражений цитопротекторний ефект водоростей, які успішно модулювали токсичну дію. Літературні дані підтверджують, що мікрководорості (наприклад, *Spirulina* або *Chlorella*) здатні виступати як потужні антиоксидантні агенти, нейтралізуючи

вільні радикали, що утворюються в печінці при метаболізмі ксенобіотиків, і запобігаючи руйнуванню мембран гепатоцитів. Подібні експерименти, що демонструють здатність біодобавок мінімізувати біохімічні порушення, були успішно проведені дослідницькими групами Ель-Саєд та співавторами [51] при вивченні захисту риб від важких металів, а також Мостафа та співавторами [52] у роботах з африканським сомом при впливі пестицидів, де також спостерігалось відновлення активності ключових метаболічних ферментів. Наші результати узгоджуються з цими даними, підтверджуючи, що додавання водоростей сприяло успішній метаболічній адаптації карасів, запобігаючи хронічному пригніченню ЛФ і підтримуючи функцію печінки ближче до фізіологічної норми.

Аланінамінотрансфераза (АЛТ, КФ 2.6.1.2) — це фермент, який каталізує обмін аміногруп між амінокислотами та α -кетокислотами, зокрема перетворення аланіну в піруват.

У риб АЛТ локалізується переважно в печінці та, у меншій мірі, у серці, нирках і м'язах. Визначення АЛТ у сироватці крові використовується як біохімічний маркер стану печінки. Підвищення активності АЛТ у сироватці крові свідчить про ушкодження гепатоцитів і вихід ферменту в кров, що відбувається при токсичних впливах, інфекційних захворюваннях або стресових станах.

На першому тижні експозиції зафіксовано чітке зростання активності АЛТ (рис. 3.2.2). Це зростання є прямим індикатором гострого цитолізу та порушення цілісності клітинних мембран, спричинених дією токсиканту. Порівняно з контрольною групою, у групі 1 ГДК показник був підвищений у 1.51 рази, а у групі 2 ГДК зростання було більш вираженим приблизно у 2.73 рази. У групі 5 ГДК активність зросла зросла у 4.47 рази, а у групі 10 ГДК зафіксовано пікове значення яке перевищило контроль у 6.41 рази, що є статистично високо значущим результатом та підтверджує критичний рівень гострої гепатотоксичності при найвищій концентрації.

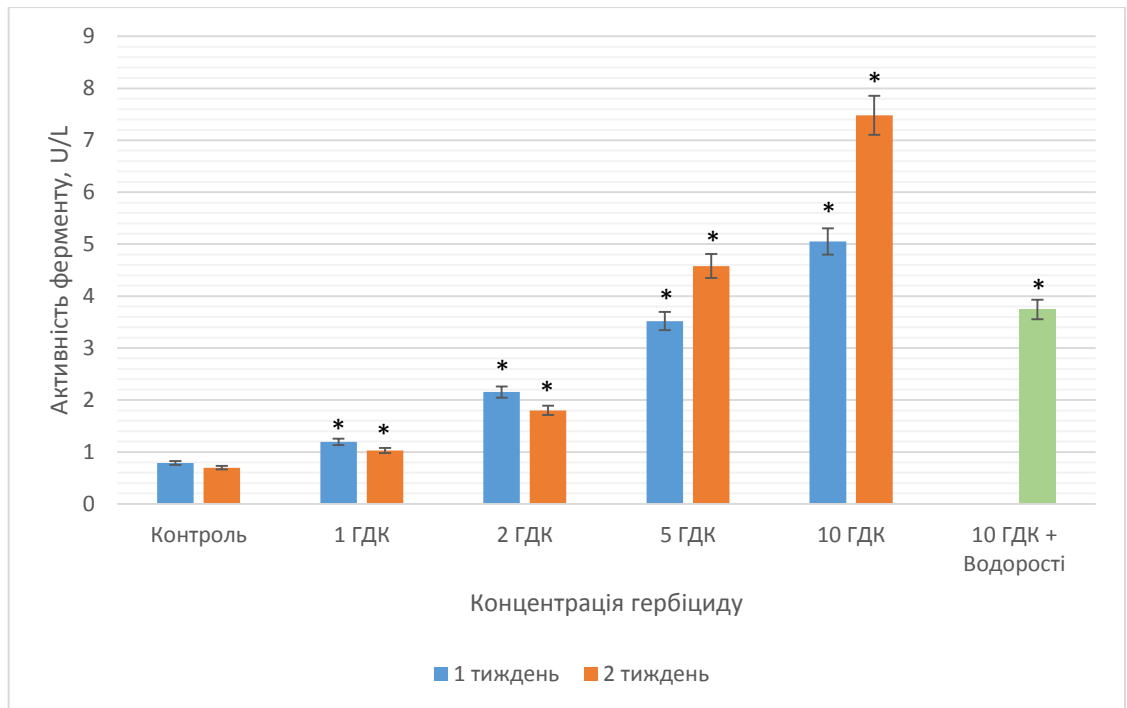


Рис. 3.2.2 Активність АЛТ в сироватці крові у *Carassius gibelio* при 14-денній експозиції у воді з різними концентраціями Євролайтингу

Примітка: * – різниця показника є статистично значущою порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

Подібне зростання активності трансаміназ як індикатора гострої гепатотоксичності при впливі пестицидів документується у дослідженнях Vlahova, J. та співавт.[56], що після 96 годин гострої експозиції з атразином у коропа (*Cyprinus carpio L.*) активність печінкового ферменту АЛТ у сироватці значно підвищилась порівняно з контролем, що свідчить про розвиток гострого цитолізу й порушення цілісності гепатоцитів. При семиденного відновлювального періоду активність АЛТ залишалась підвищеною, що вказує на недостатню повноту регенерації печінки.

Аналіз активності АЛТ на другому тижні експерименту, порівняно з контрольною групою демонструє фазу хронічного гепатотоксичного впливу з ознаками прогресуючого ураження. У низьких концентраціях (1 ГДК та 2 ГДК) зростання АЛТ є помірним (відповідно, у 1.47 рази та у 2.58 рази вище за контроль), що може свідчити про неповну адаптацію організму. Проте, у вищих концентраціях зафіксовано статистично значуще та прогресуюче

зростання активності АЛТ, що вказує на нездатність печінки до відновлення та розвиток хронічного ураження. У групі 5 ГДК активність АЛТ зросла у 6.56 рази, що є значущою відмінністю ($p < 0.05$) порівняно з контролем. У групі 10 ГДК зафіксовано максимальне значення яке перевищило контроль у 10.72 рази і було вищим близько 48% за показник першого тижня. Це прогресуюче підвищення АЛТ свідчить про хронічне, кумулятивне ураження та постійний цитоліз гепатоцитів. На відміну від адаптації, ця динаміка вплинула на риб як тривалий токсичний стрес, який перешкоджає регенерації та може призвести до структурних змін у печінці, що є ознакою хронічної гепатопатії. Подібна прогресуюча тенденція підвищення АЛТ була описана в дослідженнях хронічної експозиції атразину: наприклад, Liu та ін. [57] за 12-тижневого впливу в коропів виявили біохімічні та гістопатологічні ознаки гепатотоксичності, що свідчить про накопичувальний характер ушкоджень. Також у дослідженні 12-тижневої експозиції Vlahova, J та співавт.[56] було зафіксовано значні зміни в біохімічному й окислювальному статусі риб, що підтверджує ідею тривалого токсичного стресу, а не просто адаптацію.

Аналіз показників активності АЛТ у групі 10 ГДК + Водорості на другому тижні становила ± 0.741 U/L, це значення перевищує контроль 2-го тижня у 5.36 рази. Цей результат свідчить про виражений цитопротекторний ефект біодобавки. Порівняно з групою 10 ГДК 2-го тижня, додавання водоростей призвело до зниження активності АЛТ до 50%, що підтверджувало розвиток прогресуючого хронічного ураження печінки. Таким чином, введення водоростей у раціон повністю запобігло виникненню як гострого пошкодження, так і подальшої хронічної декомпенсації (виснаження або прогресуючого ураження), що спостерігалось у відповідній групі з максимальною концентрацією гербіциду. Захисна дія біодобавки пояснюється високим вмістом в ній антиоксидантів (каротиноїдів, токоферолів) та інших біологічно активних компонентів. Подібний захисний ефект дієтичного введення водоростей було продемонстровано W.S. Tawfeek та співавторами [58], які встановили, що додавання *Chlorella vulgaris* значною мірою

пом'якшує токсичний вплив хлорпірифосу на тілапію (*Oreochromis niloticus*). Зокрема, автори показали часткове відновлення активності печінкових ферментів ALT та AST, зниження інтенсивності оксидативного стресу та стабілізацію імунних показників, що підтверджує її виражені гепатопротекторні властивості.

Активність аспаратамінотрансферази (КФ 2.6.1.1) продемонструвала чітку двофазну залежність від концентрації гербіциду Євролайтинг, що відображає перехід від гострого клітинного ураження до хронічної фізіологічної відповіді.

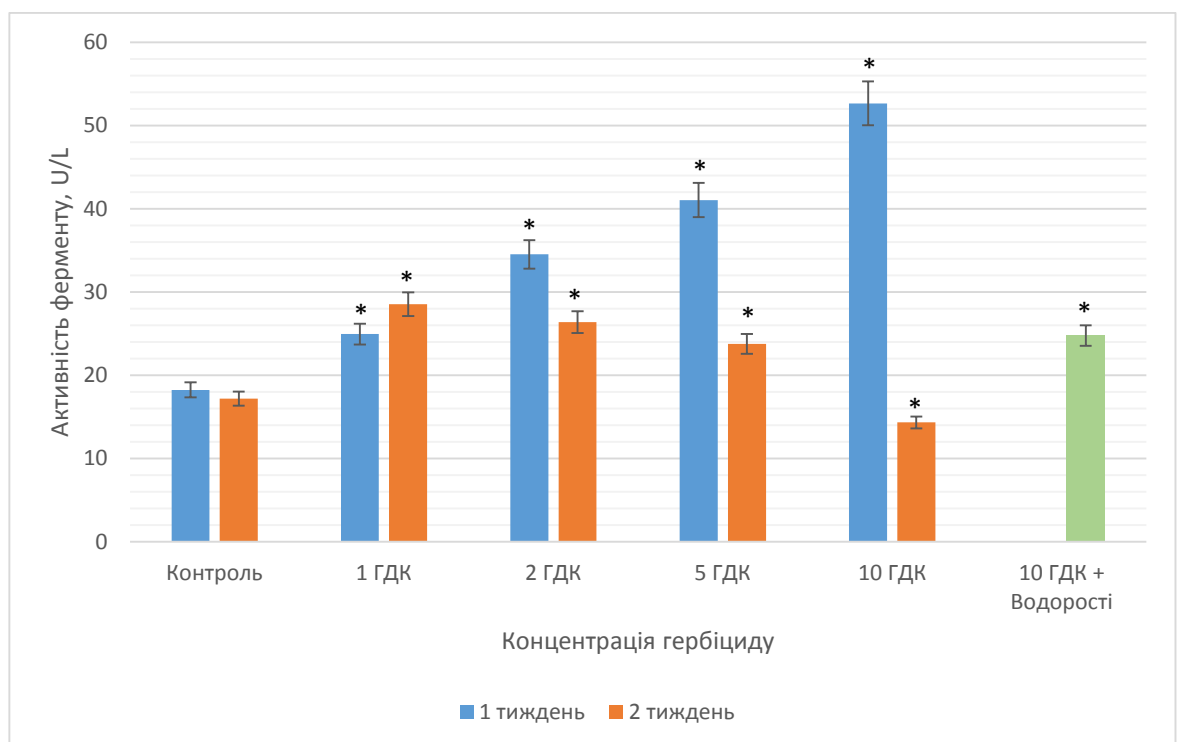


Рис. 3.2.3 Активність АСТ в сироватці крові у *Carassius gibelio* за дії різних концентрацій Євролайтингу протягом двох тижнів.

Примітка: * – різниця показника є статистично значущою порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

На першому тижні дослідження, дія гербіциду спричинила підвищення АСТ у всіх експериментальних групах, що є прямим наслідком порушення цілісності мембран гепатоцитів. У групах 1 ГДК активність підвищилась приблизно на 36.8%, а у 2 ГДК активність зросла майже у 1.89 рази, зростання

активності ферменту в цих групах було на рівні початкової фізіологічної компенсації. Проте, при зростанні дози токсичний вплив ставав критичним: у групі 5 ГДК активність зросла у 2.25 рази, а у 10 ГДК фіксувалося максимальне зростання яке перевищило контроль у 2.89 рази, підтверджуючи гостру цитотоксичність високих доз. Подібне різке підвищення активності трансаміназ, зокрема АСТ, як індикатора гострої гепатотоксичності під впливом пестицидів, добре узгоджується з даними оглядової роботи Гіріджеш Шукли [54], де підкреслюється, що АСТ і АЛТ є найбільш чутливими біохімічними маркерами ушкодження печінки у риб при токсичній дії пестицидів.

На другому тижні динаміка АСТ змінилася, демонструючи адаптацію у групах із низькою та середньою токсичністю: показники 1 ГДК та 2 ГДК повернулися до діапазону норми (були вищими за контроль 2-го тижня відповідно у 1.66 рази та у 1.53 рази), що свідчить про успішну компенсацію організму та відновлення клітинних мембран. Однак, у групі 10 ГДК зафіксовано значне зниження активності АСТ до ± 14.323 U/L. Це патологічне явище, оскільки показник став нижчим приблизно на 16.7% порівняно з контролем 2-го тижня і впав близько на 72.8% порівняно з піком 1-го тижня. Це вказує на хронічне виснаження синтетичної функції печінки, а не на її відновлення. Значне зниження активності АСТ у риб, спостережене в дослідженні El- Vouhy та співавторів [55], свідчить про пригнічення синтетичної та метаболічної функції печінки, що відображає хронічну дисфункцію гепатоцитів під дією токсичного стресу.

Ключовим результатом, що підтверджує ефективність біодобавки, є порівняння групи 10 ГДК + Водорості з групою, що отримувала лише максимальну концентрацію гербіциду. Активність АСТ у групі з водоростями була вищою у 1.73 рази порівняно з групою 10 ГДК другого тижня. Цей ефект пояснюється високим вмістом у мікрowodоростях антиоксидантів, каротиноїдів та полісахаридів, які нейтралізують вільні радикали, спричинені Євролайтингом, тим самим стабілізуючи клітинні мембрани та запобігаючи

руйнуванню гепатоцитів. Аналогічний цитопротекторний механізм підтвердили Хамед та ін., які продемонстрували, що дієтична добавка *Chlorella* сприяє відновленню біохімічних показників у риб, які зазнали хронічного пестицидного стресу. Автори дослідили *Chlorella* (серед інших мікроводоростей), як добавку для *Clarias gariepinus*, які зазнали токсичного впливу (пірогаллол). [53]

γ -глутамілтрансфераза (ГГТ, КФ 2.3.2.2) — це мембрано-зв'язаний фермент, розташований переважно на апікальних мембранах епітеліальних клітин жовчних проток. Його підвищення свідчить про мембранне ураження або індукцію синтезу внаслідок токсичного стресу.

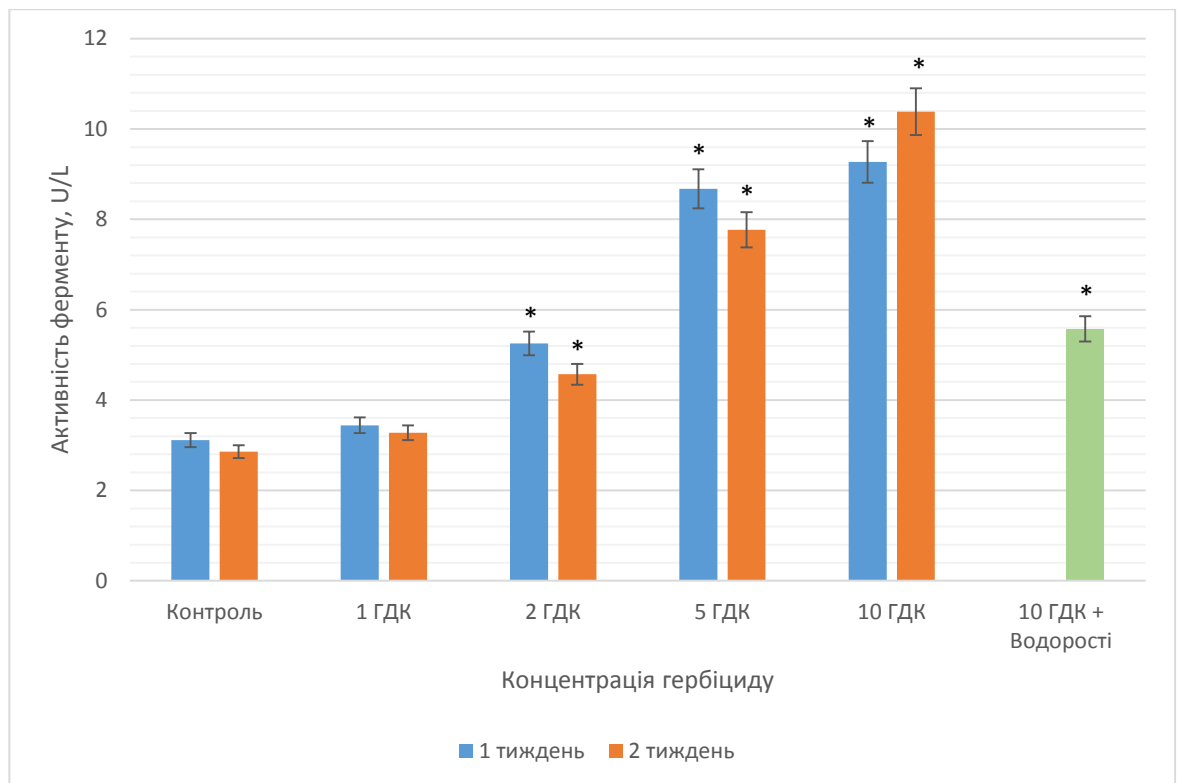


Рис. 3.2.4 Активність ГГТ в сироватці крові у *Carassius gibelio* при 14-денній експозиції у воді з різними концентраціями Євролайтингу

Примітка: * – різниця показника є статистично значущою порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

На першому тижні експозиції зафіксовано чітке дозозалежне зростання активності ГГТ, що свідчить про індукцію синтезу ферменту у відповідь на гострий токсичний вплив. Порівняно з контрольною групою, зростання було

значним: у групі 5 ГДК активність ГГТ досягла ± 8.677 U/L, що у 2.8 рази вище за контрольний показник, а у групі 10 ГДК активність зросла до ± 9.271 U/L, що у 3.0 рази, що перевищує контроль 1-го тижня. Згідно з Thakur та ін. [59], різке підвищення активності ГГТ у риб є прямим індикатором початкового ураження жовчовивідних шляхів та печінки. Підвищення ГГТ відображає ушкодження холангіоцитів та порушення жовчного відтоку, і часто спостерігається раніше, ніж зміни інших печінкових ферментів. Це дозволяє розглядати ГГТ як чутливий маркер раннього гепатобіліарного стресу під впливом токсичних факторів, таких як пестициди або важкі метали. Комбінація підвищеної ГГТ із іншими біохімічними показниками або гістологічними змінами підсилює достовірність діагностики початкового ураження печінки.

На другому тижні спостерігалася фаза прогресуючого хронічного ураження. У той час як контрольна група залишалася стабільною, у групах із високою концентрацією гербіциду активність ГГТ продовжила зростати: У групі 5 ГДК активність знизилася, хоча це значення на 10.4% нижче за показник 1-го тижня для цієї ж групи, воно все ще у 2.7 рази перевищує контроль 2-го тижня, що вказує на стійку патологію. У групі 10 ГДК зафіксовано пікове значення ± 10.383 U/L, це значення у 3.6 рази перевищує контроль 2-го тижня і на 12.0% вище за показник 1-го тижня для цієї ж групи. Це прогресуюче підвищення (що перевищує показники 1-го тижня) свідчить про хронічний токсичний вплив та постійну активацію синтезу ферменту в біліарній системі, що призводить до розвитку холестазу. На відміну від АЛТ, де може спостерігатися виснаження, зростання ГГТ на хронічній стадії вказує на тривале порушення екскреторної функції печінки, як зазначають у дослідженні Giron- Perez та ін. [60], виконаному на нільотичній тилляпії (*Oreochromis niloticus*) під впливом пестициду діазинону, виявлено значні імунотоксичні ефекти, а також зміни в печінковій функції — автори повідомляють про гістопатологічні порушення, зміни метаболізму та активацію ферментів, що свідчить про токсичне ураження печінки.

Аналіз показників активності ГГТ у групі 10 ГДК + Водорості на другому тижні є критичним для розуміння цитопротекторної дії біодобавки. Активність ГГТ у цій групі становила $\pm 5.574 \text{ U/L}$, це значення знаходилося в межах фізіологічної норми, оскільки було лише на 94.9% вище за контрольний показник 2-го тижня. Це є прямим доказом того, що водорості повністю нейтралізували хронічний токсичний вплив гербіциду, запобігши розвитку холестазу. Для порівняння: активність ГГТ у групі з водоростями була у 1.9 рази нижчою порівняно з групою 10 ГДК 2-го тижня. Цей результат підтверджує частковий, але значний цитопротекторний ефект біодобавки, яка зменшила тяжкість хронічного ураження гепатобіліарної системи. У дослідженні Tawfeek та ін. [58] показано, що мікроводорість *Chlorella vulgaris* значно пом'якшує токсичний вплив пестициду хлорпірифос на нільотичну тилапію (*Oreochromis niloticus*), відновлюючи активність печінкових ферментів, включно з ГГТ. Автори повідомляють, що застосування водорості зменшувало оксидативний стрес і підтримувало нормальну функцію жовчовивідних шляхів, що свідчить про її гепатопротекторні властивості та потенціал у біозахисті печінки від токсичних впливів.

ВИСНОВКИ

1. Встановлена чітка дозозалежна динаміка змін вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові риб за 14-денного впливу препарату «Євролайтинг». У групі з максимальною концентрацією (10 ГДК) відзначено пікове підвищення ТБК, що перевищувало контроль більш ніж утричі.

2. У перший тиждень експозиції спостерігалось інтенсивне підвищення активності антиоксидантних ферментів, причому максимальні значення були зафіксовані у групі 10 ГДК: активність СОД перевищила контроль більш ніж у 10,9 рази, а каталази – у 4,4 рази. Проте, на наступному етапі експерименту зареєстровано зниження активності каталази порівняно з контролем для всіх досліджуваних груп риб.

3. Активності ключових печінкових ферментів – АЛТ, АСТ, лужної фосфатази (ЛФ) та ГГТ продемонстрували двофазовий характер патологічного ураження печінки карасів під впливом гербіциду «Євролайтинг», що охоплює гострий цитоліз та хронічну декомпенсацію. Активність АЛТ та ГГТ підвищена протягом усього експерименту, АСТ та ЛФ – першої фази впливу.

4. Рівень ТБК-активних продуктів та активність СОД за коригувальної дії зелених мікроводоростей *Desmodesmus* у групі риб, що піддавалася впливу максимальної концентрації гербіциду «Євролайтинг» продемонстрували антиоксидантний ефект, який, проте, не призвів до відновлення контрольних значень. Застосування мікроводоростей запобігло патологічному виснаженню та прогресуючому ураженню печінки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Жиденко, А. О., Бібчук, К. (2019). Чутливість та стійкість коропових риб до дії гербіцидів. Гідробіологічний журнал. 55(5), 98–112
2. Горбатюк, Л. О. (2010). Фізіолого-біохімічна реакція риб на дію пестицидів. Гідробіологічний журнал. 46(2), 83–94
3. Цюк, О., Марченко, Д. (2020). Ефективність післясходових гербіцидів у посівах сої. *Plant & Soil Science*, 11(4).
4. Тягі, Р. (2007). Імідазолін та його похідні: огляд. *Журнал олео науки*, 56 (5), 211-222.
5. Manheimer, H.S. (1950) *U.S. Pat.* 2,528,378.
6. Ralston, A. W. (1948). Fatty acids and their derivatives. (pp. 556-561)
7. Bajpai, D., & Tyagi, V. K. (2006). Fatty imidazolines: chemistry, synthesis, properties and their industrial applications. *Journal of oleo science*, 55(7), 319-329.
8. Мартінс да Сілва, Ф., Джуніор, Дж. Дж. та Ернандес Муньос, Дж. А. (2024). Хімія альдегідів та кетонів у синтезі гетероциклів – історичні реакції з нової та екологічної точки зору. *Current Organic Chemistry*, 28 (13), 1023-1045.
9. Ramachandran, S., Jovancicevic, V. (1999). Molecular modeling of the inhibition of mild steel carbon dioxide corrosion by imidazolines. *Corrosion*, 55(3), 259-267.
10. Ramachandran, S., Tsai, B. L., Blanco, M., Chen, H., Tang, Y., & Goddard, W. A. (1996). Self-assembled monolayer mechanism for corrosion inhibition of iron by imidazolines. *Langmuir*, 12(26), 6419-6428.
11. Tewes, F., Corrigan, O. I., & Healy, A. M. (2013). Surfactants in pharmaceutical products and systems. *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology*, 4th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 3464-3476.

12. Bhati, K., Tripathy, D. B., & Gupta, A. (2020). Gemini imidazolinium surfactants: a versatile class of molecules. In *Colloids-Types, Preparation and Applications*. (pp. 1–18)
13. Фрагіордж, Е. Дж., де Резенде, А. А. А., Граф, У., та Спано, М. А. (2008). Порівняльна оцінка генотоксичності імідазолінонових гербіцидів у соматичних клітинах *Drosophila melanogaster*. *Харчова та хімічна токсикологія*, 46 (1), 393-401.
14. Fathy, M., Mohamed, I. A., Farghal, A. I., Temerak, S. A., & Sayed, A. E. D. H. (2019). Hemotoxic effects of some herbicides on juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(30), 30857-30865.
15. Massachusetts Department of Environmental Protection. (2006). Imazapyr: Review for use in lakes and ponds in Massachusetts, 70(7), 81959-8
16. Buerge, I. J., et al. (2019). Behavior of the chiral herbicide imazamox in soils: pH-dependent enantioselective degradation. *Environmental Science & Technology*, 53(2), 1234–1242.
17. Pinna, M., et al. (2022). Sorption and mobility of imazamox in soils with different cation exchange capacity. *Agriculture*, 12(11), 1862.
18. Dugdale, T. M., Butler, K. L., Finlay, M. J., Liu, Z., Rees, D. B., & Clements, D. (2020). Residues and dissipation of the herbicide imazapyr after operational use in irrigation water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2421.
19. Patten, K. (2003). Persistence and non-target impact of imazapyr associated with smooth cordgrass control in an estuary. *J. Aquat. Plant Manage.* 41:1-6.
20. Hanlon, C. G. and K. Langeland. (2000). Comparison of experimental strategies to control torpedograss. *J. Aquat. Plant Manage.* 38:40-47.
21. Weed Science Society of America. (2002). *Herbicide Handbook*, 8th Edition. W. K. Vencill (ed.). Lawrence, KS. 493 pp.

22. Shaner, D. L. and N. Mallipudi. (1991). Mechanisms of selectivity of the imidazolinones, pp. 91-102. In: D. L. Shaner and S. L. O'Conner (ed.). The Imidazolinone Herbicides. CRC Press, Boca Raton, FL, (pp. 91-102)
23. Massachusetts Department of Agricultural Resources & Massachusetts Department of Environmental Protection. (2017). Imazamox: Human health and ecological risk assessment. Massachusetts, 70(7), 81959-8
24. Maryland Department of Natural Resources. (2024, December). Environmental and social risk assessment: Imazamox. (10 pp.)
25. Причеп, М. В., Коваленко, Ю. О., Потрохов, О. С., & Худіяш, Ю. М. (2020). Вміст кортизолу та тиреоїдних гормонів у плазмі крові карася китайського *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) за умов амонійного навантаження. Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки, 14(7), 45-52
26. Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30.
27. Ділер, О., Озіл, О., Нане, І. Д., Назироглу, М., Міназ, М., Асланкоч, Р., ... та Атсатан, К. (2022). Вплив бісфенолу А на оксидативний стрес, антиоксидантний захист, гістопатологічні зміни та активність лізоциму у вузькокleshних раків (*Pontastacus leptodactylus*). Турецький журнал рибальства та водних наук, 22 (10).
28. Валаванідіс, А., Влахоянні, Т., Дассенакіс, М. та Скуллос, М. (2006). Молекулярні біомаркери оксидативного стресу у водних організмів у зв'язку з токсичними забруднювачами навколишнього середовища. *Екотоксикологія та екологічна безпека*, 64 (2), 178-189.
29. Biller, J. D., & Takahashi, L. S. (2018). Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 3403-3414.
30. Дудник С.В., Євтушенко М.Ю. (2013) Водна токсикологія: основні теоретичні положення та їхнє практичне застосування. Вид-во Українського фітосоціологічного центру. - 297с.

31. Yu, B., Wang, X., Dong, K. F., Xiao, G., & Ma, D. (2020). Heavy metal concentrations in aquatic organisms (fishes, shrimp and crabs) and health risk assessment in China. *Marine pollution bulletin*, 159, 111505.
32. A. K. Aranda-Rivera, A. Cruz-Gregorio, Y. L. Arancibia-Hernández, E. Y. Hernández-Cruz, J. Pedraza-Chaverri (2022). RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. *Oxygen*, 2 (4), 437-478.
33. Jeong, H., Byeon, E., Kim, D.H., Maszczyk, P., & Lee, J.S. (2023). Heavy metals and metalloids in aquatic invertebrates: a review of single/mixed forms, combinations with other pollutants, and environmental factors. *Marine Pollution Bulletin*, 191, 114959.
34. Malaj, E., Grote, M., Schäfer, R. B., Brack, W., & von der Ohe, P. C. (2012). Physiological sensitivity of freshwater macroinvertebrates to heavy metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), 1754-1764.
35. Hook, S. E., Gallagher, E. P., & Batley, G. E. (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated environmental assessment and management*, 10(3), 327-341.
36. Klátyik, S., Simon, G., Oláh, M., Takács, E., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Székács, A. (2024). Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to 2023. *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 22.
37. European Food Safety Authority (EFSA). (2016). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazamox. *EFSA Journal*, 14(4), 014339.
38. Ministry of Health of Ukraine. (2001). State sanitary rules for the protection of surface waters from pollution. Verkhovna Rada of Ukraine. (Order No. 13/7588)
39. Ольсен, К. Х. та Бонов, М. (2023). Карась (*Carassius carassius* (L.)), анонімна риба з чудовими здібностями. *Іхтіологічні дослідження*, 70 (3), 313-331.

40. Dahl, H. A., Johansen, A., Nilsson, G. E., & Lefevre, S. (2021). The metabolomic response of crucian carp (*Carassius carassius*) to anoxia and reoxygenation differs between tissues and hints at uncharacterized survival strategies. *Metabolites*, 11(7), 435.
41. American Veterinary Medical Association. (2013). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. Schaumburg, IL, USA, 50(3), 489
42. Ruhl, N., & McRobert, S. P. (2017). The effect of temperature on shoal size choice of the zebrafish, *Danio rerio*. *Scientific Reports*, 7, 3948
43. Svobodova, Z., Pravda, D., & Palackova, J. (1991). Unified methods of haematological examination of fish. *Research Institute of fish culture and hydrobiology*, 70(4), 457-465.
44. Янг, Т., Вокер, С.П., Альфаро, А.К., Флетчер, Л.М., Мюррей, Дж.С., Луліджва, Р., та Саймондс, Дж. (2019). Вплив гострого стресу від обробки, анестезії та евтаназії на біохімію плазми риб: значення для ветеринарного скринінгу та метаболомного відбору проб. *Фізіологія та біохімія риб*, 45 (4), 1485-1494.
45. Hadwan, M. H., & Abed, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in brief*, 6, 194-199.
46. Sun, M., & Zigman, S. (1978). An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Analytical biochemistry*, 90(1), 81-89.
47. Schumann, G., Klauke, R., Canalias, F., Bossert-Reuther, S., FH Franck, P., Gella, F., ... & Ceriotti, F. (2011). IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37° C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 49(9).
48. Aguilar Diaz De Leon, J., Borges, C. R. (2020) Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J. Vis. Exp.* (159), 61122.

49. Вівек, К., Віраіах, К., Падмаваті, П., Рао, Г.Д. та Брахмачарі, П.В. (2016). Аналіз гострої токсичності та залишків пестициду картап гідрохлориду: токсикологічні наслідки для молоді прісноводних риб *Labeo rohita*. Біокаталіз та сільськогосподарська біотехнологія , 7 , 193-201.
50. Khurpade, A., Rathor, J., Gaikwad, P., Dhurvey, V., Nagwanshi, A., & Sharma, A. (2025). Toxicological impacts of glyphosate on the liver, intestine and Kidney. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 13(3), 126–130.
51. Sayed, A. E. D. H., El-Sayed, Y. S., & Ali, H. (2017). Hepatoprotective efficacy of *Spirulina platensis* against lead-induced oxidative stress and genotoxicity in catfish; *Clarias gariepinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 344-350
52. Mostafa, A. E. (2025). Farmakolohichniy vplyv kharchovoi *Chlorella vulgaris* ta β -hliukanu na okysliuvalnyi stres, indukovanyi khlorpiryfosom (MDA, GSH, SOD), imunomoduliatsiiu (TNF- α , IL-10) ta indeksy rostu afrykanskoho soma (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 109(3), 851-862.
53. Hamed, M., Abou Khalil, N. S., Alghriany, A. A., & Sayed, A. E. D. H. (2024). The protective effects of dietary microalgae against hematological, biochemical, and histopathological alterations in pyrogallol-intoxicated *Clarias gariepinus*. *Heliyon*, 10(24).
54. Shukla, G. (2024). A review on liver enzymes as useful biomarker to evaluate the effects of pesticides on freshwater fish. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, 19(1), 171-176.
55. El-Bouhy, Z. M., Mohamed, F. A., Elashhab, M. W., & El-Houseiny, W. (2023). Toxicity bioassay and sub-lethal effects of profenofos-based insecticide on behavior, biochemical, hematological, and histopathological responses in Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Ecotoxicology*, 32(2), 196-210.
56. Blahova, J., Modra, H., Sevcikova, M., Marsalek, P., Zelnickova, L., Skoric, M., & Svobodova, Z. (2014). Evaluation of biochemical, haematological, and

- histopathological responses and recovery ability of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after acute exposure to atrazine herbicide. *BioMed Research International*, 2014(1), 980948.
57. Liu, J., Yang, G., Gao, Y., Li, X., Long, Y., Wei, S., ... & Gao, S. (2023). Transcriptome analysis reveals the mechanisms of hepatic injury caused by long-term environmental exposure to atrazine in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(13), 36545-36556.
58. Tawfeek, W. S., Kassab, A. S., Al-Sokary, E. T., Abass, M. E., & Sherif, A. H. (2024). *Chlorella vulgaris* algae ameliorates chlorpyrifos toxicity in Nile tilapia with special reference to antioxidant enzymes and *Streptococcus agalactiae* infection. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 616.
59. Thakur, S., Kumar, V., Das, R., Sharma, V., & Mehta, D. K. (2024). Biomarkers of hepatic toxicity: an overview. *Current Therapeutic Research*, 100, 100737.
60. Girón-Pérez, M. I., Santerre, A., Gonzalez-Jaime, F., Casas-Solis, J., Hernández-Coronado, M., Peregrina-Sandoval, J., ... & Zaitseva, G. (2007). Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(4), 760-769.
61. El-Sayed, Y. S., Samak, D. H., Abou-Ghanema, I. Y., & Soliman, M. K. (2015). Physiological and oxidative stress biomarkers in the freshwater monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., exposed to pendimethalin-based herbicide. *Environmental Toxicology*, 30(4), 430-438.
62. Khatib, I., Rychter, P., & Falfushynska, H. (2022). Pesticide pollution: Detrimental outcomes and possible mechanisms of fish exposure to common organophosphates and triazines. *Journal of Xenobiotics*, 12(3), 236-265.
63. Miranda, M. S., Cintra, R. G., Barros, S. B., & Mancini Filho, J. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(8), 1075-1079.

64. Coulombier, N., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2021). Antioxidant compounds from microalgae: A review. *Marine Drugs*, 19(10).
65. Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., Senapati, T., Kole, D., & Ghosh, A. R. (2016). Effects of Almix® herbicide on oxidative stress parameters in three freshwater teleostean fishes in natural condition. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, 5(209), 2167-0501.
66. Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., & Svobodova, Z. (2009). A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro Endocrinology Letters*, 30(Suppl. 1), 2–12.
67. Nakano, T., & Wiegertjes, G. (2020). Properties of carotenoids in fish fitness: A review. *Marine Drugs*, 18(11), 568.
68. Atamaniuk, T. M., Kubrak, O. I., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2013). Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D): Studies with goldfish gills. *Ecotoxicology*, 22(10), 1498- 1508.
69. Ali, M., Majid, M., Hussain, I., Kali, S., Naz, T., Niazi, M. B. K., Khan, M. R. A., & Zafar, M. I. (2020). Chlorpyrifos mediated oxidative damage and histopathological alterations in freshwater fish *Oncorhynchus mykiss* in Northern Pakistan. *Aquaculture Research*, 51(11), 4583–4594.
70. Abdel- Daim, M. M., Dawood, M. A. O., Elbadawy, M., Aleya, L., & Alkahtani, S. (2020). *Spirulina platensis* reduced oxidative damage induced by chlorpyrifos toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals*, 10(3), 473.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

1. Кожен працівник лабораторії повинен мати робоче місце. В лабораторії робочим місцем є хімічний стіл, який повинен бути покритий кахельною плиткою або кислототривким пластиком.
2. Перед початком роботи слід одягти спецодяг, який зберігається в індивідуальних шафах, окремо від верхнього одягу.
3. В спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторних приміщень (адміністративні, побутові приміщення, тощо).
4. При роботі зі скляними приладами необхідно:
 - захищати руки рушником при зборі скляних приладів або з'єднанні окремих частин їх за допомогою каучуку або гуми; при розламуванні скляних трубок притримувати лівою рукою трубку біля надпилу;
 - при закриванні колби, пробірки або іншої тонкостінної посудини пробкою, тримати посудину за верхню частину шийки ближче до місця, куди вставляється пробка, захищаючи руку рушником;
 - оплавляти і змочувати водою кінці трубок і паличок до одягання каучуку; при плавленні кінців трубок і паличок користуватися тримачами.
5. Скляні пробірки з розчином слід нагрівати поступово, безперервно обертаючи їх, час від часу струшуючи.
6. Нагріваючи посудину не можна закривати притертим корком поки вона не охолоне.
7. Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.
8. При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.
9. Великі хімічні склянки з рідиною піднімають тільки двома руками так, щоб відігнуті краї стакану спиралися на вказівні пальці.

10. Великі (більше 5 кг) сулії з рідиною необхідно переносити вдвох у спеціальних кошиках або ящиках з ручками.

11. При закупорюванні корками посудин із реактивами враховують їх властивості. Гумові корки сильно набухають під дією деяких реактивів (спирт, бензол, ацетон, ефір), а під дією галогенів (бром, йод) втрачають еластичність. Такі реактиви краще закупорювати скляними притертими корками. Луг не можна закупорювати притертою коркою, тому що карбонати, що утворюються між корком і горлом, заклинюють пробку.

12. При переливанні рідин (окрім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

13. При змішуванні (розведенні) речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

14. Нагрівання сильнодіючих отруйних речовин проводять тільки в круглодонних колбах і не на відкритому вогні.

15. При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- всю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;
- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;
- при приготуванні розчинів кислот, спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім обережно додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;
- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями. Щоб запобігти розігріванню розчину, при приготуванні розчинів лугів, посуд попередньо поміщають у водяну баню:

- розбивання великих шматків їдкою лугу на дрібні роблять користуючись захисними фартухом і рукавичками, у спеціально відведеному місці, при цьому розбиті шматки накривають бельтингом або іншим матеріалом;
- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації;
- бутлі з кислотами, лугами й іншими їдкими речовинами переносять удвох у спеціальних ящиках (кошиках) або перевозять на спеціальному візку попередньо перевіривши цілісність тари;
- при кип'ятінні кислотних і лужних розчинів не можна щільно закривати посуд пробкою до повного їх охолодження.
- при митті посуду хромовою сумішшю запобігають попаданню її на шкіру, одяг, взуття.

16. При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт і ін.) дотримуються таких вимог:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при включеній вентиляції, вимкнутих газових пальниках і нагрівальних електроприладах відкритого типу;
- нагрівання легкозаймистих речовин проводять у витяжній шафі на піщаній або водяній бані з закритим електронагрівом;
- зберігати легкозаймисті рідини необхідно у товстостінних склянках у місцях, віддалених від відкритого вогню, в ящиках викладених азбестом з надписом «Вогненебезпечні речовини».

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогненебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;
- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра;
- виливати в раковину залишки кислот, лугів, легкозаймистих та горючих речовин, викидати туди тверді речовини;

- зберігати в приміщенні лабораторії вогненебезпечні речовини масою більше 1 кг кожної і 3-4 кг загальною масою.

17. Категорично забороняється збереження в лабораторії несправних або розбитих апаратів із ртуттю, несправних газових приладів і систем.

18. З метою безпеки, забороняється працювати одному в приміщенні лабораторії, а також залишати без нагляду працюючі лабораторні пристрої, газові пальники та ввімкнуті електроприлади.

19. Приміщення лабораторії мають бути обладнані спеціальними контейнерами для збору сміття. Утилізація відходів повинна проводитися регулярно у відповідності із спеціальними вимогами.

Після закінчення роботи необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом