

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАТУСУ
ОРГАНІЗМУ РИБ ЗА ДІЇ ПОХІДНИХ ФОСФОНАТІВ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 200М групи

Говорун Валерія Олександрівна

Керівник:

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.

Чернівці – 2025

Анотація

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню впливу різних концентрацій гліфосату на біохімічні показники функціонального статусу риби (*Carassius gibelio*) та оцінці біоремедіаційного потенціалу мікроводорості *Desmodesmus armatus*. Встановлено, що вплив гліфосату в концентраціях, що перевищують гранично допустимі, призводить до дозозалежного цитолізу гепатоцитів, про що свідчить значне зростання активності трансаміназ (АЛТ, АСТ) та ГГТ у сироватці крові. Токсикант також спричиняє зниження вмісту загального білка та розвиток диспротеїнемії (зміну співвідношення білкових фракцій), що вказує на порушення синтетичної функції печінки та оксидативний стрес (зміни в активності СОД та каталази). Застосування культури *D. armatus* у присутності високої концентрації токсиканта зменшило інтенсивність гепатотоксичного впливу та сприяло частковій стабілізації білкового обміну, включаючи відновлення вмісту загального білка та нормалізацію співвідношення білкових фракцій. Отримані результати підтверджують перспективність *D. armatus* як біоремедіатора для очищення водних екосистем.

Ключові слова: гліфосат, *Carassius gibelio*, гепатотоксичність, загальний білок, білкові фракції, *Desmodesmus armatus*, біоремедіація.

Abstract

The qualification work is devoted to studying the effects of different concentrations of the glyphosate (a phosphonate derivative) on the biochemical indicators of the functional status of fish (*Carassius gibelio*) and assessing the bioremediation potential of the microalga *Desmodesmus armatus*. It was established that exposure to glyphosate at concentrations exceeding the permissible limits leads to dose-dependent cytolysis of hepatocytes, as evidenced by a significant increase in the activity of transaminases (ALT, AST) and GGT in the blood serum. The toxicant

also causes a decrease in total protein content and the development of dysproteinemia (changes in the ratio of protein fractions), indicating impaired liver synthetic function and oxidative stress (changes in SOD and catalase activity). The application of *D. armatus* culture in the presence of high concentrations of the toxicant reduced the intensity of hepatotoxic effects and contributed to partial stabilization of protein metabolism, including the restoration of total protein content and normalization of protein fraction ratios. The obtained results confirm the promise of *D. armatus* as a bioremediator for the purification of aquatic ecosystems.

Keywords: glyphosate, *Carassius gibelio*, hepatotoxicity, total protein, protein fractions, *Desmodesmus armatus*, bioremediation.

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

Говорун В. О.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Структурно-функціональні особливості фосфонатів, що визначають їх токсичні властивості.....	9
1.2. Дозозалежність та видоспецифічність токсичної дії фосфонатів на водні організми	13
1.3. Особливості біоаккумуляції, метаболізм і виведення фосфонатів з організму риби.....	17
1.4. Адаптаційні механізми водних організмів до дії токсичних речовин	23
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Матеріали дослідження	27
2.2. Методи дослідження.....	28
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Білковий склад сироватки крові карася сріблястого за дії різних концентрацій N-фосфонометилгліцину	34
3.2. Активність трансаміназ (АЛТ і АСТ) у сироватці крові карасів за дії гліфосату	41
3.3. Активність лужної фосфатази у сироватці крові карасів за дії гліфосату	44
3.4. Активність γ -глутамілтрансферази (ГГТ) у сироватці крові карасів за дії гліфосату	45
3.5. Активність супероксиддисмутази (СОД) у сироватці крові карасів за дії гліфосату	47
3.6. Активність каталази (КАТ) у сироватці крові карасів за дії гліфосату.....	49

3.7. Вплив мікрводоростей <i>Desmodesmus armatus</i> на біохімічні показники крові у карася сріблястого	51
ВИСНОВКИ.....	63
ОГЛЯД ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	64
ДОДАТКИ.....	75

ВСТУП

В умовах інтенсивного розвитку сільського господарства та промисловості антропогенний тиск на водні екосистеми невпинно зростає. Одним із найпоширеніших джерел забруднення поверхневих водойм є пестициди, зокрема гербіциди на основі похідних фосфонатів. Внаслідок високої водорозчинності ці речовини легко мігрують у природні водні об'єкти, де здатні накопичуватись та здійснювати токсичну дію на гідробіонтів [1; 2].

Похідні фосфонатів, до яких належить гліфосат, широко застосовуються як активні компоненти системних гербіцидів, що діють на широкий спектр бур'янів. Проте, попри ефективність у сільському господарстві, ці речовини мають негативний вплив на біохімічні процеси в організмі гідробіонтів, зокрема риб. Наявні дослідження свідчать про те, що дія фосфорорганічних сполук може супроводжуватися змінами метаболічного статусу, порушенням роботи антиоксидантної системи, а також розвитком окислювального стресу [3]. У природних умовах концентрації гліфосату зазвичай не перевищують гранично допустимих значень, однак у періоди підвищеного антропогенного навантаження або аварійних ситуацій можливі різкі локальні збільшення його вмісту. В Україні додатковим чинником ризику є бойові дії, що супроводжуються руйнуванням ґрунтового покриву, вибухами боєприпасів, пожежами та механічними ушкодженнями агроландшафтів. У результаті підвищуються масштаби ерозії ґрунтів, порушуються системи фільтрації та утримання забруднювачів, а це сприяє потраплянню у водойми більших, ніж зазвичай, кількостей агрохімікатів, у тому числі гліфосату. Така ситуація зумовлює необхідність всебічного вивчення токсичності гербіциду для водних організмів у ширшому діапазоні концентрацій — від рівнів, близьких до гранично допустимих, до потенційно аварійних.

Риби є чутливими індикаторами стану водних екосистем, а їх біохімічні показники відображають ранні прояви токсичного стресу. Зміни активності

ферментів, показників перекисного окиснення ліпідів, функціонування печінки та антиоксидантної системи дають можливість кількісно оцінити токсичний вплив гліфосату та визначити межі його безпечного надходження у водні екосистеми [4; 5].

Незважаючи на велику кількість досліджень щодо впливу пестицидів на водні організми, специфіка дії саме похідних фосфонатів, їх біоаккумуляційна здатність та тривалі біохімічні наслідки для риб залишаються недостатньо вивченими. Тому актуальним є комплексне дослідження змін біохімічного профілю риб за дії різних концентрацій похідних фосфонатів у контрольованих лабораторних умовах [6; 7].

Одним із перспективних шляхів зниження вмісту гербіцидів у воді є біоремедіація із застосуванням мікроводоростей. Зелені мікроводорості роду *Desmodesmus* відомі високою стійкістю до забруднювачів, швидкими темпами росту та здатністю до біосорбції і біодеградації низки ксенобіотиків. Їх використання у водних біотехнологіях розглядається як екологічно безпечний, маловитратний та ефективний метод очищення води від агрохімікатів. Оцінка ефективності *Desmodesmus* як біоремедіаційного агента щодо гліфосату є актуальною науковою задачею, особливо в умовах сучасних екологічних викликів.

Метою роботи була оцінка впливу різних концентрацій гліфосату на біохімічні показники крові риб за умов біоремедіаційної дії *Desmodesmus armatus*.

Задля досягнення мети було поставлено такі **завдання**:

- Встановити зміни вмісту загального білка та білкових фракцій у сироватці крові риб під впливом різних концентрацій гліфосату.
- Визначити активність амінотрансфераз, лужної фосфатази та ГГТ у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату

- Дослідити активності ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази) в крові риб під дією різних концентрацій гліфосату.
- Оцінити вплив *Desmodesmus armatus* як біоремедіаційного агента на зміни біохімічних показників крові карася сріблястого за умов дії гліфосату у найвищій концентрації (10 ГДК).

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структурно-функціональні особливості фосфонатів, що визначають їх токсичні властивості

У сучасних водних екосистемах широко представлена група токсикантів, які класифікуються залежно від хімічної природи та біологічної активності. До основних класів токсикантів належать: органічні (наприклад, пестициди, поліхлоровані дифеніли, поверхнево-активні речовини), неорганічні (важкі метали, мінеральні сполуки), радіоактивні елементи, а також фізичні забруднювачі — осад, тепловий стрес. Особливо небезпечними вважаються органічні сполуки, які характеризуються тривалою персистентністю, біоаккумуляцією та токсичністю [8].

Джерела потрапляння токсикантів у водні екосистеми охоплюють аграрний сектор (сільськогосподарські стоки з добривами і пестицидами), промисловість (хімічні відходи, металургія, фармацевтика), урбанізацію (міські стоки, нафтові продукти, побутові хімікати), гірничодобувну діяльність (викиди металів), а також атмосферні опади і поверхневий стік після злив. Природні джерела води, такі як ерозія ґрунтів, погіршення складу земних мінералів, також можуть вносити токсичні елементи, хоча в меншій мірі порівняно з антропогенними впливами [12].

Неорганічні токсиканти — це передусім важкі метали (ртуть, кадмій, свинець, мідь, нікель), а також амоній, нітрати, фториди та інші мінерали. Вони надходять у водойми з промислових стоків, шахт, урбаністичного стоку, атмосферних викидів і ландшафтного ерозійного процесу. Особливо небезпечні важкі метали, які мають властивість накопичуватися в організмах і подальшої біомагніфікації у харчових ланцюгах [10].

Азотні та фосфорні сполуки (нітрати, нітроти, фосфати), що, внаслідок надлишкового внесення, потрапляють у водне середовище з сільськогосподарських угідь, стоків добрив, очищення стічних вод та

призводять до евтрофікації. Евтрофікація спричиняє надмірне цвітіння водоростей, зниження концентрації кисню, що веде до створення «мертвих зон» і загибелі гідробіонтів [11].

До фізичних токсикантів належать тверді суспензії (осад, мул, пісок), які можуть закупорювати зябра риб, знижувати прозорість води, а також теплове забруднення (викид гарячої води) та радіонукліди (цезій, уран, плутоній), що надходять з промислових чи ядерних джерел. Ці фактори можуть викликати зниження концентрації розчиненого кисню у воді, термальний стрес і радіаційну токсичність [9].

Органічні токсиканти включають широкий спектр речовин: пестициди (дихлордифенілтрихлорметилметан (ДДТ), органофосфати, гліфосат), поліхлоровані біфеніли (ПХБ), поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ), фталати, пер- і поліфторалкільні речовини (ПФАР), а також фармацевтичні продукти та побутову хімію. Вони можуть проникати у водойми через сільськогосподарські стоки, промислові викиди, стоки побутових відходів.

Органічні викликають токсичні навіть впливи при низьких концентраціях і здатні тривалий час залишатись у екосистемі [9].

Фосфонати — це органофосфорні сполуки, що містять фосфонову групу ($\text{C}-\text{PO}_3 \text{H}_2$ або її похідні), яка характеризується стабільним зв'язком фосфор–карбон ($\text{P}-\text{C}$). Цей зв'язок метаболічно стійкий, що обумовлює низьку біодеградацію фосфонатів у навколишньому середовищі. Завдяки своїй високій стабільності фосфонати мають здатність до тривалого збереження у водному середовищі, де вони можуть накопичуватись у товщі води та донних відкладах. Вони активно беруть участь в іонообмінних процесах, утворюючи стійкі хелатні комплекси з іонами металів (наприклад, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}), що призводить до зниження біодоступності цих мікроелементів для водних організмів. Через цю властивість фосфонати можуть спотворювати результати

токсикологічних досліджень, знижуючи доступність життєво важливих елементів, що потенційно посилює метаболічний дисбаланс [21].

Одним з найбільш поширених представників фосфонатів є гліфосат — N- (фосфометил) гліцин. Його структура включає карбонову кислоту, аміногрупу та фосфонову групу (рис. 1). Гіперполярна природа молекули зумовлена наявністю кількох іонізованих функціональних груп, що дає можливість формувати цвіттеріони — внутрішньомолекулярно заряджені форми, які покращують розчинність у воді. Завдяки цим структурним особливостям гліфосат легко мігрує у водні системи, має високу водорозчинність і відсутність леткості, що впливає на його транспортування в організмах [22].

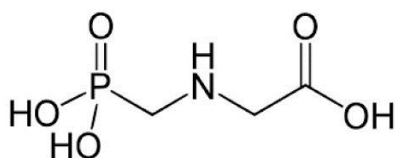


Рис. 1 Структурна формула гліфосату [22]

Гліфосат не має прямої метаболічної мішені у тварин, оскільки основний його токсичний механізм (інгібування 5-енолпірувілшікемат-3-фосфатсинтази, EPSPS) присутній лише у рослин і мікроорганізмів [26]. Проте в дослідженнях на рибах виявлено інші токсичні ефекти: порушення функції Na^+ / K^+ - АТФази у зябрах, підвищення активності АСТ і АЛТ, зниження рівнів глутатіону, супероксиддисмутази, каталази, що свідчить про оксидативний стрес і дисфункцію мембранної системи [23]. Тобто, токсичність гліфосату проявляється не через первинну метаболічну мішень, а через вторинні структурно-функціональні ефекти, пов'язані з металоелектролітним дисбалансом і оксидативним стресом [24].

Один з важливих функціональних аспектів — здатність фосфонатів комплексувати хелатні метали та пригнічувати їх біодоступність у тканинах

риб. Це є критично важливим для функціонування антиоксидантних ферментів (наприклад, Mn-SOD або CuZn-SOD), які потребують відповідних металів для активності. У дослідженнях на молюсках показано, що дія гліфосату знижувала доступність Mn у мітохондріях, що призводило до зниження активності SOD і посилення утворення активних форм кисню [25]. Такий механізм може бути релевантним і для риб, де дефіцит Mn або Zn здатен обмежити антиоксидантний захист і зумовити оксидативні пошкодження клітинної мембрани.

Структурно-функціональні властивості фосфонатів, таких як стійкість P–C зв'язку, наявність аміногрупи і зарядів, визначають їх здатність до поглинання слизовими поверхнями і дифузії через клітинні мембрани. Дослідження показали, що гліфосат у складі комерційних форм (наприклад, Roundup з POEA) має значно більшу токсичність, ніж чистий гліфосат, через добавки, які підвищують проникність клітин та накопичення [24]. Тобто, структурні відмінності формуляції істотно впливають на токсичний профіль. Іншим прикладом є метаболіт гліфосату — АМФК (амінометилфосфонова кислота), який містить структурну фосфонатну групу, але вже без карбонової частини. У дослідженні на *Pimephales promelas* на початкових етапах онтогенезу було визначено, що хронічна токсичність цієї сполуки була низькою з великим захисним інтервалом [26]. Це підкреслює, що відсутність амінокислотної складової знижує метаболічні ефекти, що обмежують токсичність, хоча здатність хелатувати метали зберігається до певної міри.

Фосфонати характеризуються високою полярністю і гідрофільністю, що обмежує їх проникність через ліпофільні мембрани, але вони можуть накопичуватись у водному міжклітинному середовищі та абсорбуватись слизовою клітинною поверхнею, наприклад зябрами риб. Це обмежує швидкість системного розподілу, але створює високі локальні концентрації у тканинах, що є додатковим ризиком при хронічному впливі [28].

Отже, структурно-функціональні характеристики фосфонатів — стабільний фосфатний зв'язок, іонізовані групи, здатність до утворення хелатних комплексів, висока полярність і гідрофільність — визначають їх токсичність через механізми комплексування металів, порушення мінерального гомеостазу, дисфункції антиоксидантного захисту, латентні метаболічні ефекти та накопичення на слизових поверхнях водних організмів.

Похідні фосфонатів, зокрема етидренова кислота (ОЕДФ), етилендіамінтетра (метиленфосфонова кислота) (ЕДТМФ), діетилентріамінпента (метиленфосфонова кислота) (ДТПМФ), широко використовуються у водоочисних технологіях, промисловості та побутовій хімії завдяки їхній здатності зв'язувати іони металів та запобігати утворенню відкладень. Попри це, екотоксикологічні властивості цих речовин залишаються недостатньо вивченими, зокрема щодо їх впливу на водні організми. Водночас наявні дослідження вказують на відмінності у гострій токсичності між різними представниками цієї групи хімічних сполук [15].

Серед промислових фосфонатів — ОЕДФК, ЕДТМФ, ДТПМФ — містять кілька фосфонатних груп, що визначає сильну металхелатуючу здатність. Вони використовуються як антикорозійні агенти й стабілізатори, але їх екотоксичність для водних організмів є низькою (96-годинні ЛД₅₀ у діапазоні 125–2400 мг/л), ВСФ (коефіцієнт біоконцентрації, який показує здатність хімічної речовини накопичуватися в організмі водних організмів із навколишнього середовища) дуже низький, а біодеградація практично відсутня [27].

1.2. Дозозалежність та видоспецифічність токсичної дії фосфонатів на водні організми

Дослідження гострої токсичності для прісноводних видів риби, зокрема Сонячний окунь синьозябровий (*Lepomis macrochirus*) та форель райдужна (*Oncorhynchus mykiss*), показали, що ЛД₅₀ для ОЕДФ коливається в межах 200–868 мг/л, для ЕДТМФ – понад 164 мг/л, а для ДТІМФ – понад 180–758 мг/л залежно від експериментальних умов (табл.1). Це свідчить про те, що серед цих трьох сполук ЕДТМФ має вищу токсичність, особливо для форелі, що є чутливим тест-об'єктом у токсикології [16].

У порівнянні з іншими гідробіонтами, такими як ракоподібні (*Daphnia magna*, *Palaemonetes pugio*), фосфонати демонструють меншу токсичність: їхні ЕС₅₀ або ЛД₅₀ значно перевищують 100 мг/л, що підкреслює специфіку чутливості саме риби до цих сполук. Така відмінність у токсичності між видами свідчить про необхідність специфічного підходу до оцінки ризику для риби та інших тварин водного середовища [16].

Механізми токсичної дії фосфонатів ще остаточно не з'ясовані. Основна гіпотеза полягає в тому, що ці сполуки, діючи як хелатуючі агенти, можуть зв'язувати біоактивні іони металів, зокрема кальцію, заліза та цинку, що призводить до порушень метаболічних процесів, включаючи ферментативну активність. Крім того, існують свідчення про фотохімічну нестабільність деяких фосфонатів, що може змінювати їхню токсичність у природних умовах [16].

Окремо слід розглянути гліфосат, який хоч і не є класичним технічним фосфонатом, але структурно містить фосфонатну групу. Він є діючою речовиною у багатьох гербіцидних препаратах, зокрема Roundup. Дані щодо токсичності гліфосату свідчать про вищу токсичність комерційних формуляцій, ніж технічної сполуки, що зумовлено присутністю поверхнево-активних речовин [6].

У дослідах на африканському сомі (*Clarias gariepinus*) ЛД₅₀ для формуляцій на основі гліфосату становить лише 2,09 мг/л (96 годин), що

значно нижче за значення для ОЕДФ, ЕДТМФ або ДТПМФ (таб.1). Це свідчить про те, що формуляції гліфосату значно токсичніші порівняно з іншими похідними фосфонатів, і можуть спричиняти не лише гостру, а й хронічну токсичну дію навіть при низьких концентраціях [17].

Таблиця 1.

Значення ЛД₅₀ за дії різних похідних фосфонатів [16].

Сполука	ЛД ₅₀ у риб (мг/л)
ЕДТМФ	≈ 164
ОЕДФ	≈ 200–868
ДТПМФ	>180–758
Гліфосат	≈ 2–5

У межах екологічно релевантних концентрацій (0,1–5 мг/л) гліфосат викликає широкий спектр сублетальних ефектів: зниження росту, інгібування ферментів антиоксидантного захисту, порушення фуражної поведінки та підвищення рівня маркерів окисдатовного стресу у риб [17]. Для технічних фосфонатів подібні біохімічні ефекти на риб при таких концентраціях практично не вивчалися, що вказує на наукову прогалину та потребу в нових дослідженнях.

Вищенаведені дані дозволяють побудувати порівняльну шкалу токсичності для основних представників фосфонатів, де найбільшу токсичність демонструє ЕДТМФ, проміжну — ОЕДФ, найменшу — ДТПМФ, а формуляції гліфосату перевищують їх токсичність у десятки разів. Це підтверджує необхідність окремого регламентування використання гліфосатвмісних препаратів у прибережних зонах та поблизу водойм [16,18].

Однак сучасна наукова література досі не містить достатньої кількості досліджень, що описують сублетальні ефекти дії фосфонатів на риб при концентраціях <100 мг/л, які можуть бути екологічно релевантними для

водойм із фоновим забрудненням. Це стосується як змін у білковому обміні, так і впливу на ферментні системи, зокрема антиоксидантну систему. Саме тому подальші дослідження у цьому напрямку є важливими як для оцінки екологічного ризику, так і для розробки нормативів безпечного використання фосфорорганічних сполук [6,18].

Токсичність промислово використовуваних фосфонатів для риб зазвичай виявляється в значно вищих концентраціях, ніж для орґанофосфатів. Для сонячного окуня синьозябрового (*Lepomis macrochirus*), каналного сома (*Ictalurus punctatus*) та райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*), значення ЛД₅₀ після 96-годинної експозиції становлять сотні мг/л. Наприклад, для ОЕДФ – 868 мг/л (*Lepomis macrochirus*) і 695 мг/л (*Ictalurus punctatus*); для ЕДТМФ – > 164 мг/л і 967 мг/л відповідно; для ДТПМФ – 758 мг/л і 657 мг/л (таб. 1). Це вказує на відносно низьку гостру токсичність фосфонатів у порівнянні з іншими класами орґанічних токсикантів [16].

Порівняння ЛД₅₀ для риб з іншими гідробіонтами підтверджує, що фосфонати мають низький потенціал біоаккумуляції та слабе накопичення в тканинах, навіть при тривалих експозиціях. Зокрема, у безхребетних ЛД₅₀ набагато вище (> 100 мг/л), окрім деяких випадків у двостулкових молюсків (*Crassostrea virginica*) – до 89–201 мг/л. Така висока межа токсичності пояснюється іонізованим, полярним характером фосфонатів, які швидко виводяться й не акумулюються в організмі [16].

Разом із дозозалежністю існують і значні видоспецифічні відмінності у чутливості риб до фосфонатів. Так, райдужна форель має дещо нижчий ЛД₅₀ (≈ 180-200 мг/л для ОЕДФ, ≈ 250 мг/л для ЕДТМФ), тоді як для сонячного окуня синьозябрового токсичність перебуває в межах > 164–868 мг/л залежно від сполуки. Це свідчить про різну здатність видів до детоксикації або швидкості депурації речовин [16].

Механізми видоспецифічності можуть бути пов'язані з метаболічними особливостями риб. Зокрема, у випадку орґанофосфатів, райдужна форель піддається більш інтенсивній біоактивації до токсичних окисдованих форм орґанофосфатів порівняно з лососем срібним, що робить їх більш чутливими до токсичної дії (наприклад, хлорпірифосу). Аналогічні механізми, ймовірно, відіграють роль і в токсичності фосфонатів, хоча дані саме про них фрагментарні [19].

В цілому, аналіз даних дозволяє стверджувати, що дозозалежність токсичності фосфонатів має чіткі границі: гострі ефекти з'являються при концентраціях від сотень мг/л, тоді як сублетальні й хронічні зміни проявляються при десятках мг/л і вище. Видоспецифічність токсичності визначається індивідуальними метаболічними шляхами біотрансформації, ефективністю детоксикації й швидкістю депурації речовин [16,19].

Аналіз досліджень на двостулкових молюсках (*Mytilus galloprovincialis*) показує, що фосфонати можуть викликати окислювальні порушення, але при цьому комбінована експозиція з наночастинками ZnO іноді зменшує токсичність через антагонізм. Якщо подібні ефекти існують і у риб, вони можуть модулювати дозозалежність токсичної відповіді [20].

Таким чином, дозозалежна крива «доза-відповідь» для фосфонатів на рибах має вигляд порогової реакції: значущі ефекти спостерігаються лише в межах високих концентрацій, які супроводжуються структурними і метаболічними змінами. Видоспецифічні варіанти впливу потребують окремого дослідження метаболізму, детоксикаційних ферментів і швидкості виведення у різних видів риб.

1.3. Особливості біоаккумуляції, метаболізм і виведення фосфонатів з організму риб

Органофосфатні пестициди належать до ксенобіотиків, які чинять гостру токсичну дію на метаболічні процеси риб. Інгібування ацетилхолінестерази у мозку та зябрах призводить до накопичення ацетилхоліну, що спричиняє порушення нейротрансмісії, судоми і зміни поведінкових реакцій [13]. Одночасно спостерігається зниження концентрації глікогену і загального білка в плазмі, підвищення активності печінкових трансаміназ (АЛТ, АСТ) — ознаки гепатотоксичності [14].

Під впливом органофосфатів у риб також виникає інтенсивний оксидативний стрес. Наприклад, дихлорфос у вугра європейського (*Anguilla anguilla*) викликав зниження рівня глутатіону, пригнічення глутатіонредуктази та зростання активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіон-S-трансферази (ГСТ) як компенсаторної реакції. Ці зміни позначаються підвищенням рівня пероксидного окислення ліпідів, що свідчить про дисфункцію клітинних мембран [16].

Фосфонати, зокрема гліфосат, мають високу водорозчинність і низьку ліпофільність, що зумовлює їхнє легке проникнення в організм риб через зябра та шлунково-кишковий тракт при контакті з водою. У дослідженнях на тилapia (*Tilapia nilotica*) було доведено, що гліфосат абсорбується з водного середовища та накопичується в печінці й кишечнику навіть після короткочасного впливу (96 годин) [29]. Подібні результати отримано для *Rhamdia quelen*, де гліфосат виявлявся в тканинах печінки та м'язів, що свідчить про системне проникнення навіть при відносно короткій експозиції [30].

Метаболізм гліфосату в організмі риб супроводжується утворенням амінометилфосфонової кислоти (АМФК) — основного метаболіту гліфосату. При довготривалому впливі на тилapia (*Tilapia nilotica*) протягом 80 днів відзначено активацію шляху Nrf2 у печінці й зябрах та пригнічення активності

ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіон), що свідчить про порушення антиоксидантного балансу та накопичення АМФК [29]. У білого амура (*Ctenopharyngodon idellus*) зафіксовано порушення гомеостазу ліпідного обміну, пригнічення синтезу жовчних кислот і зміни транскрипції генів цитохромної групи, що свідчить про системний метаболічний вплив [31].

Метаболічні дослідження, зокрема у карася золотистого (*Carassius auratus*), показали глибокі зміни в енергетичному та амінокислотному обміні після експозиції гліфосату. Відзначено зростання активності АСТ, АЛТ, ЛДГ, що разом із зниженням рівнів антиоксидантних ферментів і підвищенням вмісту малонового діальдегіду (МДА) вказує на розвиток оксидативного стресу та ушкодження клітинних мембран [32].

Незважаючи на низький біоконцентраційний коефіцієнт гліфосату у риб, хронічна експозиція зумовлює поступове накопичення його метаболітів у печінці, нирках і кишечнику. Підвищений вміст АМФК у зябрах та печінці супроводжується вираженим окислювальним стресом і змінами активності ферментів детоксикації, зокрема каталази та глутатіонпероксидази [29;31].

Щодо механізмів виведення, у ссавців гліфосат виводиться в основному в незміненому вигляді через сечу та фекалії. Для риб аналогічні фармакокінетичні дані відсутні, однак підвищення активності печінкових ферментів (АЛТ, АСТ), зниження рівня білка, накопичення МДА та зміни у тканинах вказують на активну участь печінки у детоксикації та біотрансформації [29].

У зябрах риб, зокрема *Cyprinus carpio*, гліфосат викликає пригнічення активності Na^+/K^+ -АТФази, зниження рівня антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, глутатіонпероксидази), глутатіону та зростання продуктів пероксидного окислення ліпідів і білків. Це свідчить про бар'єрні ушкодження зябрового епітелію і накопичення токсиканта в цих тканинах [33].

Таким чином, гліфосат і його похідні проникають в організм риб через зябра й травний тракт, метаболізуються з утворенням АМФК, який здатен накопичуватись у внутрішніх органах, зокрема в печінці та кишечнику. Хронічна дія цих речовин супроводжується вираженими біохімічними змінами — розвитком оксидативного стресу, порушенням гомеостазу та ураженням тканин, що свідчить про небезпеку навіть низьких концентрацій фосфонатів у водному середовищі.

Експозиція риб гербіцидами на основі гліфосату призводить до накопичення цієї речовини у тканинах, зокрема у печінці, м'язах, зябрах і нирках, особливо при хронічному впливі навіть на екологічно релевантних концентраціях (тільки частково піддається метаболізму і виведенню через нирки з сечею), що призводить до довготривалого збереження в організмі [34].

Температура середовища також впливає на накопичення: проведені дослідження на струмковій форелі (*Salmo trutta f. fario*) показали, що при температурі 15 °С коефіцієнти біоконцентрації для гліфосату та АМФК були значно вищі, ніж при 7 °С, і зростали із зменшенням концентрації токсиканту у воді [35].

Хронічна сублетальна експозиція гліфосату в дозі 0,6 мг/л протягом 28 днів спричиняє статистично значущі зміни біохімічних маркерів у тилapia (*Tilapia nilotica*): підвищення рівня малонового діальдегіду (МДА), активності печінкових трансаміназ (АСТ, АЛТ), зниження активності СОД, каталази, глутатіону у плазмі та тканинах (печінка, зябра) [36].

У інших видах риб, таких як *Tilapia guineensis*, теж відзначено виражений окислювальний стрес: значне зниження рівня глутатіону і активності СОД, компенсаторне підвищення каталази у відповідь на підвищений рівень активних форм кисню, що підтверджує значущість антиоксидантної системи як механізму адаптації [37].

Гістологічні дослідження продемонстрували, що тривала дія гліфосату призводить до структурних ушкоджень у печінці, зябрах і нирках: ураження гепатоцитів (пikноз, некроз), капсул Боумена, розширення судин, набряки тканин — ефекти, які корелюють з підвищеними біохімічними маркерами оксидативного стресу [38].

Генотоксичні прояви також зафіксовано: за даними комет-тесту та мікронуклеарного аналізу було виявлено підвищений рівень ДНК-пошкоджень у клітинах риб (*Anguilla anguilla*, *Piaractus mesopotamicus*) навіть при низьких концентраціях гліфосату і АМФК [39].

Окрім оксидативного та генотоксичного впливу, гліфосат пригнічує активність ферментів детоксикації, зокрема глутатіон- S- трансферази та цитохрому P450, що знижує здатність організму виводити ксенобіотики і може спричинити накопичення токсичних метаболітів [35].

Біомагніфікація гліфосату у харчових ланцюгах також є важливим аспектом екологічного ризику: попри те, що гліфосат легко розчинний у воді, накопичення в організмах нижчих рівнів харчового ланцюга—наприклад, у молюсків—здатне спричинювати більшу концентрацію у рибах-хижаках, що споживають їх і таким чином підвищує ризику для людини як кінцевого споживача [40].

Систематичні огляди свідчать про те, що навіть екологічно реалістичні концентрації гліфосату можуть бути токсичними для водних організмів: GBH (glyphosate-based herbicides) викликають оксидативний стрес, кардіотоксичність, імунотоксичність, репродуктивні порушення і зміни гематологічних показників [41].

Органи-мішені, такі як зябра, печінка та нирки, є основними мішенями токсичної дії ксенобіотиків у риб. Зябра безпосередньо контактують з навколишнім середовищем і перші реагують на погіршення якості води, проявляючи гістоморфологічні зміни, що включають укорочення первинних

ламелей, ламінарний некроз, проліферацію клітин, гіперплазію епітелію та ерозію структур [46].

Печінка у риби виконує ключову роль детоксикації та метаболізму. Як показує дослідження на гупі (*Poecilia reticulata*), гострий вплив гербіциду на основі гліфосату спричинив зміни тканини: запальні, регресивні, судинні та прогресуючі порушення в печінці [47].

Нирки, що відповідають за осмотичний і іонний гомеостаз, а також за екскрецію токсичних метаболітів, за умов сублетальної експозиції органофосфатів демонструють патологічні реакції. Зокрема, у кларієвого сома (*Clarias gariepinus*) при дії фостоксину відзначена атрофія каналців, некроз тубулярного епітелію, вакуолізація та дилатація каналців [48].

У дослідженні на тиліпії (*Oreochromis niloticus*) субхронічна експозиція гліфосату викликала значне зменшення довжини первинної пластинчастої частини зябер і запалення порталльної вени печінки. Гістологічні зміни варіювалися від легких до виражених залежно від концентрації речовини [49].

Ультраструктурні дослідження (скануючої та просвічувальної електронної мікроскопії) демонструють суттєві порушення клітинної архітектури: у зябер спостерігається втрата мікроворсинок та перебудова епітелію, а в печінкових клітинах — ознаки дегенерації: зміна форми ядерного хроматину, вакуолізація, та дисфункції мітохондрій, що виразно свідчить про пошкодження клітин високим токсичним навантаженням [46].

Різні органи реагують по-різному на токсичність: зяброві тканини швидко демонструють зміни, тоді як гепато- та нефротоксичні реакції можуть проявитися пізніше або при вищих концентраціях. У дослідженнях підтвердили дозозалежність: з наростанням концентрації гліфосату тяжкість гістопатологічних змін у печінці та нирках значно зростала [46].

Хронічні та субхронічні експозиції часто включають гістоморфологічні адаптивні реакції: гіперплазія зябрового епітелію, фіброзні зміни в

міжклітинному просторі печінки, помірна дилатація ниркових каналців – ймовірно як компенсаторний механізм при тривалому малому впливі токсикантів [49].

Окрім зовнішніх тканин, спостерігаються дегенеративні процеси у структурі клітин мозку. Так, у дослідженні впливу гліфосату на кларієвого сома (*Clarias gariepinus*) виявлено ішемічні та дегенеративні зміни у тканинах мозку, пов'язані з набряком [50].

У загальному підсумку, морфофункціональні зміни органів-мішеней у риб при дії токсикантів мають комплексний характер: вони охоплюють структурні uszkodження, запальні реакції, оксидативний стрес і компенсаторні гіперпластичні процеси. Використання поєднання гістопатологічного аналізу, ультраструктурної мікроскопії й біохімічних маркерів дозволяє отримати глибоке уявлення про масштаби і механізми токсичної дії [49].

Отже, представлені дані свідчать, що біоаккумуляція гліфосату у тканинах риб призводить до довготривалих і багатомірних ефектів: акумулятивний окислювальний стрес, дисфункція детоксикаційних систем, структурні та геномні зміни, а також підвищені ризики для здоров'я популяцій риб та екосистем.

1.4. Адаптаційні механізми водних організмів до дії токсичних речовин

Клітинні та фізіолого-біохімічні реакції організму риб під впливом токсичних навантажень мають багатоаспектний характер. Однією з ключових відповідей є активація систем біотрансформації. Фаза I детоксикації, зокрема цитохром P450, здійснює введення полярних функціональних груп у молекули токсикантів, тоді як фаза II, зокрема фермент глутатіон-S-трансфераза, їх кон'югує з глутатіоном, сприяючи виведенню. Ці механізми є першими

бар'єрами захисту. При перенавантаженнях вони можуть бути недостатніми [42].

Внаслідок цих реакцій часто виникає оксидативний стрес, коли продукція активних форм кисню—супероксиду, гідроксил-радикалу та пероксиду водню—перевищує можливості антиоксидантного захисту. Наслідками є пошкодження ліпідів мембран (характеризується підвищеним рівнем МДА), окиснення білків (збільшення білкових карбонільних продуктів), пошкодження ДНК та активація апоптичних шляхів [43].

На фізіолого-біохімічному рівні у тканинах печінки, зябер та нирок риб виявляється підвищена активність ферментів СОД, каталази, глутатіонпероксидази та збільшення рівня глутатіону за умов помірного стресу, як компенсаторна реакція. Проте при сильнішому або тривалому впливі відбувається виснаження пулу глутатіону, зниження активності антиоксидантів та паралельне підвищення лактопероксидази — що вказує на втрату оксидативного гомеостазу [44].

Загалом, антиоксидантна система у риб є ключовим механізмом захисту від хронічного або гострого токсичного впливу, зокрема від гідрофільних ксенобіотиків, таких як похідні фосфонатів. До основних ферментів цієї системи належать супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза. Ці ферменти працюють у кооперації для нейтралізації активних форм кисню : СОД перетворює супероксидні радикали (O_2^-) на пероксид водню, каталаза і глутатіонпероксидаза руйнують H_2O_2 до води й кисню, глутатіонредуктаза відновлює глітатіон до активної форми глутатіону, а глутатіон-S-трансфераза каталізує кон'югацію токсичних метаболітів із глутатіону [5].

Для кожного з цих ферментів спостерігаються специфічні реакції на дозові навантаження фосфонатів: дослідження показують, що навіть низькі концентрації гліфосату або його амінометилфосфонату (АМФ) можуть

змінювати активність СОД, каталази, глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази у тканинах риб [23]. Наприклад, СОД, будучи першою лінією антиоксидантного захисту, може спочатку активуватися при незначному оксидативному стресі, але при тривалій або більш високій експозиції його активність знижується — інтерпретуючи як втрату компенсаторного потенціалу [54].

Каталаза, що містить залізо і каталізує розщеплення $H_2 O_2$, також демонструє складні зміни: при високих концентраціях гліфосату або подібних токсикантів спостерігається суттєве зниження активності після експозиції [3]. У той же час у інших дослідах спостерігається зростання активності як компенсаторна реакція на підвищення рівня $H_2 O_2$ [55].

При експозиції фосфонатів в дозах навіть 20–40 мг/л активність СОД та каталази може помітно змінюватися, іноді демонструючи початкову активацію (реакція на оксидативний стрес), а потім зниження при перенавантаженні системи. Також доведено, що накопичення фосфонатів у печінці й зябрах спричиняє зміни глутатіонпероксидазної та глутатіонової активності [18].

Також, за дослідженням *Oreochromis niloticus* після 14-денного впливу гліфосатом, спостерігалось підвищення пероксидного окислення, пошкодження ДНК, підвищення експресії генів СОД, каталази, глутатіонпероксидази і глутатіону у печінці. Це був дозозалежний ефект із порушенням гіперактивності імунних генів (як TGF- β) при концентраціях ≥ 20 мг/л [51].

У даніо-реріо (*Danio rerio*) за екологічно значущих концентрацій гліфосату (0.3–3 мкг/л) також спостерігали підвищення активності антиоксидантних ферментів каталази і СОД, одночасно зі зниженням запасів глутатіону, а також зміни поведінки, що свідчить про зв'язок АФК-індукції з нейротоксичністю і поведінковими порушеннями [52].

Глутатіонпероксидаза та глутатіон-S- трансфераза є селеновмісними і глутатіонзалежними ферментами: ГП редукує органічні пероксиди й H_2O_2 , а ГСТ каталізує детоксикацію ксенобіотиків шляхом утворення кон'югатів. Під час дії фосфонатів у риб спостерігається зниження активності ГСТ за рахунок виснаження пулу глутатіону або інгібіції ферменту [5]. ГП також показує дозозалежні тканиноспецифічні зміни: при умовах високого оксидативного навантаження активність глутатіонпероксидази спочатку зростає, але при тривалому впливі може знижуватися [23].

Глутатіонредуктаза підтримує відновлення окисненого глутатіону, тобто зберігає баланс глутатіонової системи. *In vivo* дослідження водних організмів показали, що токсиканти можуть знижувати активність глутатіонредуктази, що призводить до дисбалансу GSH/GSSG і подальшої втрати антиоксидантної спроможності [54].

У цілому, реакція антиоксидантних ферментів на фосфонати виявляється дозо-, часо- та тканиноспецифічною. Наприклад, у м'язах та печінці окремих видів риб СОД може знижуватись раніше, ніж каталаза або глутатіонпероксидаза, що сигналізує про ранню втрату клітинного захисту [54].

Важливим аспектом є одночасний аналіз змін активності антиоксидантних ферментів разом із показниками перекисного окислення ліпідів, такими як малоновий діальдегід (МДА) чи ТБК. Зростання рівня МДА при зниженні активності глутатіонпероксидази або ГСТ свідчить про виснаження антиоксидантного захисту та розвиток оксидативного стресу у риб [53].

Отже, для оцінки функціонального статусу риб під дією фосфонатів важливо аналізувати комплекс ферментів: СОД, каталазу, глутатіонпероксидазу, ГСТ, ГР — оскільки тільки така багатofакторна система дає змогу оцінити реальну біохімічну реакцію на токсичне навантаження.

Також слід враховувати співвідносний характер змін: активація одного ферменту (наприклад каталази), при пригніченні іншого (наприклад СОД), вказує на дисбаланс.

На клітинному рівні виникає також запальна реакція: активація NF-κB, синтез цитокінів TNF-α, IL-6, підвищення експресії генів апоптозу (p53, Вах, каспази-3). При інтоксикації важкими металами або фосфорорганічними токсикантами ці молекулярні шляхи часто призводять до клітинної загибелі через апоптоз або некроз, особливо при хронічному впливі [45].

Таким чином, клітинні та фізіолого-біохімічні реакції риб на токсичне навантаження є комплексною взаємодією ферментативної відповіді, оксидативного стресу, клітинної гіпоксії, запальної активації та проапоптозних шляхів. Комплексне дослідження цих параметрів дозволяє досягти ранньої діагностики сублетального ефекту і формування рекомендованого режиму екотоксикологічного моніторингу.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Дослідження впливу N-фосфометилгліцину (гліфосат) проводили в лабораторних умовах у скляних акваріумах об'ємом 30 літрів, у кожному з яких утримували по 6 особин карася сріблястого однакової маси (180 гр.). Температура води в усіх акваріумах підтримувалася на рівні 20 ± 2 °C, аерація здійснювалась постійно. Контрольні вимірювання параметрів середовища (рН, вміст розчиненого кисню, амонію, нітратів і нітритів) проводилися на початку та в кінці експерименту.

На першому етапі експерименту досліджували дію наступних концентрацій гліфосату, токсичність яких співвідносили зі значеннями гранично допустимих концентрацій у воді згідно санітарних норм ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001:

- 1 ГДК (0.02×10^{-3} г/л),
- 2 ГДК (0.04×10^{-3} г/л),
- 5 ГДК (0.1×10^{-3} г/л) та
- 10 ГДК (0.2×10^{-3} г/л) [79].

У воду контрольного акваріуму гербіцид не вносили. Експозиція тривала 14 діб. Щоденно в акваріумах проводили часткову заміну води: видаляли 15 л води і додавали таку ж кількість свіжої, у яку вносили гліфосат до досягнення потрібної концентрації. Це дозволяло підтримувати стабільний рівень гербіциду протягом експерименту.

Протягом першого тижня експерименту риб не годували, щоб уникнути впливу корму на метаболічні показники та стабілізувати стан тварин. Починаючи з другого тижня, риб годували один раз на добу стандартним комбікормом у кількості, що становила 2 % від маси тіла.

На другому етапі експерименту оцінювали біоремедіаційні можливості мікроводоростей за умов використання гліфосату. Використовували культуру

мікродоростей *Desmodesmus armatus* з колекції кафедри біохімії та біотехнології ННІБХБ.

Риб утримували у воді з гліфосатом у концентрації 0.2×10^{-3} мг/л (10 ГДК), до якої додавали культуру мікродоростей у кількості 5×10^7 клітин/л. Воду в цьому варіанті не змінювали протягом усього періоду експозиції (10 днів), риб не годували, щоб зберегти природний баланс у системі «риба – водорості».

Після закінчення експозиційного періоду риб вилучали, відбирали кров із серця та одержували сироватку для подальших біохімічних аналізів. Отримані результати використовували для оцінки загального фізіолого-біохімічного стану риб і визначення можливого коригувального ефекту мікродоростей за умов токсичного навантаження гліфосатом.

2.2. Методи дослідження

Методика забору крові та отримання сироватки

Для забору крові рибу поміщали в розчин анестетика Oriscin-0.2% до повного знерухомлення. Після цього рибу фіксували, а місце пункції серця обробляли дезінфекційним розчином.

Забір крові здійснювали методом кардіопункції, використовуючи одноразові шприци об'ємом 2 мл з тонкою голкою. Голку вводили в ділянку серця, розташовану позаду зябрової кришки, обережно набираючи кров, щоб уникнути пошкодження тканин. Після набору крові голку виймали. Усі експериментальні процедури проводили відповідно до принципів біоетики та Міжнародних рекомендацій щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами, а також згідно з вимогами Директиви 86/609/ЄЕС стосовно захисту тварин, що використовуються в наукових цілях.

Відразу ж після забору крові її переносили в епендорфи. Далі центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 об/хв. Після центрифугування обережно відбирали надосадову рідину — сироватку крові, яку надалі використовували для біохімічного аналізу [56].

Визначення супероксиддисмутазної активності у сироватці крові

Методика визначення активності супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) ґрунтується на її здатності інгібувати процес аутоокиснення адреналіну. В лужному середовищі адреналін спонтанно окислюється, утворюючи адренохром — сполуку рожевого кольору, що поглинає світло при довжині хвилі 347 нм. Активність СОД прямо пропорційна ступеню гальмування цього процесу.

Для проведення аналізу використовували таку процедуру: у кювету спектрофотометра вносили 2,7 мл 0,2 М карбонатного буфера (рН 10,2) та 0,1 мл досліджуваного зразка сироватки крові. У контрольну кювету замість сироватки додавали 0,1 мл дистильованої води. Після цього в обидві кювети вносили по 0,2 мл розчину адреналіну гідрохлориду (0,1 % розчин). Вміст кювет швидко перемішували і починали вимірювання. Вимірювання оптичної густини проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 347 нм кожні 30 секунд протягом 3 хвилин. Активність СОД розраховували за ступенем інгібування утворення адренохрому в дослідній пробі порівняно з контролем.

Активність ферменту вимірювали в умовних одиницях на міліграм білка (U/мг білків), де одна одиниця активності відповідає кількості ферменту, що викликає 50% інгібування аутоокиснення адреналіну.

Супероксиддисмутазну активність розраховували за формулою:

$$E = \frac{E_d \times V_p \times 1000}{4.5 \times V_c \times C_b}, \text{ де}$$

E_d – середнє арифметичне усіх оптичних густин за 3 хвилини;

V_p – об'єм реакційної суміші, мл;

$4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – коефіцієнт молярної абсорбції адренохрому;

V_c – об'єм сироватки крові, мл;

C_b – вміст загального білка (за методом Лоурі), мг/мл [74;73].

Визначення каталазної активності у сироватці крові

Каталаза (КФ 1.11.1.6) розкладає перекис водню (H_2O_2). Після інкубації ферменту з H_2O_2 реакцію зупиняють амоніум-молібдатом — утворюється жовтий комплекс з H_2O_2 , який вимірюють спектрофотометрично.

Каталазну активність у сироватці крові визначали колориметричним методом із використанням амоній молібдату. До 2 мл розчину пероксиду водню додавали 100 мкл сироватки крові, перемішували та інкубували 10 хв при температурі 37°C . Після інкубації реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4% розчину амоній молібдату. Для приготування холостої проби до 2 мл розчину пероксиду водню додавали 100 мкл дистильованої води, інкубували за тих самих умов (10 хв, 37°C), після чого також додавали 1 мл 4% амоній молібдату. Для контрольної проби до 2 мл розчину пероксиду водню відразу додавали 100 мкл дистильованої води та 1 мл 4% розчину амоній молібдату без інкубації. Інтенсивність жовтого забарвлення, зумовленого утворенням комплексу амоній молібдату з залишковим перексидом водню, вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм.

Активність каталази розраховували за такою формулою:

$$E = \frac{(A_x - A_d) \times V \times t \times 1000}{22.2 \times C_b}, \text{ де}$$

A_x і A_d - оптична густина холостої та дослідної проб;

V – об'єм проби, мл;

t – час інкубації, с;

$22.2 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – коефіцієнт мілімолярної екстинції пероксиду водню;

Сб – вміст загального білка (за методом Лоурі), мг/мл [74;72].

Визначення відносного вмісту білкових фракцій в сироватці крові

Визначення білкових фракцій у сироватці крові проводили за методом, суть якого полягає у здатності білкових фракцій сироватки крові утворювати суспензії різного ступеня помутніння у фосфатних буферах з поступово зменшуваною іонною силою.

Для проведення досліду в шість пробірок вносили по 1 мл відповідних фосфатних буферів (основний та буфери №1–5), після чого додавали по 0,1 мл досліджуваної сироватки крові. Проби ретельно перемішували та залишали при кімнатній температурі на 10–15 хвилин для утворення суспензії. Після цього оптичну густину кожної проби вимірювали на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 640 нм відносно дистильованої води. За отриманими результатами оцінювали інтенсивність помутніння та визначали співвідношення окремих білкових фракцій — альбумінів, α -, β - та γ -глобулінів. Найбільш розчинними є альбуміни, що випадають при вищій іонній силі, тоді як глобуліни осаджуються поступово при зменшенні концентрації фосфатів.

Розрахунок співвідношення білкових фракцій у сироватці крові проводять на основі вимірювання оптичної густини кожної проби після проведення реакції з відповідними буферами. Спочатку визначають оптичну густину альбумінової фракції (E_1), потім глобулінових фракцій: α_1 -глобулінів (E_2), α_2 -глобулінів (E_3), β_1 -глобулінів (E_4), β_2 -глобулінів (E_5) та γ -глобулінів (E_6).

Для кожної фракції розраховують відносний вміст (%) за формулою:

$$\% \text{ фракції} = \frac{E \text{ фракції}}{\text{сума всіх } E} \times 100, \text{ де}$$

E – оптична густина [78].

Визначення активності АЛТ, АСТ, ГГТ та ЛФ у сироватці крові

Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ, КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (АСТ, КФ 2.6.1.1), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ, КФ 2.3.2.2) та лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1) проводили на автоматичному біохімічному аналізаторі BioChem FC-200 (Intermedica, Україна), який працює за кінетичним методом при температурі 37 °С. Для дослідження використовували сироватку крові, яку центрифугували після відстоювання для видалення формених елементів. Перед початком роботи прилад калібрували за допомогою стандартних розчинів та перевіряли точність вимірювань за контрольними сироватками.

Активність АЛТ визначалася за реакцією перенесення аміногрупи між аланіном і α -кетоглутаратом з утворенням пірувату і глутамату. Піруват під дією лактатдегідрогенази відновлюється до лактату з одночасним окисненням NADH до NAD⁺. Зменшення оптичної густини при довжині хвилі 340 нм пропорційне активності ферменту. Аналогічно визначали АСТ, яка каталізує реакцію між аспарагіноювою кислотою і α -кетоглутаратом з утворенням оксалоацетату і глутамату; оксалоацетат у присутності малатдегідрогенази відновлюється до малату, при цьому NADH переходить у NAD⁺. Зниження оптичної густини при 340 нм фіксувалося фотометрично, і отримані результати виражали у міжнародних одиницях активності (U/L).

Активність ГГТ визначали за кінетичним колориметричним методом, що ґрунтується на здатності ферменту переносити γ -глутамілову групу з γ -глутаміл-*n*-нітроаніліду на акцептор. Утворений *n*-нітроаніл має характерне

зabarвлення, інтенсивність якого вимірювали при довжині хвилі 405 нм. Зростання оптичної густини пропорційне активності ГГТ.

Визначення активності лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1) проводили колориметричним методом, заснованим на гідролізі р-нітрофенілфосфату під дією ферменту з утворенням р-нітрофенолу. Реакцію проводили у лужному середовищі, що забезпечує оптимальні умови для активності ЛФ. Утворений р-нітрофенол має характерний жовтий колір, інтенсивність якого вимірювали при довжині хвилі 405 нм. Збільшення оптичної густини прямо пропорційне ферментативній активності, а результати виражали у міжнародних одиницях на літр (U/L).

Вимірювання для всіх ферментів здійснювали автоматично: прилад змішував пробу з відповідним реагентом, інкубував реакційну суміш при 37 °С та проводив фотометричне зчитування за заданою довжиною хвилі. Отримані результати автоматично розраховувалися програмним забезпеченням аналізатора та виводилися у цифровому форматі [76, 77].

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів виконували із застосуванням критичного рівня значущості $p \leq 0,05$ у програмі Microsoft Excel. У випадках виявлення статистично значущих відмінностей використовували t-критерій Стюдента.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Білковий склад сироватки крові карася сріблястого за дії різних концентрацій N-фосфонометилгліцину

Білковий склад сироватки крові є одним з найчутливіших показників метаболічного стану організму, оскільки він відображає рівень білково-синтетичної функції печінки, інтенсивність обмінних процесів та реакцію імунної системи на дію токсичних речовин. У результаті експерименту, під час якого карасів утримували у воді з різними концентраціями гліфосату, виявлено зміни як у вмісті загального білка, так і у співвідношенні білкових фракцій.

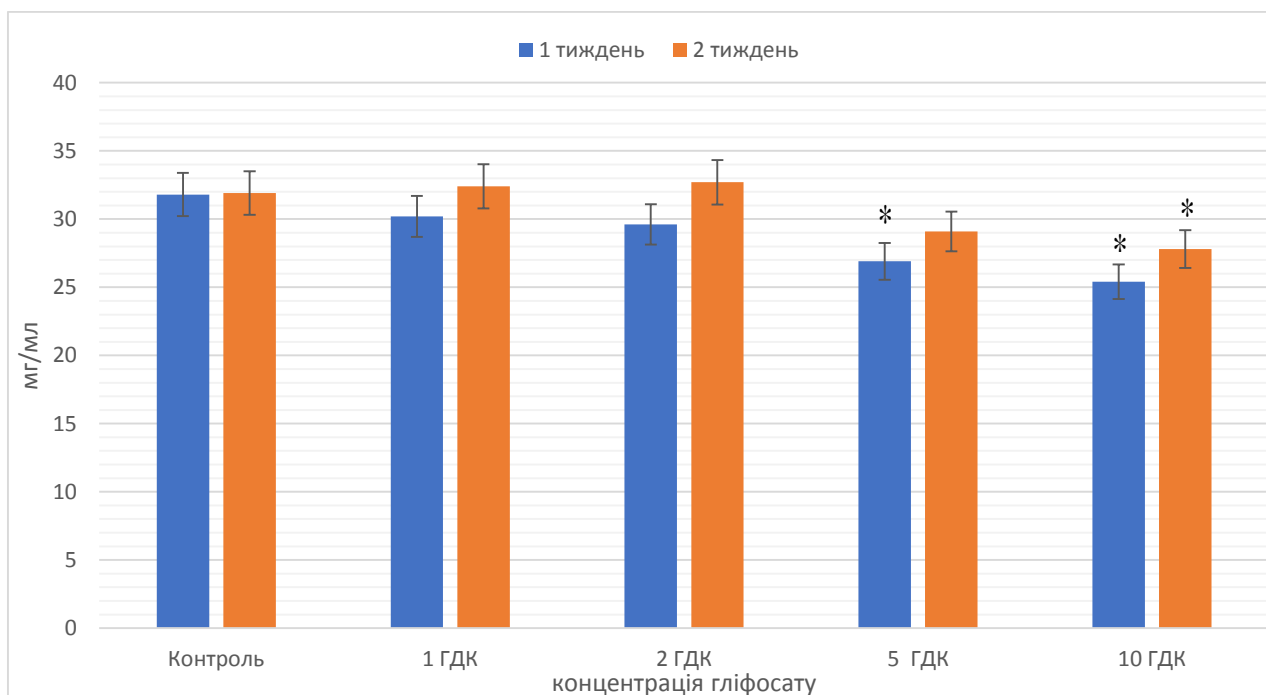


Рис. 3.1 Вміст загального білка у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Примітка (тут і надалі): * - достовірна різниця показника у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

Аналіз вмісту загального білка у сироватці крові карасів підтвердив чіткий дозозалежний негативний вплив гліфосату, який критично посилюється зміною режиму харчування. На першому тижні, в умовах голодування, результати продемонстрували статистично значуще падіння, причому найбільше зниження на 20% зафіксовано у групі 10 ГДК порівняно з контролем (рис. 3.1). Це вказує на синергічний токсико-метаболічний стрес, коли голодування обмежує надходження амінокислот, а гліфосат пригнічує синтетичну функцію печінки, призводячи до швидкого виснаження плазмових білків. На другому тижні, після відновлення годування, спостерігається часткова компенсаторна реакція: у групах низьких концентрацій (1 ГДК та 2 ГДК) вміст загального білка відновився до рівня контролю або незначно перевищив його. Однак, у групах високих концентрацій (5 ГДК та 10 ГДК), вміст залишився істотно зниженим (рис. 3.1), незважаючи на надходження поживних речовин. Цей факт свідчить про незворотність або критичну глибину токсичного ураження печінки, спричиненого високими дозами гліфосату, яке не може бути нівельовано відновленням харчування.

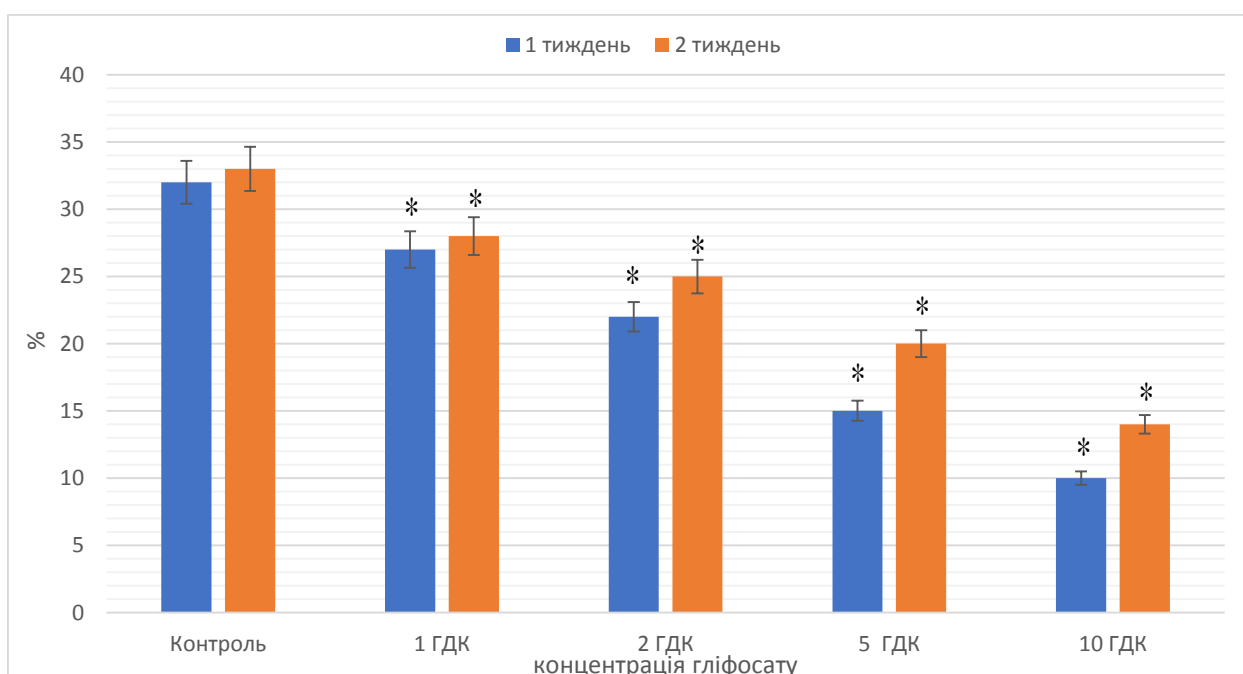


Рис. 3.2 Відносний вміст альбумінів у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Подібні результати отримали вчені, які показали, що під дією гербіцидів на основі гліфосату у коропових риб знижується вміст загального білка на 60–70% внаслідок окислювального стресу [69].

Відомо, що відсоткова частка альбумінів у сироватці крові є високочутливим та інформативним індикатором токсичного ураження печінки. На першому тижні експозиції зафіксовано різке та дозозалежне зниження частки альбумінів, що сягнуло мінімального значення у групі 10 ГДК порівняно з контролем (рис. 3.2). Це може свідчити про пригнічення синтетичної функції печінки, спричинене комбінованою дією токсиканту та дефіциту амінокислот. На другому тижні показники альбумінів у групах високих концентрацій залишаються критично зниженими.

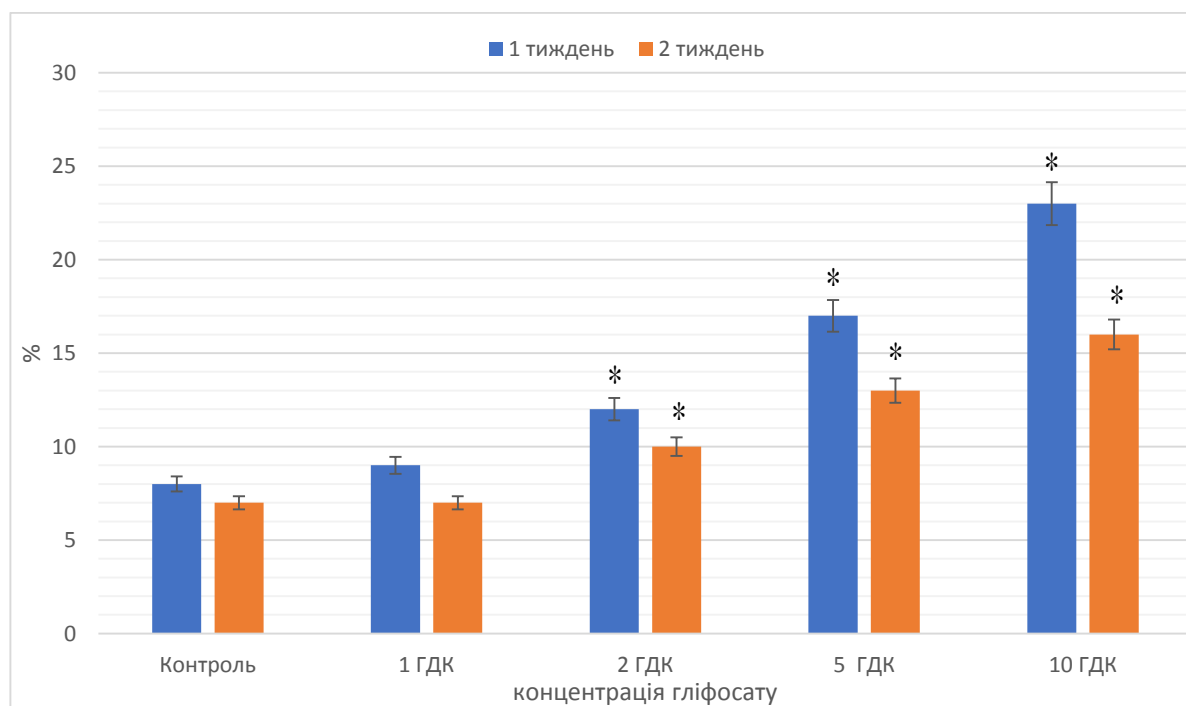


Рис. 3.3 Відносний вміст α_1 -глобулінів у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Збереження такого досить низького рівня вказує на стійке ураження гепатоцитів, яке є, імовірно, незворотним. Подібні результати наведено у

роботі Валаа С. Тауфіка, де у нільської тилляпії за дії хлорпірифосу рівень альбуміну значно знижувався після шести тижнів експозиції [68].

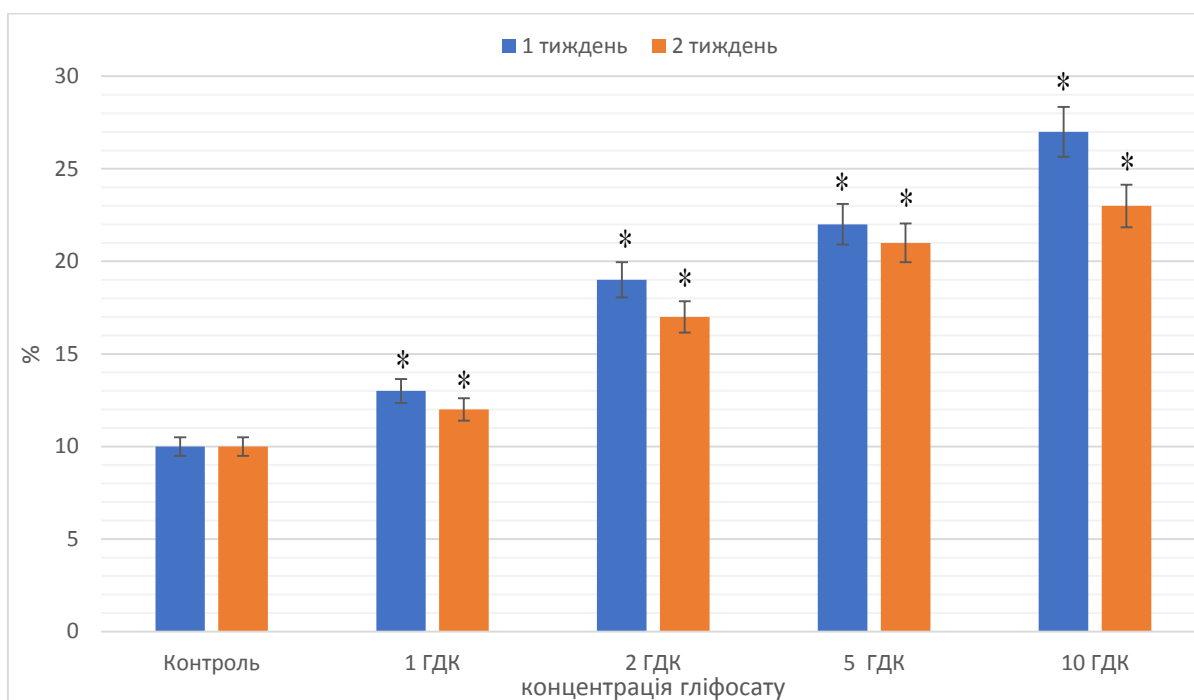


Рис. 3.4 Відносний вміст α_2 -глобулінів у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Чутливим індикатором розвитку гострої фази відповіді та запального процесу є кількісний вміст білків фракції α_1 - та α_2 -глобулінів. На першому тижні експозиції нами зафіксовано дозозалежне зростання кількості α -глобулінів майже у 3 рази (рис. 3.3; 3.4).

Таке значне підвищення вказує на високий пріоритет синтезу білків гострої фази, необхідних для нейтралізації токсиканту та ініціації захисних реакцій. На другому тижні високий рівень α -глобулінів зберігається (рис. 3.3; 3.4). Це свідчить про те, що посилений синтез α -глобулінів є ключовим компенсаторним механізмом організму, який використовує ресурси, отримані з кормом, для підтримки стійкої, хронічної імунної відповіді та детоксикації, навіть на тлі значного ураження печінки. Зростання α -глобулінів є прямою біохімічною ознакою токсикозу та запалення. За даними дослідження, у білого

амура за умов зміни солоності води спостерігали аналогічне зростання α -глобулінів, що відображає активацію неспецифічних захисних механізмів [71].

Показник вмісту β -глобулінів у сироватці крові карасів під впливом гліфосату статистично достовірно не змінювався протягом експозиції, залишаючись у межах 18–22 % (рис. 3.5).

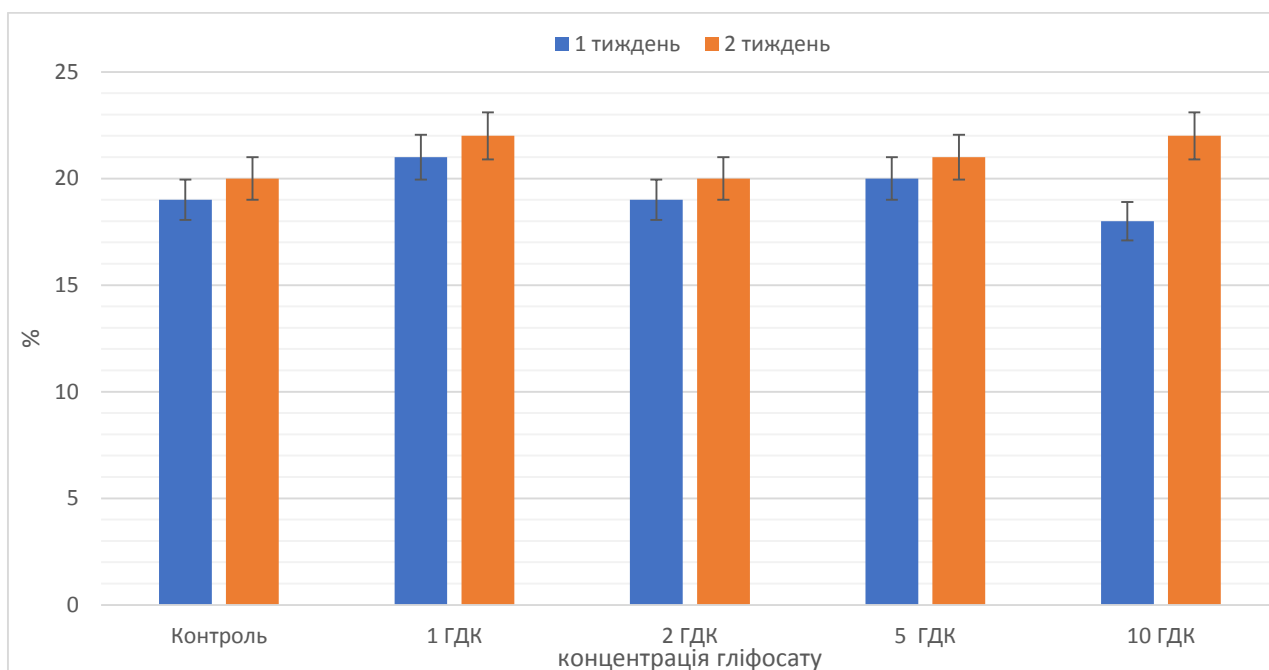


Рис. 3.5 Відносний вміст β -глобулінів у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Така стабільність може бути зумовлена тим, що білки цієї фракції (трансферини, комплементні білки, частково ліпопротеїни) менш чутливі до короткочасних токсичних впливів і компенсаторно підтримують транспортну та захисну функції крові при порушенні інших білкових фракцій.

Зменшення альбумінів і γ -глобулінів одночасно з підвищенням α -глобулінів свідчить про активацію білків гострої фази та перерозподіл білкового пулу в напрямку неспецифічного імунного захисту, тоді як β -глобуліни залишаються відносно стабільними, забезпечуючи сталість метаболічних процесів у крові. Подібну тенденцію відзначають Вєас та

співавтори, які пояснюють, що під час гострофазної відповіді β -глобуліни, зокрема білки комплементу та трансферини, можуть залишатися відносно стабільними, оскільки їх синтез регулюється повільніше, ніж у білків α -фракції, що узгоджується з отриманими нами результатами [70].

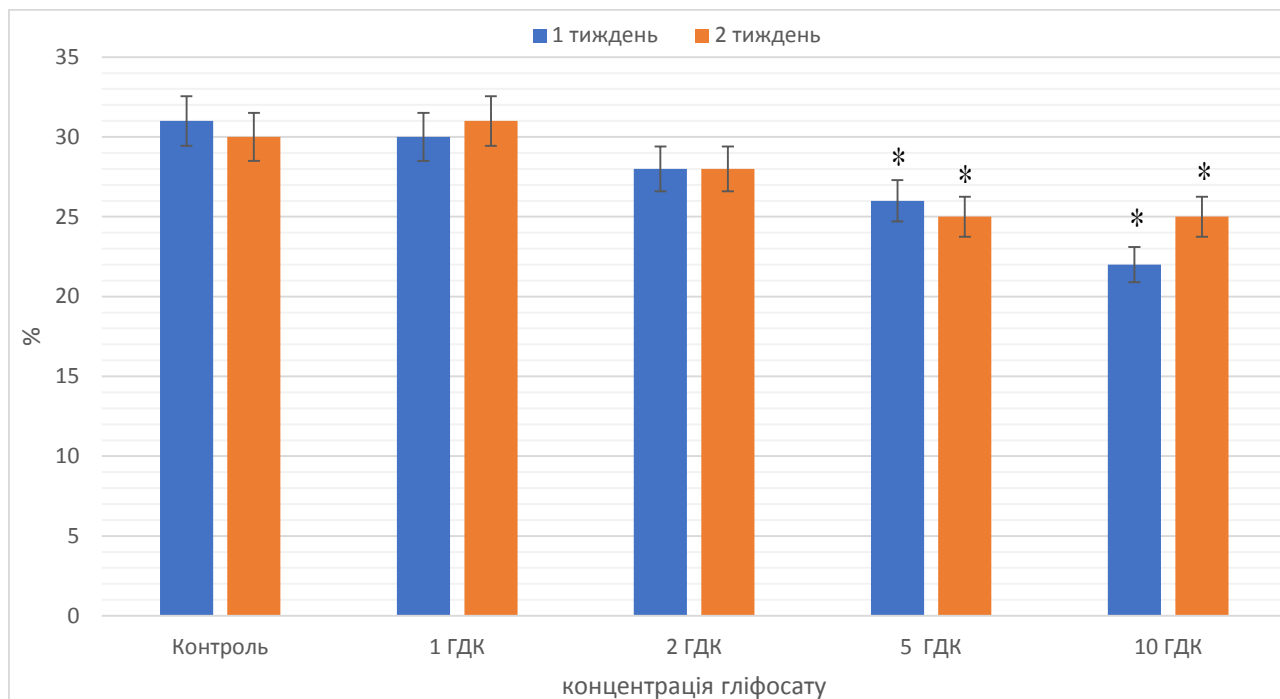


Рис. 3.6 Відносний вміст γ -глобулінів у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Встановлено, що відсоткова частка γ -глобулінів, які є маркером гуморального імунітету, продемонструвала дозозалежне та стійке зниження під впливом гліфосату, що свідчить про імуносупресію. На першому тижні експозиції зафіксовано зниження показника у 1,4 рази в групі 10 ГДК (рис. 3.6). Таке зниження є нетиповою реакцією на стрес і вказує на можливе пригнічення синтезу імуноглобулінів, спричинене синергічною дією токсиканту та дефіциту поживних речовин. На другому тижні показники γ -глобулінів залишаються зниженими (рис. 3.6).

Збереження імуносупресії, навіть при надходженні поживних речовин, вказує на стійкий, хронічний токсичний вплив гліфосату на лімфоїдні органи та органи синтезу білка. Це критичне зниження γ -глобулінів відбувається на

тлі значного зростання α -глобулінів (як було встановлено раніше), що підтверджує порушення імунного профілю карасів: активація неспецифічної ланки захисту (білки гострої фази) відбувається за рахунок пригнічення специфічного гуморального імунітету. Отримані результати узгоджуються з даними Тао Джена та співавторів, які також встановили, що тривалий вплив гліфосату спричинює імуносупресію у риб, проявляючись зниженням рівня глобулінів та пригніченням гуморальної ланки імунітету [29].

3.2 Активність трансаміназ (АЛТ і АСТ) у сироватці крові карасів за дії гліфосату

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) і аспартатамінотрансфераза (АСТ) є ключовими біохімічними маркерами функціонального стану печінки та загального метаболічного стресу в організмі. Підвищення їх активності в плазмі/сироватці зазвичай інтерпретується як ознака порушення цілісності гепатоцитів або підвищеної мембранної проникності, що приводить до вивільнення внутрішньоклітинних ферментів у кровообіг. В умовах нашого дослідження, де карасів піддавали впливу різних концентрацій гліфосату, спостережувані зміни активності трансаміназ мають подвійну інтерпретацію: із одного боку — прямий токсичний вплив на печінкові клітини, із іншого — вторинні зміни, пов'язані з оксидативним стресом та порушенням енергетичного обміну.

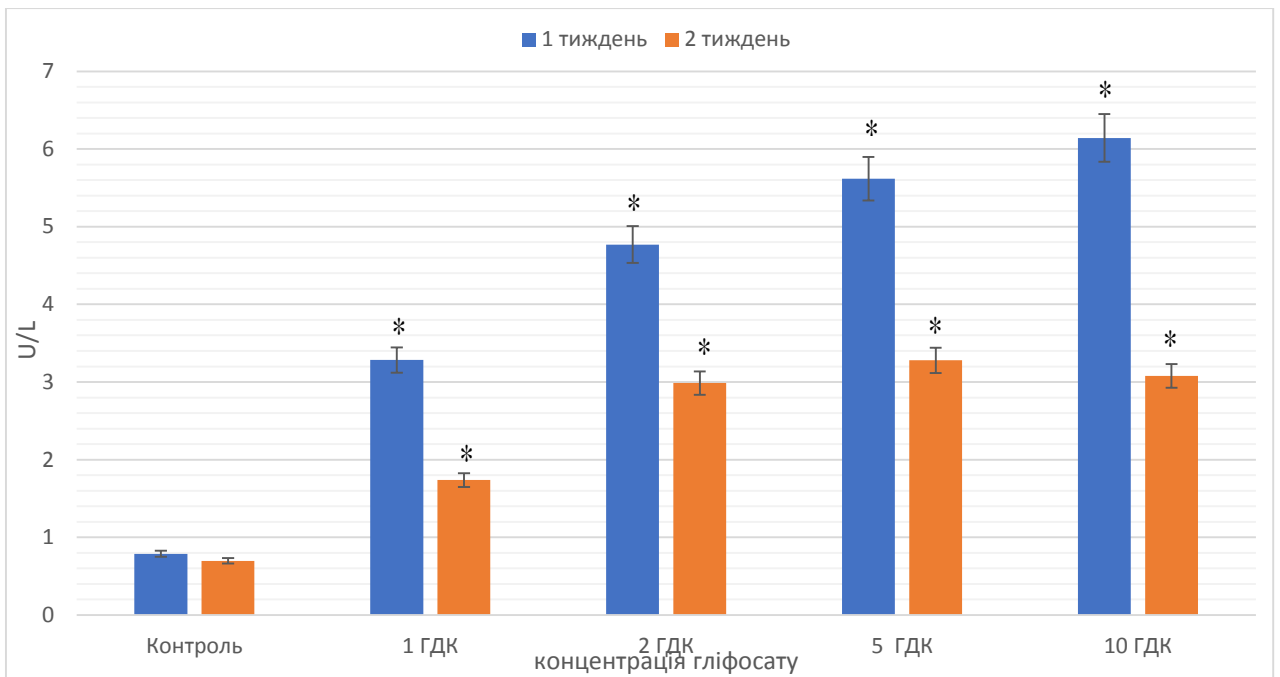


Рис. 3.7 Аланінамінотрансферазна активність сироватки крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

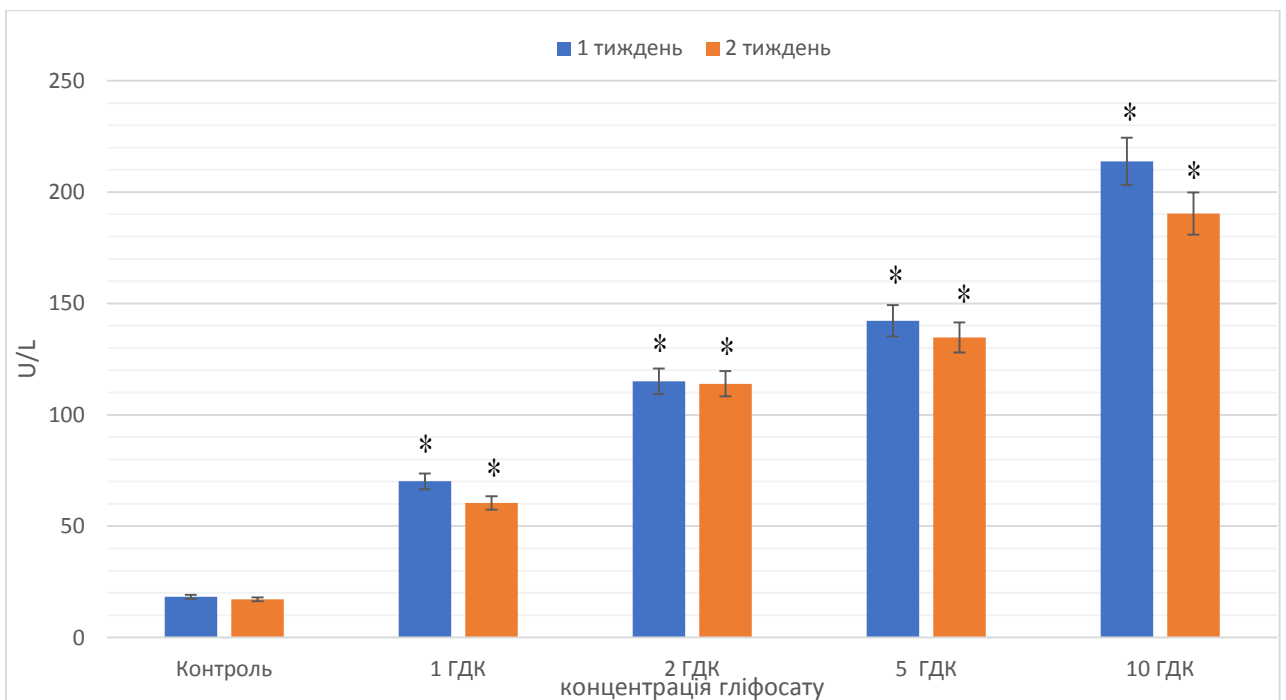


Рис. 3.8 Аспартатамінотрансферазна активність сироватки крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

У результатах дослідження чітко прослідковується залежність підвищення активності АЛТ та АСТ від концентрації гліфосату й тривалості

експозиції. Зростання активності трансаміназ у групах, особливо при вищих концентраціях (5–10 ГДК), свідчить про розвиток цитолітичного ураження печінки (рис. 3.7; 3.8). Такі зміни узгоджуються з даними ряду досліджень, які демонстрували статистично значиме підвищення рівнів АЛТ і АСТ у різних видів риби після гострої і хронічної експозиції гліфосатвмісних препаратів. Зокрема, експериментальні роботи повідомляють про помітний ріст активності трансаміназ у Nile tilapia та інших видів риби після 2–4-тижневої експозиції гліфосату, що інтерпретували як маркер гепатотоксичності [36].

Підвищення АЛТ і АСТ за дії гліфосату пов'язують із декількома біологічними процесами. По-перше, гліфосат індукує оксидативний стрес — накопичення вільних радикалів і підвищення ліпопероксидації мембран, що призводить до ушкодження фосфоліпідного матриксу мембран гепатоцитів і, відповідно, до їхньої проліферації та лізису з викидом внутрішньоклітинних ферментів у кров. По-друге, гліфосат і допоміжні компоненти формуляцій можуть безпосередньо порушувати метаболічні шляхи печінки, наприклад, енергетичні процеси і обмін амінокислот, що також сприяє підвищенню трансаміназ.

Важливо відзначити диференційну чутливість АЛТ та АСТ. У багатьох публікаціях показано, що АСТ демонструє більш виражені зміни при гострому пошкодженні тканин, оскільки цей фермент локалізований як у печінці, так і в інших органах (серце, міометрій, м'язи), тоді як АЛТ більш специфічна для печінки у багатьох видів риби. Тому спостережуване у експерименті одночасне підвищення обох ферментів при 2–10 ГДК свідчить про системний вплив із домінуючим ураженням печінки.

Підвищення АСТ у великих концентраціях може також вказувати на ураження м'язових тканин і посилену мобілізацію енергетичного метаболізму (рис. 3.7; 3.8). Аналіз літератури підтверджує, що як АЛТ, так і АСТ зазнають підвищення при експозиції гліфосату у широкого спектра видів риби [60].

Голодування може посилювати ефекти гліфосату через зменшення доступності нутрієнтів і відновлювальних ресурсів (антиоксидантів), що робить гепатоцити більш вразливими до окисного пошкодження на ранніх стадіях. Відновлення годування на другому тижні може частково коригувати деякі показники, проте стабільна концентрація гліфосату створює умови постійного (хронічного) експозиційного стресу, що пояснює прогресування підвищення трансаміназ у групах з вищими концентраціями. Подібні спостереження про залежність ступеня підвищення АЛТ/АСТ від тривалості і режиму експозиції наведені в кількох роботах, де довготривала дія гліфосатвмісних препаратів призводила до більш вираженого підвищення трансаміназ, ніж короткотермінова експозиція [29].

3.3 Активність лужної фосфатази у сироватці крові карасів за дії гліфосату

Лужна фосфатаза (ЛФ, КФ 3.1.3.1) — це група ізоферментів, які каталізують гідроліз монофосфатних естерів при лужному рН. У риб ЛФ синтезується в печінці, кишечнику, кістковій тканині та інших органах. Її активність у крові відображає комплексний стан обмінних процесів: синтетичну функцію печінки, транспортні процеси в жовчних шляхах, стан мембранного метаболізму та процеси клітинної проліферації чи руйнування. ЛФ часто використовують як неспецифічний біомаркер гепатотоксичності та порушення травлення.

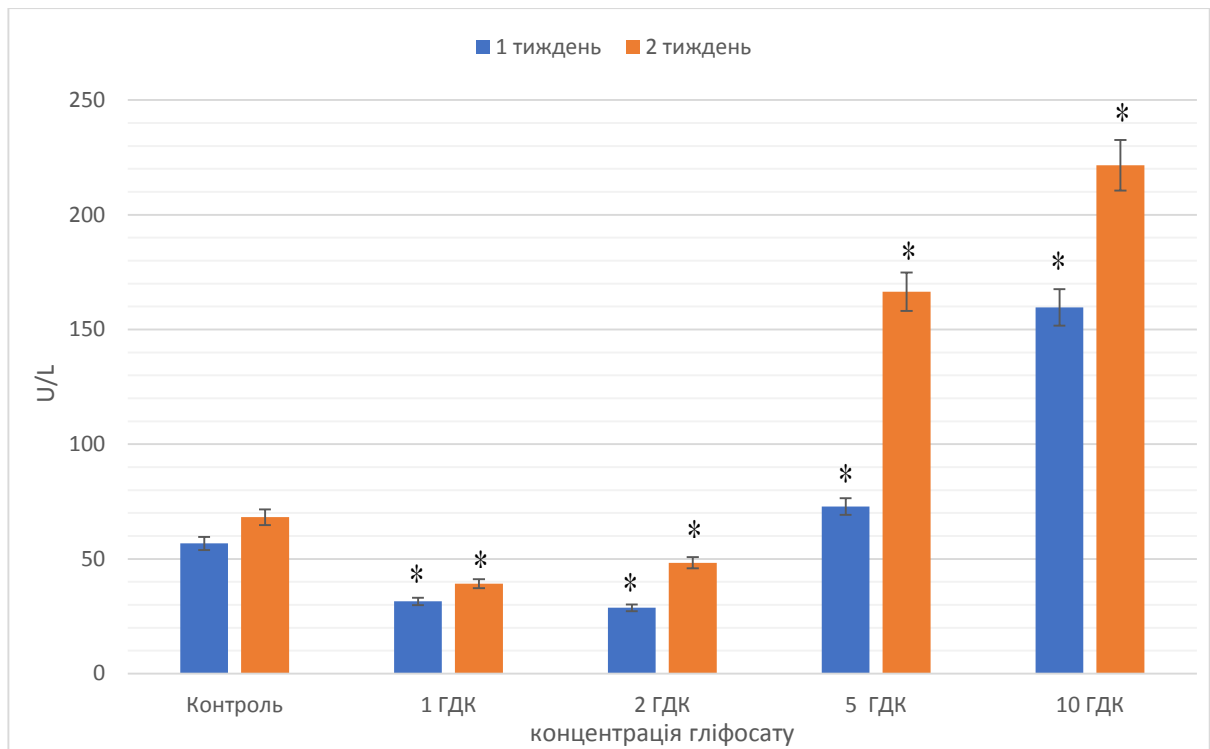


Рис. 3.9 Активність лужної фосфатази у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Активність ЛФ є високочутливим індикатором токсичного ураження печінки та метаболічних порушень. На першому тижні експозиції зафіксовано неоднозначну реакцію: за низьких концентрацій гліфосату (1 ГДК) активність ЛФ знижувалася, тоді як при високих концентраціях (10 ГДК) відбулося істотне зростання активності (рис. 3.9). Це різке зростання є класичним біохімічним маркером холестазу або глибокого пошкодження клітинних мембран печінки та жовчовивідних шляхів, спричиненого токсичною дією гліфосату. На другому тижні, незважаючи на відновлення годування, зростання ЛФ у високих концентраціях прогресувало (рис. 3.9). Збереження і посилення гіперферментемії на 2-му тижні свідчить про необоротний і прогресуючий характер токсичного ураження печінки, яке не компенсується відновленням надходження поживних речовин. Таким чином, активність ЛФ є найбільш чутливим показником гепатотоксичності гліфосату. Аналогічні результати отримали Сукхенду Дей та співавтори, які відзначили підвищення

активності лужної фосфатази та маркерів оксидативного стресу в риб при накопиченні токсиканту [57].

3.4 Активність γ -глутамілтрансферази (ГГТ) у сироватці крові карасів за дії гліфосату

γ -Глутамілтрансфераза (ГГТ) — мембранний фермент, локалізований на зовнішній поверхні клітин багатьох тканин, найінтенсивніше в печінці й нирках. Функціонально ГГТ відіграє ключову роль у метаболізмі глутатіону: вона каталізує розщеплення позаклітинного глутатіону до амінокислот, які можуть бути використані клітиною для ресинтезу внутрішньоклітинного глутатіону, — основного антиоксиданту клітини. У клінічній та експериментальній практиці підвищення активності ГГТ у сироватці розглядають як маркер порушення печінкової або жовчної функції, а також як індикатор підвищеного оксидативного навантаження й дисбалансу в системі детоксикації.

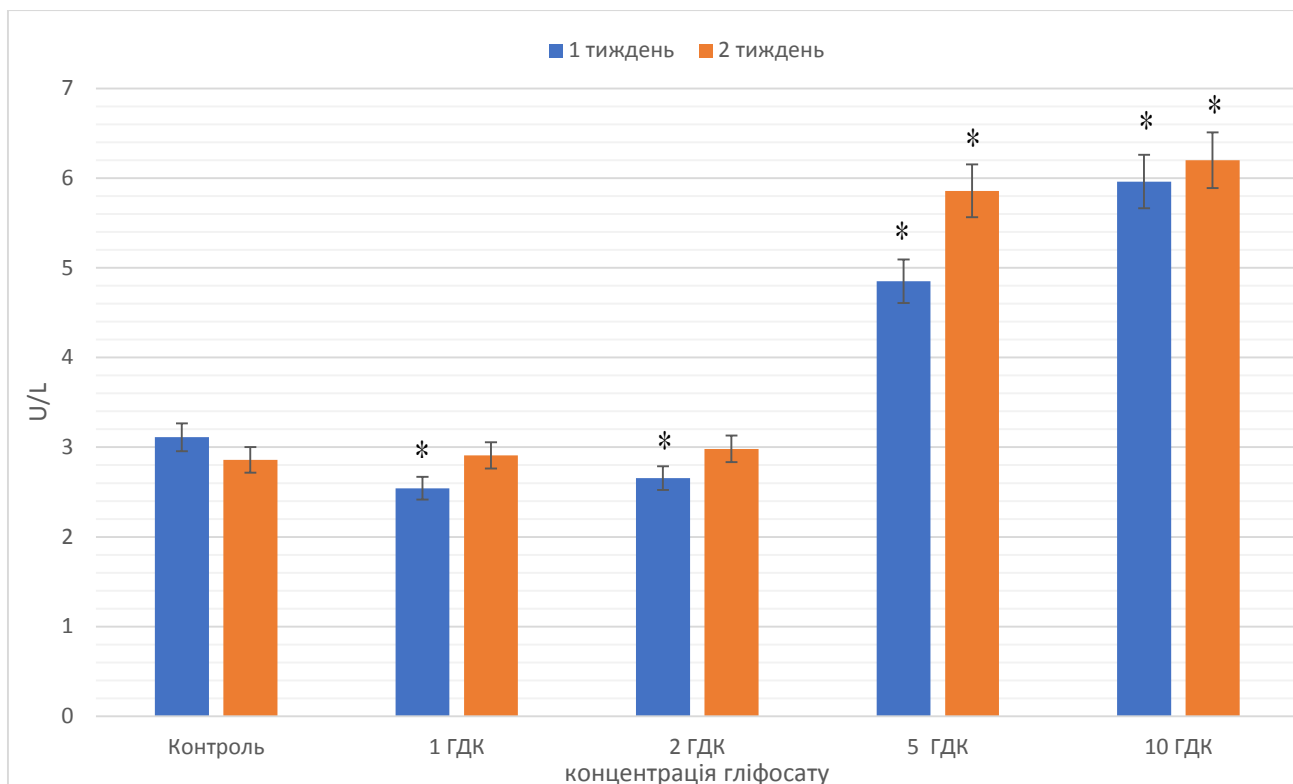


Рис. 3.10 Активність ГГТ у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

На першому тижні експозиції зафіксовано дозозалежну гіперферментемію: у високих концентраціях (5 ГДК, 10 ГДК) активність ГГТ критично зросла у 1,6 та 2 рази відповідно (рис. 3.10), що свідчить про гостре токсичне ураження епітелію жовчних проток та порушення відтоку жовчі. У низьких концентраціях спостерігалось невелике зниження, що відображає пригнічення загального метаболізму. На другому тижні зростання активності ГГТ у високих концентраціях прогресувало, збільшившись на 106% у групі 10 ГДК (рис. 3.10). Посилення гіперферментемії на 2-му тижні, як і у випадку з лужною фосфатазою, вказує на стійкий і, ймовірно, незворотний характер токсичного ураження печінки, яке не піддається компенсації за рахунок покращення харчування.

По-перше, підвищення активності ГГТ у сироватці найчастіше інтерпретується як наслідок ушкодження печінкових клітин або жовчних

проток із вивільненням мембранного ферменту в кров'яне середовище. Воно супроводжується підвищенням трансаміназ (АЛТ, АСТ) і іншими ознаками гепатоцелюлярного пошкодження. Це відзначено в ряді досліджень, де експозиція гліфосату або комерційних формуляцій призводила до підвищення печінкових ферментів у риб — ознака гепатотоксичності [36].

По-друге, зниження активності ГГТ у сироватці, яке спостерігалось в деяких групах, може відображати інший процес — пригнічення синтезу ферменту або порушення мембранної цілісності з руйнуванням локалізації ферменту без масового вивільнення в кров (наприклад, при сильному некротичному ураженні, коли клітини втрачають можливість синтезувати нові молекули ферменту). Крім того, гліфосат індукує оксидативний стрес та зміну глутатіонового гомеостазу, що може призводити до зниження активності ферментативних систем через окисне ушкодження білків або їх модифікацію. У літературі наведені як приклади збільшення, так і зменшення активності різних детоксикаційних ферментів після впливу пестицидів [33].

3.5 Активність супероксиддисмутази (СОД) у сироватці крові карасів за дії гліфосату

Супероксиддисмутаза (СОД) є одним із головних ферментів антиоксидантної системи організму, який каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у менш токсичні сполуки — пероксид водню (H_2O_2) і молекулярний кисень (O_2). Цей фермент відіграє провідну роль у нейтралізації первинних продуктів окисного стресу, запобігаючи руйнуванню клітинних структур та біомолекул. Зміни активності СОД у сироватці крові відображають стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги й є чутливим показником впливу токсикантів, зокрема пестицидів.

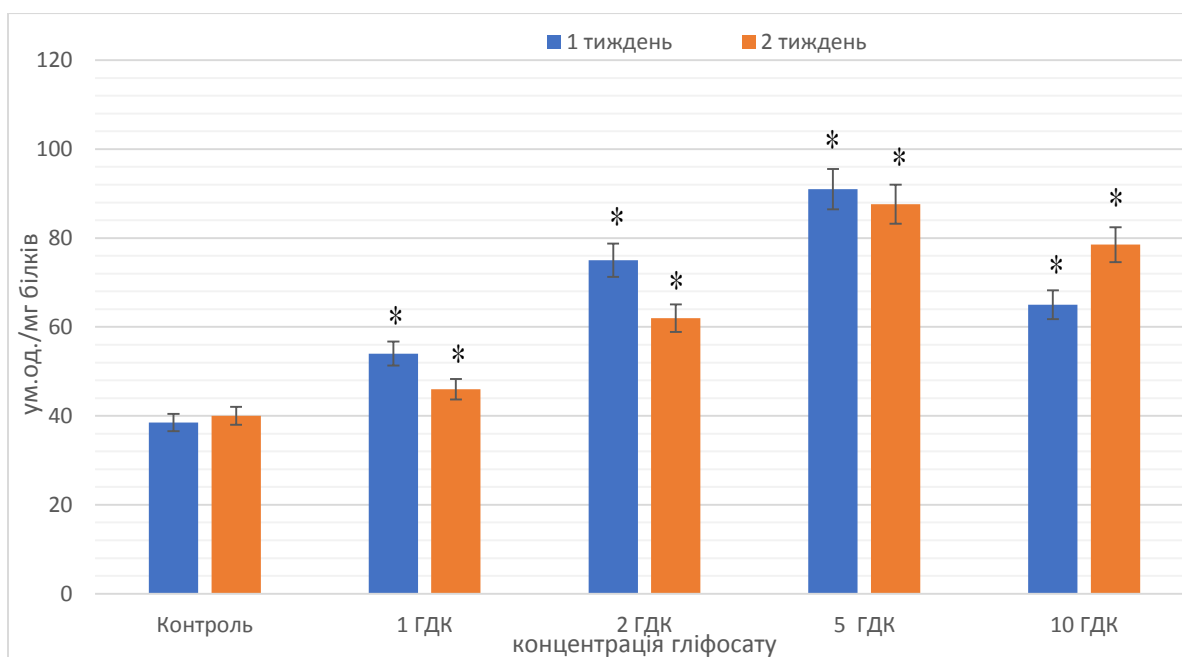


Рис. 3.11 Активність СОД у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

У нашому експерименті встановлено, що активність СОД у сироватці крові карасів звичайних змінювалася залежно від концентрації гліфосату та тривалості експозиції. На першому тижні експозиції зафіксовано різке, дозозалежне зростання активності СОД, що сягнуло пікових значень у групі 5 ГДК (рис. 3.11). Це зростання є прямим доказом гострого окисного шоку, спричиненого гліфосатом, який індукує масове утворення активних форм кисню (АФК) у клітинах. Невелике зниження активності у найвищій концентрації (рис. 3.11) може вказувати на початок вичерпання або токсичної інактивації ферменту на тлі критичного токсичного навантаження та нестачі ресурсів, спричиненої голодуванням.

На другому тижні експозиції активність СОД у високих концентраціях зберігається на стабільно високому рівні (рис. 3.11). Збереження такої високої активності СОД свідчить про те, що окисний стрес набув хронічного характеру, проте відновлення надходження поживних речовин забезпечило організм ресурсами для підтримки антиоксидантної системи. Це є типовою

адаптивною реакцією організму на хронічний стрес. Висока активність СОД підтверджує, що гліфосат продовжує індукувати утворення АФК у клітинах, що вимагає постійної протидії. Так, за спостереженнями Ахмета Топала та співавторів, при короткочасному впливі гліфосату у райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) відзначалося підвищення активності СОД як реакція на окисне навантаження, тоді як за тривалої експозиції показник знижувався через виснаження антиоксидантної системи [66]. Аналогічні тенденції описані і у дослідженні, де у *Carassius auratus* під впливом формуляцій гліфосату активність СОД підвищувалася на початкових етапах інтоксикації, але при збільшенні дози спостерігалось пригнічення ферменту [67].

Найімовірніше, СОД, будучи першою лінією антиоксидантного захисту, може спочатку активуватися при незначному оксидативному стресі, але при тривалій або більш високій експозиції його активність знижується — інтерпретуючи як втрату компенсаторного потенціалу [54].

3.6 Активність каталази (КАТ) у сироватці крові карасів за дії гліфосату

Каталаза (КАТ) є одним із ключових ферментів антиоксидантного захисту, що забезпечує розклад пероксиду водню на воду та кисень, попереджаючи накопичення токсичних продуктів окиснення в клітинах. Активність цього ферменту відображає стан антиоксидантної системи організму і є чутливим показником впливу різних ксенобіотиків, зокрема гербіцидів, на метаболізм риб.

Активність каталази у сироватці крові карасів за дії гліфосату демонструє чітко виражену дозозалежну тенденцію до зниження, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. Уже на першому тижні експозиції спостерігалось незначне підвищення активності ферменту на 30% при найнижчій концентрації (1 ГДК) (рис. 3.12), що може свідчити про активацію

антиоксидантного захисту на початковій стадії адаптації до токсичного впливу.

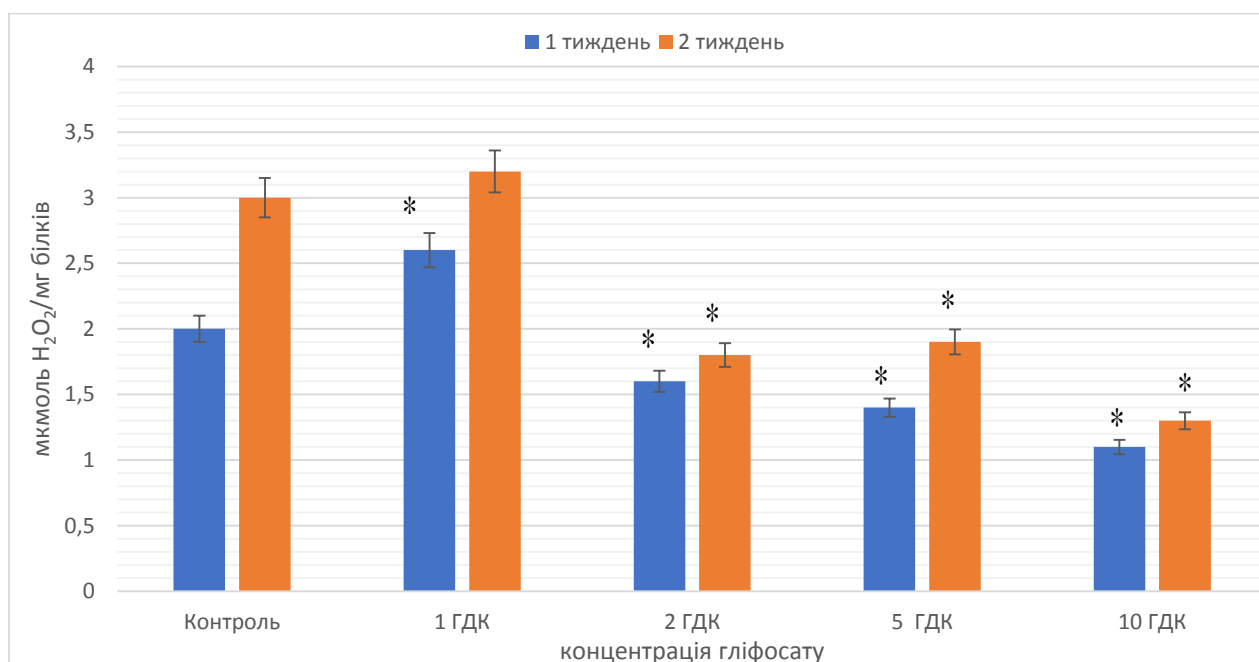


Рис. 3.12 Активність КАТ у сироватці крові карася сріблястого за дії різних концентрацій гліфосату.

Проте при подальшому зростанні концентрації гліфосату активність каталази різко зменшувалася: на 20% — при 2 ГДК, на 30% — при 5 ГДК і на 45% — при 10 ГДК (рис. 3.12), що вказує на виснаження ферментативної системи антиоксидантного захисту. Ці результати узгоджуються з літературними даними. Так, Олег Луцак та співавтори у дослідях із золотим карасем (*Carassius auratus*) показали, що короткочасна дія гербіциду Roundup призводила до підвищення активності каталази в печінці та нирках, тоді як тривала експозиція — до її пригнічення [63].

На другому тижні експозиції ця тенденція посилюється. У контролі активність каталази збільшилася, що відображає природну стабілізацію окисно-відновного балансу в організмі риб. Водночас у дослідних групах, особливо при 5 і 10 ГДК, активність ферменту залишалася низькою (рис. 3.12),

що свідчить про стійкий пригнічувальний вплив гліфосату на ферментативну ланку антиоксидантного захисту. Зменшення активності каталази вказує на накопичення перекису водню та посилення процесів пероксидації ліпідів у клітинах печінки і крові.

Отримані результати свідчать, що короткочасна дія малих доз гліфосату може викликати коротку адаптивну реакцію антиоксидантної системи, однак тривалий або інтенсивний вплив пестициду призводить до виснаження ферментативного потенціалу каталази. Це створює передумови для розвитку оксидативного стресу, пошкодження клітинних мембран і порушення метаболічних процесів. У дослідженні Девіда Обасі та співавторів дія гліфосату протягом 96 год викликала значне зниження активності каталази в печінці та крові, що автори пов'язували із виснаженням антиоксидантного потенціалу клітин [64].

3.7 Вплив мікрководоростей *Desmodesmus armatus* на біохімічні показники крові у карася сріблястого

Перед початком експерименту хімічний склад води відповідав оптимальним умовам для утримання карася та розвитку водоростей: рН — 7,5, розчинений кисень — 6,2 мг/л, TDS — 245 мг/л; вміст нітратів і нітритів не перевищував ГДК. Після внесення 10 ГДК гліфосату та водоростей воду протягом 10 днів не замінювали і риби не годували, що спричинило зміни фізико-хімічних показників. рН підвищився до 7,8, кисень — до 6,4 мг/л, ймовірно внаслідок фотосинтезу водоростей. TDS зріс до 261 мг/л, що може бути пов'язано з накопиченням розчинених органічних і неорганічних речовин, зокрема продуктів розпаду гліфосату [75]. Концентрації нітратів і нітритів також збільшилися, що, ймовірно, відображає мінералізацію органічних залишків та активний азотний обмін у водному середовищі.

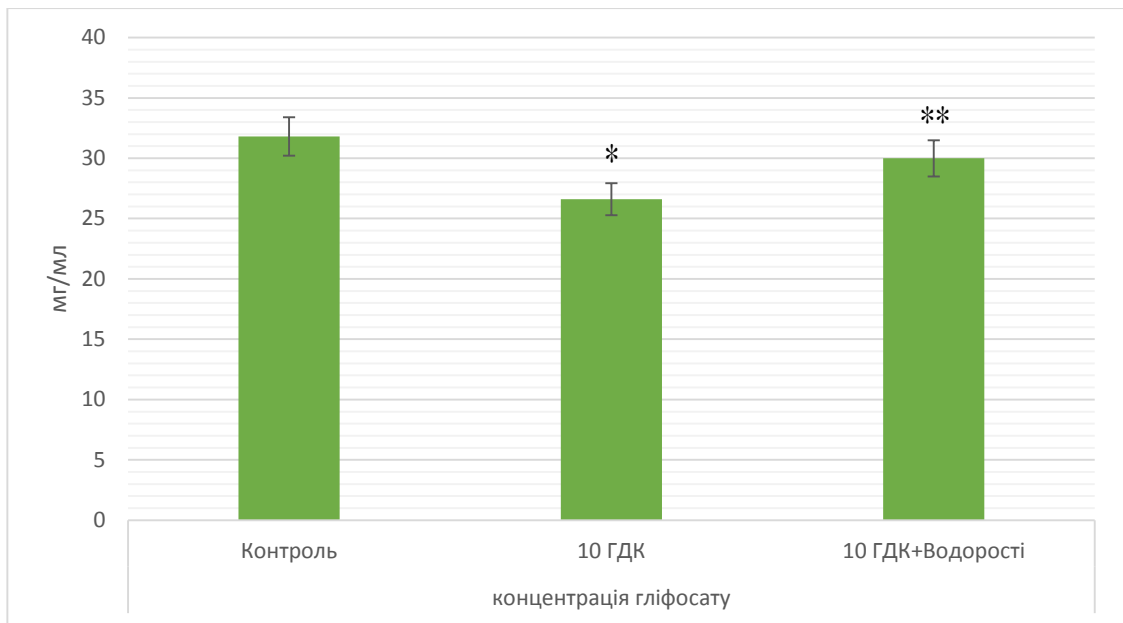


Рис. 3.13 Вміст загального білка у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікрободоростей *Desmodesmus armatus*.

Примітка (тут і надалі): * - достовірна різниця показника у порівнянні з контролем; ** - достовірна різниця показника у порівнянні з концентрацією гліфосату 10 ГДК без водоростей ($p \leq 0,05$).

Введення мікрободоростей *Desmodesmus armatus* в акваріум до риб, що перебували під впливом летальної концентрації гліфосату (10 ГДК), продемонструвало виражений захисний ефект щодо вмісту загального білка. У групі, яка отримувала лише гліфосат (10 ГДК), вміст загального білка знизився у 1,2 рази порівняно з контролем (рис. 3.13). Це падіння було спричинене глибоким токсичним ураженням печінки та порушенням її синтетичної функції. Проте, у дослідній групі, де до токсиканту були додані водорості, показник зріс у 1,1 раза (рис. 3.13). Це свідчить про те, що *D. armatus* сприяли частковій компенсації та відновленню синтетичної функції печінки, майже наблизивши показник до контрольних значень.

Мікрободорості відомі своєю біосорбційною та біотрансформаційною здатністю, завдяки якій вони поглинають, акумулюють і частково розкладають органічні сполуки, у тому числі гербіциди. Це сприяє зниженню концентрації

токсиканта у воді та, відповідно, зменшенню його впливу на організми риб. Крім того, фотосинтетична активність водоростей підвищує рівень розчиненого кисню, що також позитивно впливає на метаболічні процеси у риб, зокрема на білковий обмін.

Таким чином, спостережене у досліді відновлення рівня білків майже до контрольних значень у присутності мікробіодоростей можна пояснити комплексною дією біосорбції, ферментативної детоксикації та покращення оксигенації води, що узгоджується з результатами, описаними в роботі Н. Р. Акмуханової та співавторів [80].

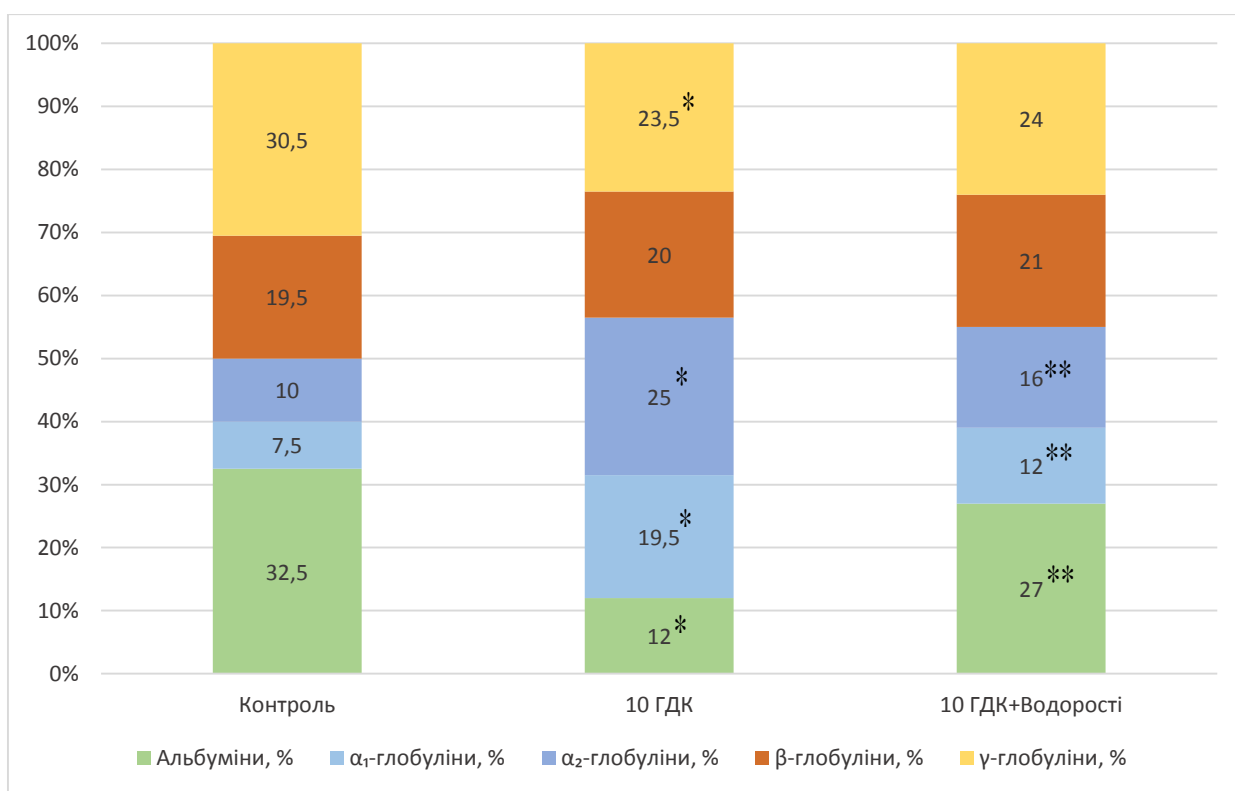


Рис. 3.14 Відносний вміст окремих білкових фракцій у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікробіодоростей *Desmodesmus armatus*

У варіанті з додаванням мікробіодоростей спостерігається підвищення рівня альбумінів у сироватці крові риб порівняно з групою, зазнавшою дії лише гліфосату. Якщо у варіанті з 10 ГДК гліфосату вміст альбумінів

знижується у 2,7 разів, то при додаванні мікроводоростей показник зростає у 2,2 рази (рис. 3.14), що свідчить про пом'якшення токсичної дії гербіциду та відновлення білково-синтетичної функції печінки.

Підвищення рівня альбумінів у присутності мікроводоростей вказує на стабілізацію метаболічних процесів і зменшення катаболізму білків, який зазвичай активується при стресі чи інтоксикації. Також відомо, що біомаса мікроводоростей містить вітаміни, незамінні амінокислоти та антиоксидантні пігменти (каротиноїди, фікоціаніни), які покращують білковий обмін і підтримують антиоксидантний статус організму риб.

Згідно з літературними джерелами - мікроводорості та ціанобактерії не лише ефективно знижують токсичність пестицидів, але й сприяють нормалізації білкових фракцій плазми крові гідробіонтів [80].

У експерименті з додаванням мікроводоростей спостерігається зниження рівня α_1 - і α_2 -глобулінів у сироватці крові риб порівняно з групою, підданою дії лише гліфосату (рис. 3.14). Такі зміни свідчать про зменшення токсичного навантаження та стабілізацію білкового обміну під впливом мікроводоростей. Зниження α -глобулінів може бути пов'язане з нормалізацією функції печінки та зменшенням запальної реакції, оскільки ці білки включають α_1 -антитрипсин, церулоплазмін та інші антиоксидантні фактори, що активуються при інтоксикації.

Згідно з дослідженням Н. Р. Акмуханової та співавторів, мікроводорості зменшують окисний стрес у водних організмах, стимулюючи антиоксидантну систему та підтримуючи рівень білків плазми в межах фізіологічної норми. Автори відзначають, що біоактивні сполуки водоростей, такі як хлорофіли, каротиноїди та поліфеноли, діють як природні антиоксиданти, що нейтралізують вільні радикали, викликані дією гербіцидів. Це пояснює більш збалансовані зміни α -глобулінових фракцій у присутності мікроводоростей [80].

Аналіз фракцій β - та γ -глобулінів у сироватці крові карасів показав, що додавання мікроводоростей *Desmodesmus armatus* не викликало статистично суттєвих змін у цих показниках. Фракція β -глобулінів, відповідальна за транспортну функцію, збільшилась на 2,5% у групі 10 ГДК, а при додаванні водоростей незначно зросла на 4,7% (рис. 3.14). Ця мінімальна зміна свідчить про те, що протекторна дія водоростей не була спрямована на посилення транспортної функції або ця функція вже була відносно стабільною. Фракція γ -глобулінів, яка була знижена гліфосатом, при додаванні *D. armatus* показала лише мінімальне підвищення на 2% (рис. 3.14). Збереження показника γ -глобулінів на рівні, значно нижчому за контрольний, вказує на те, що мікроводорості не виявили сильного стимулюючого чи відновлюючого впливу на гуморальну ланку імунітету, що контрастує з їхнім вираженим ефектом на відновлення синтетичної функції печінки (про що свідчить значне зростання альбумінів).

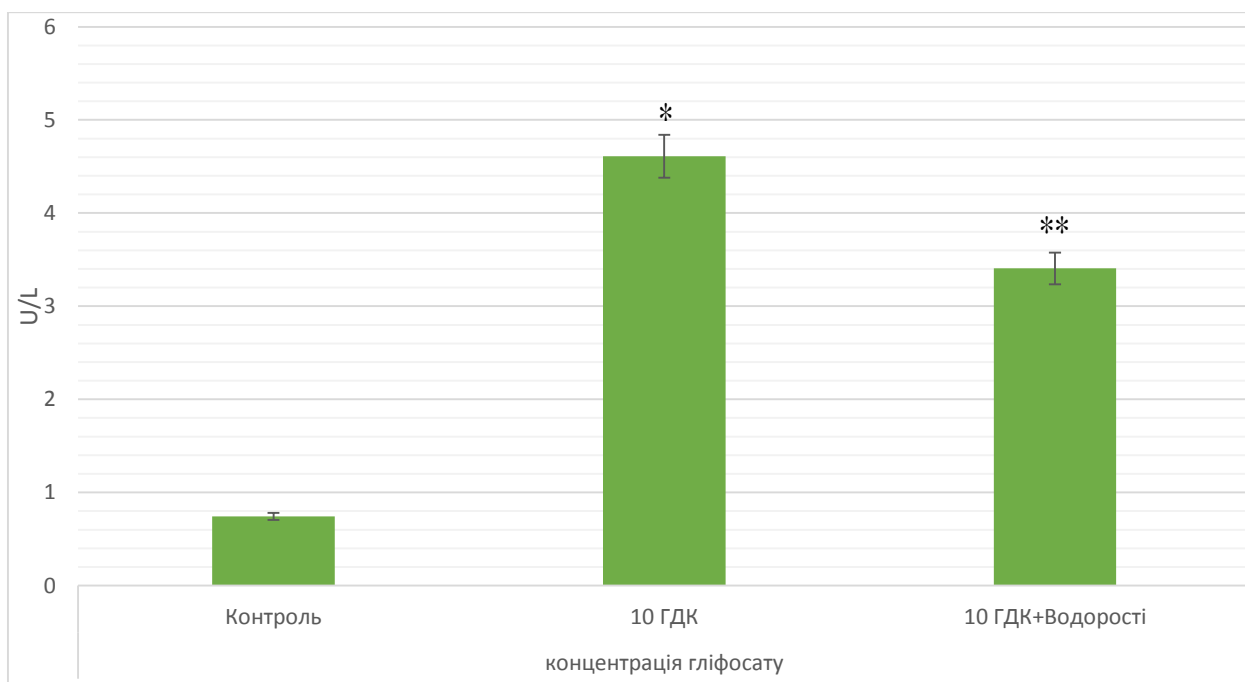


Рис. 3.15 Активність АЛТ у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікроводоростей *Desmodesmus armatus*.

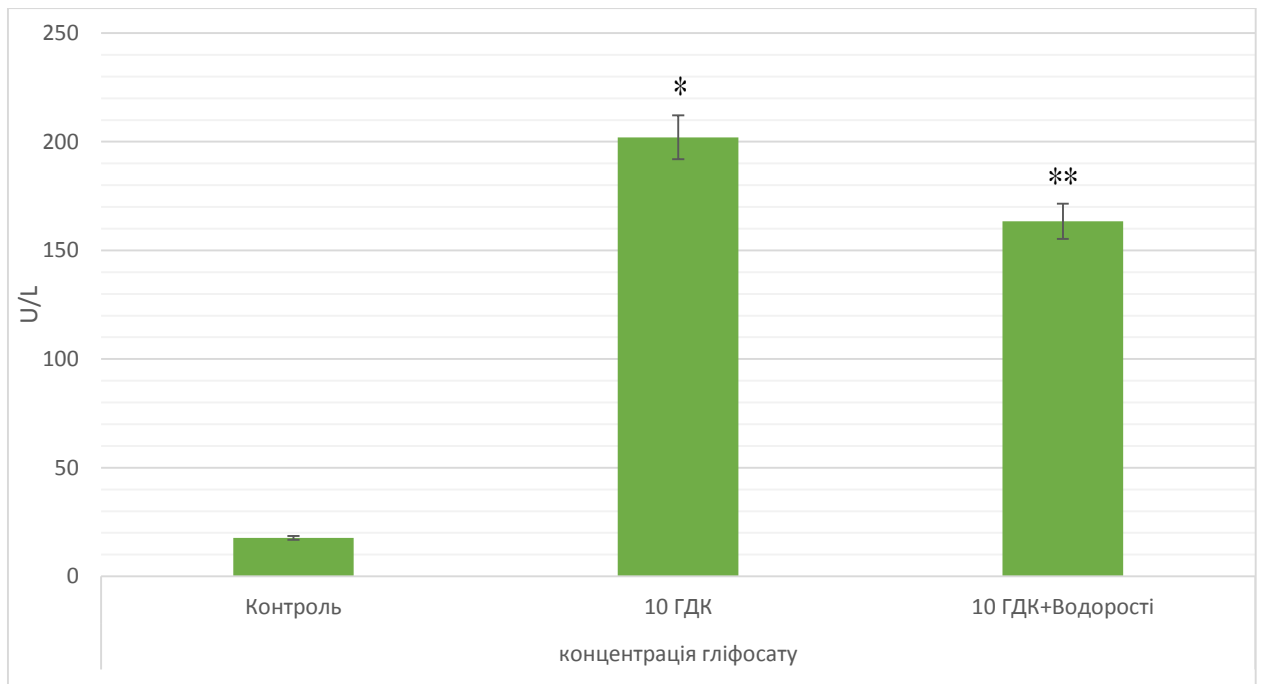


Рис. 3.16 Активність АСТ у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікроводоростей *Desmodesmus armatus*.

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) у карася сріблястого істотно зросла під впливом гліфосату в концентрації 10 ГДК. Порівняно з контролем, значення АЛТ підвищилося у 6,2 рази, що вказує на розвиток гепатоцелюлярного ушкодження та посиленій вихід ферменту з клітин печінки внаслідок токсичного навантаження. Додавання *Desmodesmus armatus* частково зменшило негативний ефект: активність АЛТ у групі з мікроводоростями знизилася у 1,4 рази, що свідчить про певний протекторний вплив мікроводоростей, імовірно пов'язаний із зниженням концентрації токсиканта в середовищі або його метаболітів.

Аналогічну тенденцію спостерігали й щодо аспартатамінотрансферази (АСТ). Показник під дією гліфосату (10 ГДК) різко підвищився у 11,4 рази, що вказує на виражене пошкодження тканин, зокрема печінки, серця чи скелетних м'язів, які є основними джерелами цього ферменту. У присутності водоростей рівень АСТ зменшився до у 1,2 рази, залишаючись значно вищим за контроль, проте демонструючи зниження інтенсивності токсичного впливу. Це

підтверджує біоремедіаційний потенціал *Desmodesmus armatus*, здатних покращувати біохімічний статус риб за умов дії гліфосату. Цей ефект підтверджується експериментальними роботами, які показували зниження рівнів МДА та часткову нормалізацію АЛТ/АСТ в організмах, що отримували антиоксидантні добавки або живі водорості під час контакту з пестицидами. Також є роботи, які показують, що дієтичні або водні антиоксиданти (наприклад, екстракти рослин) можуть пом'якшувати підвищення трансаміназ після впливу гліфосату [36, 61].

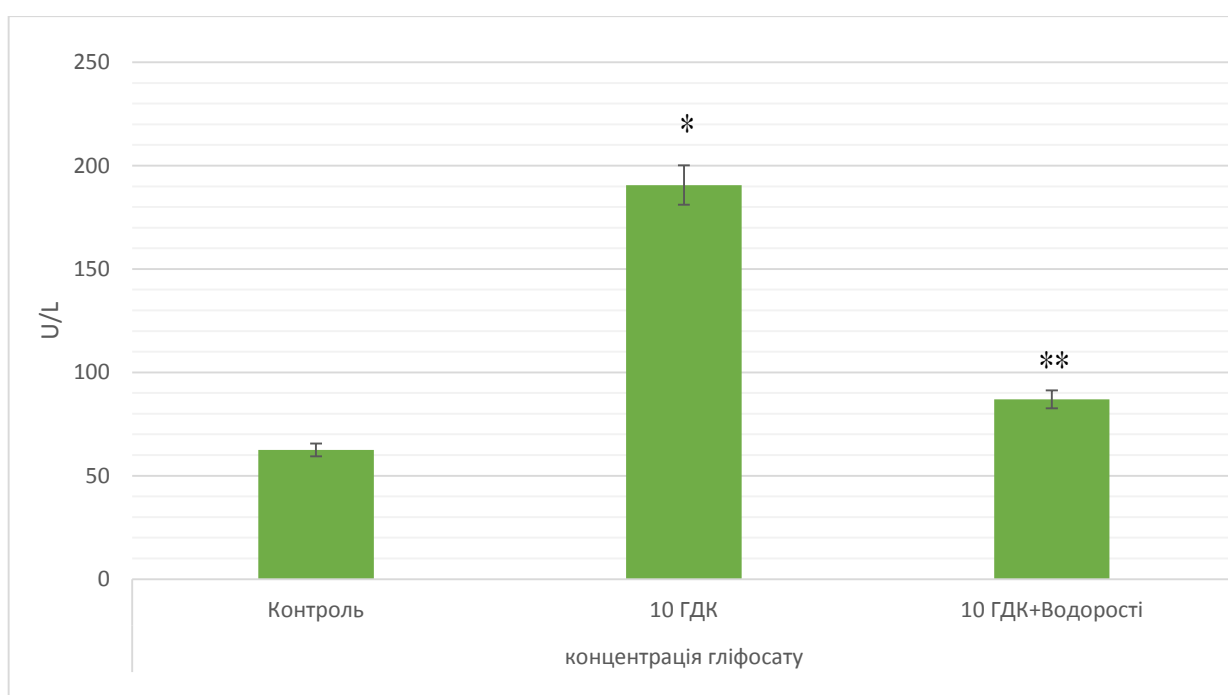


Рис. 3.17 Активність ЛФ у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікроводоростей *Desmodesmus armatus*.

У цій групі активність лужної фосфатази залишалася близькою до контрольної, що свідчить про захисний ефект мікроводоростей (рис. 3.17). Імовірно, мікроводорості знижували токсичність гліфосату за рахунок адсорбції частини гербіциду, а також завдяки виділенню біологічно активних речовин із антиоксидантними властивостями. Подібні висновки подано у дослідженні Чженьцзян Ян та інших, де встановлено, що мікроводорості

Microcystis aeruginosa під впливом пестициду прометрину змінюють фізико-хімічні параметри середовища, що, у свою чергу, впливає на активність ферментів антиоксидантного захисту у риб. Автори підкреслюють, що присутність водоростей може модифікувати токсичний вплив пестицидів через біоаккумуляцію або зміни біодоступності токсиканту [58].

У дослідженні Марії Мерседес Іумматто та співавторів на золотому молюску *Limnoperna fortunei* спостерігалось підвищення активності лужної фосфатази як адаптивна відповідь на споживання водоростей, попередньо експонованих гліфосатом. Це підтверджує, що мікрководорості відіграють важливу роль у зменшенні токсичності гліфосату у водних екосистемах шляхом біосорбції та посилення антиоксидантного потенціалу [59].

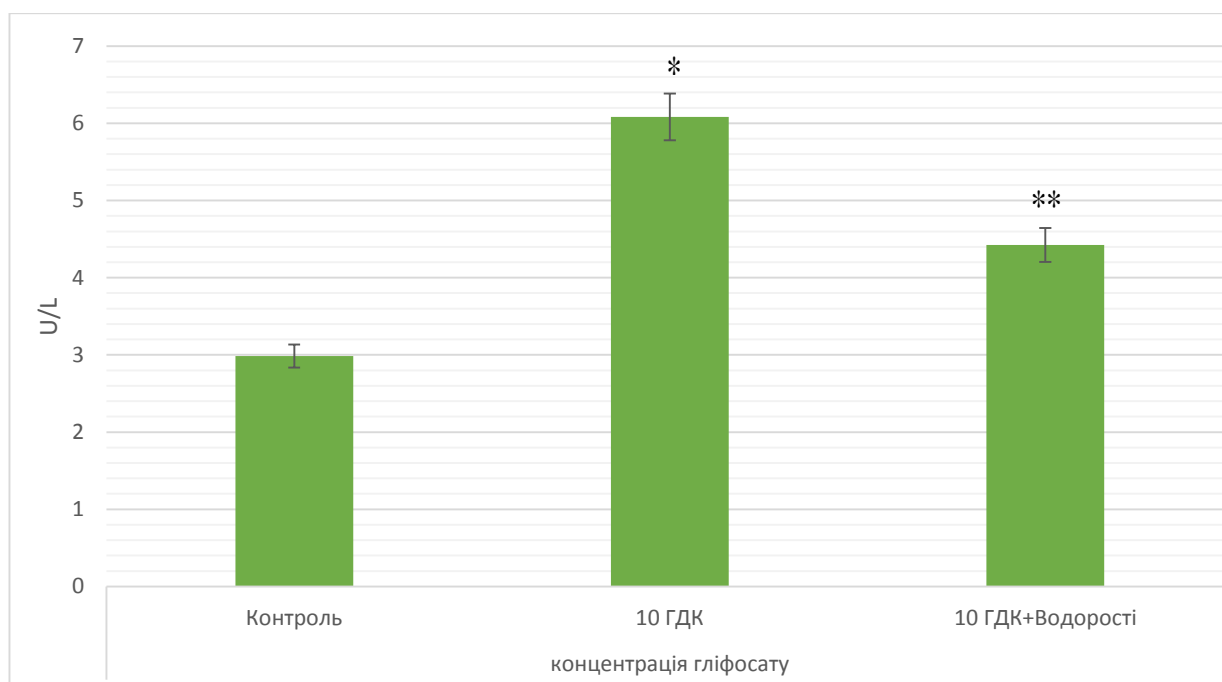


Рис. 3.18 Активність ГГТ у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікрководоростей *Desmodesmus armatus*.

Особливий інтерес становить ефект мікрководоростей, який ми спостерігали у групі з 10 ГДК + водорості: порівняно з групою 10 ГДК без водоростей активність ГГТ була нижчою (рис. 3.18). Такий захисний ефект

МОЖЛИВО пояснити антиоксидантними властивостями деяких видів мікроводоростей — вони продукують фітохімічні сполуки, що зменшують рівень реактивних форм кисню та підтримують глутатіоновий метаболізм, тим самим стабілізуючи активність ферментів, пов'язаних із детоксикацією. Останні роботи з впливу мікроводоростей на модульовану експозицію показують, що вони можуть пом'якшувати оксидативні наслідки токсикантів у водних біотах [62].

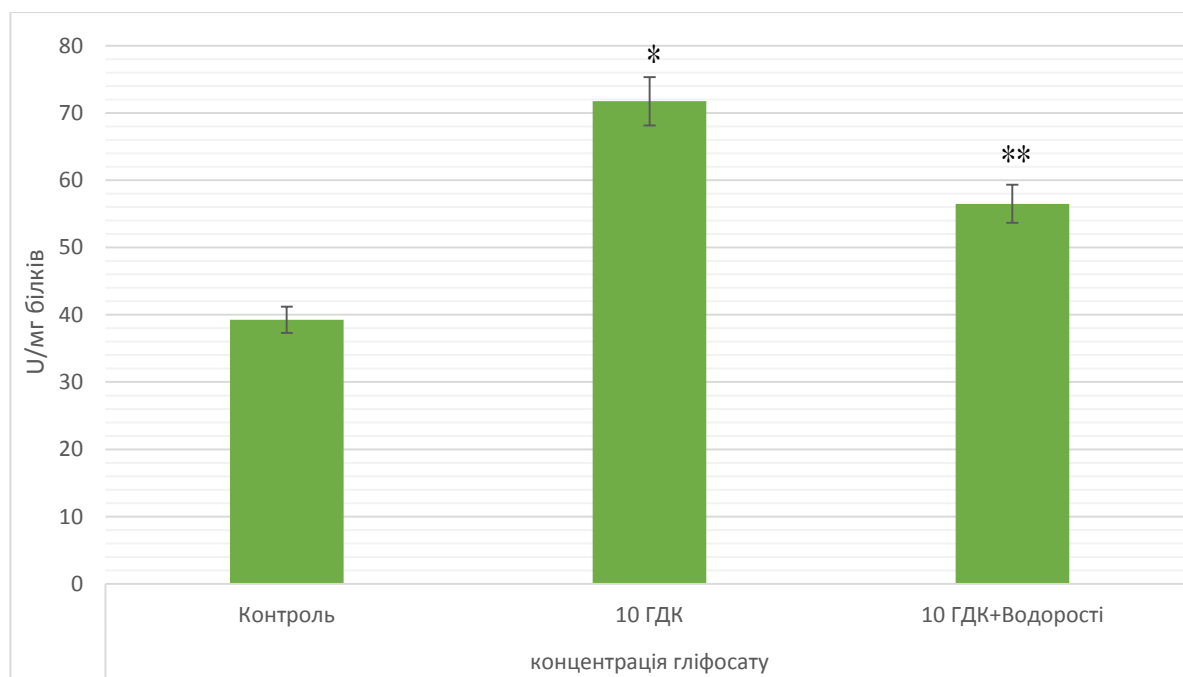


Рис. 3.19 Активність СОД у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікроводоростей *Desmodesmus armatus*.

Аналіз активності супероксиддисмутази підтвердив, що мікроводорості *Desmodesmus armatus* мають виражений антиоксидантний та протекторний ефект. У групі риб, що піддавалась впливу гліфосату (10 ГДК), активність СОД критично зросла на 45% порівняно з контролем (рис. 3.19). Це зростання є прямим доказом гострого окисного стресу та інтенсивної мобілізації антиоксидантного захисту у відповідь на токсикант. Проте, при додаванні до акваріуму водоростей *D. armatus* активність СОД знизилася на 21% (рис. 3.19). Це значення, хоча й залишається вищим за контрольний рівень, свідчить

про істотне зниження рівня окисного стресу. Антиоксидантна дія мікроводоростей, ймовірно, пов'язана з їхньою здатністю зв'язувати та нейтралізувати активні форми кисню (АФК) або ж із прямою детоксикацією гліфосату, що зменшує навантаження на власні захисні системи карасів. Таким чином, *D. armatus* забезпечує стабілізацію антиоксидантного гомеостазу в умовах токсичного впливу. Це пояснюється наявністю у водоростей антиоксидантних пігментів (β -каротин, астаксантин, фікобіліпротеїни), які взаємодіють з вільними радикалами та стабілізують клітинні мембрани [68].

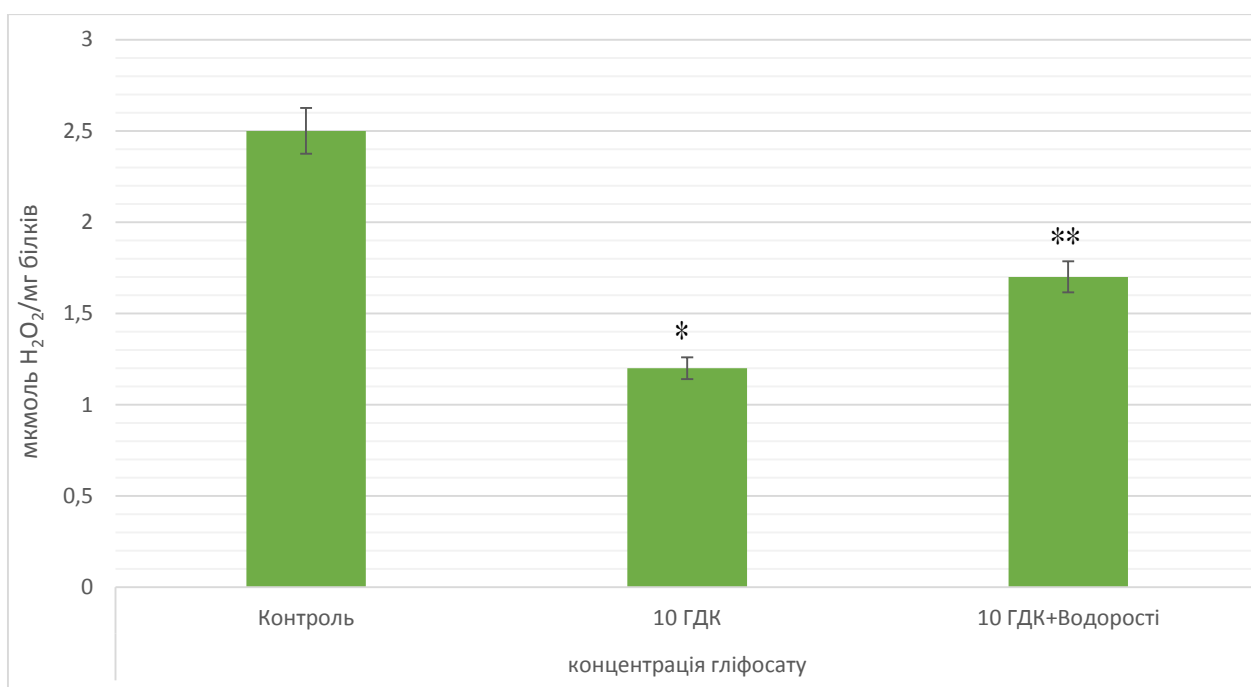


Рис. 3.20 Активність КАТ у сироватці крові карасів за дії гліфосату концентрацією 10 ГДК за дії мікроводоростей *Desmodesmus armatus*.

Активність каталази є важливим показником стану антиоксидантної системи, який під впливом гліфосату в концентрації 10 ГДК знижувався у 2 рази порівняно з контролем (рис. 3.20). Це падіння вказує на злам або токсичну інактивацію ферменту, що посилює ризик окисного пошкодження. Проте, введення в акваріум мікроводоростей *Desmodesmus armatus* призвело до помітного відновлення активності КАТ, яка зросла у 1,4 рази (рис. 3.20).

Незважаючи на те, що цей показник залишається нижчим за контрольний, він свідчить про захисний механізм водоростей, який, ймовірно, пов'язаний із двома шляхами: або шляхом безпосередньої детоксикації гліфосату, що знижує токсичне навантаження на гепатоцити, або шляхом забезпечення організму антиоксидантами та поживними речовинами, необхідними для відновлення синтезу та функціональної активності КАТ. Таким чином, *D. armatus* частково компенсує дефіцит КАТ, запобігаючи накопиченню перекису водню. Подібний захисний ефект описано у роботах Мохамеда Хамеда та інших, де спільне утримання риб і мікрводоростей за дії токсикантів приводило до зменшення рівня оксидативного стресу в організмах риб [65].

ВИСНОВКИ

1. Дія гліфосату у концентрації 5 ГДК та 10 ГДК зумовлює зниження рівня загального білка та порушення співвідношення білкових фракцій у крові карася сріблястого - зменшення вмісту альбумінів та зростання рівня α -глобулінових фракцій.
2. Встановлено дозозалежне зростання активності амінотрансфераз з найбільшими відхиленнями при 10 ГДК гліфосату. Активність лужної фосфатази та гамма-глутамілтрансферази достовірно зростала порівняно з контролем за дії найвищих з досліджуваних концентрацій гліфосату .
3. Супероксиддисмутазна активність крові карася сріблястого підвищена за умов використання усіх досліджуваних концентрацій гліфосату. Натомість, рівень каталазної активності підвищений лише за дії 1 ГДК, вищі концентрації гербіциду зумовили зниження активності ферменту.
4. Доведено біоремедіаційний потенціал мікродорості *Desmodesmus armatus* за умов найвищого токсичного навантаження (10 ГДК гліфосату). Додавання водоростей сприяло частковому відновленню біохімічних показників крові карася сріблястого — рівень амінотрансфераз, ЛФ, ГГТ, а також окремих білкових фракцій був нижчим порівняно з рибами, що зазнавали дії гліфосату без біоремедіації. Це свідчить про здатність *D. armatus* зменшувати токсичний вплив гліфосату, імовірно завдяки поглинанню або трансформації частини гербіциду.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In: Ware, G.W. (eds) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, vol 167. Springer, New York, NY.
2. Cedergreen N (2014) Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. PLoS ONE 9(5): e96580.
3. Slaninova A, Smutna M, Modra H, Svobodova Z. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. Neuro Endocrinol Lett. 2009;30 Suppl 1:2-12
4. Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine Pollution Bulletin, 42(8), 656–666.
5. Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, 101(1), 13–30.
6. Tsui, M. T. K., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere, 52(7), 1189–1197.
7. Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. Science of the Total Environment, 616–617, 255–268.
8. Blais J. 2005. Biogeochemistry of persistent bioaccumulative toxicants: processes affecting the transport of contaminants to remote areas. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 62: 236-243.

9. Ahsan, M. M. (2023, January 26). Aquatic toxicity: Classification, effects, measurement, and control. *Biohavoc*.
10. Sarkar, S., Gill, S.S., Das Gupta, G. et al. Water toxicants: a comprehension on their health concerns, detection, and remediation. *Environ Sci Pollut Res* 29, 53934–53953 (2022).
11. Ghimire, M. (2024, September 24). Water pollution: Sources, pollutants, types, effects, and control (MicrobeNotes). Retrieved July 2025
12. United States Environmental Protection Agency. (2024, November 6). Basic information about nonpoint source (NPS) pollution. In *Polluted Runoff: Nonpoint Source (NPS) Pollution*. EPA.
13. Qayoom, Imtiyaz & Balkhi, Hassan & Mukhtar, Malik & Bhat, Farooz A. & Abubakr, Adnan & Shah, Mf. (2017). Pesticide residue analysis from water, fish and sediments.
14. Rao, J. V. (2006). Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere*, 65(10), 1814–1820.
15. G. M. Kosolapoff, L. Maier (eds.): *Organic Phosphorus Compounds*, Wiley-Interscience, New York, 2006: 1972–1976.
16. Gledhill, W. E., & Feijtel, T. C. J. (1992). Environmental properties and safety assessments of organic phosphonates used in detergent and water treatment industries. *Tenside Surfactants Detergents*, 29(2), 151–157
17. Yerima, R., Jacob, L. T., & Nazeef, S. (2023). Acute toxicity of glyphosate and propanil on *Clarias gariepinus* juveniles. *Greener Journal of Biological Sciences*, 13(1), 16–23.

18. Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. Jr. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616–617, 255–268.
19. Lavado R, Schlenk D. Microsomal biotransformation of chlorpyrifos, parathion and fenthion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): mechanistic insights into interspecific differences in toxicity. *Aquat Toxicol.* 2011 Jan 17;101(1):57-63.
20. Sellami B, Bouzidi I, Hedfi A, Almalki M, Rizk R, Pacioglu O, Boufahja F, Beyrem H, Sheehan D. Impacts of nanoparticles and phosphonates in the behavior and oxidative status of the mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Saudi J Biol Sci.* 2021 Nov;28(11):6365-6374.
21. Nowack, B. (2003). Environmental chemistry of phosphonates. *Water Research*, 37(11), 2533–2546.
22. Valentim, J. M. B., Coradi, C., Viana, N. P., & Panis, C. (2024). Glyphosate as a food contaminant: Main sources, detection levels and implications for human and public health. [Journal]. Retrieved from PMC.
23. Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2012). DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide: Organ-specific repair response and the role of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 743(1–2), 1–9.
24. Bastos Gonçalves, B., Cardoso Giaquinto, P., dos Santos Silva, D., de Melo e Silva Neto, C., Alves de Lima, A., Antonio Brito Darosci, A.,

- ... Lopes Rocha, T. (2020). Ecotoxicology of Glyphosate-Based Herbicides on Aquatic Environment. IntechOpen.
25. Drewek, A., et al. (2024). Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicides. *Water*, 16(13), 1882.
26. Levine SL, von Mérey G, Minderhout T, Manson P, Sutton P. Aminomethylphosphonic acid has low chronic toxicity to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environ Toxicol Chem*. 2015 Jun;34(6):1382-9.
27. HERA. (2004). Phosphonates – Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products: Full web dossier.
28. Anitha, D. (2024). Environmental chemistry of phosphonates. *International Journal of Science, Engineering and Technology*, 12(2).
29. Zheng T, Jia R, Cao L, Du J, Gu Z, He Q, Xu P, Yin G. Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidant status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2021 Jan;239:108878.
30. Gluszcak L, Miron Ddos S, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MR, Morsch VM, Loro VL. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007 Nov;146(4):519-24.
31. Yan B, Sun Y, Fu K, Zhang Y, Lei L, Men J, Guo Y, Wu S, Han J, Zhou B. Effects of glyphosate exposure on gut-liver axis: Metabolomic and mechanistic analysis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Sci Total Environ*. 2023 Dec 1;902:166062.
32. Li MH, Ruan LY, Zhou JW, Fu YH, Jiang L, Zhao H, Wang JS. Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term

- glyphosate-based herbicide exposure. *Aquat Toxicol.* 2017 Jul;188:159-169.
33. Ma J, Zhu J, Wang W, Ruan P, Rajeshkumar S, Li X. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environ Pollut.* 2019 Sep;252(Pt B):1288-1300.
34. Lopes AR, Moraes JS, Martins CMG. Effects of the herbicide glyphosate on fish from embryos to adults: a review addressing behavior patterns and mechanisms behind them. *Aquat Toxicol.* 2022 Oct;251:106281.
35. Drechsel, V., Kraiss, S., Peschke, K. et al. Glyphosate- and aminomethylphosphonic acid (AMPA)-induced mortality and residues in juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) exposed at different temperatures. *Environ Sci Eur* 36, 30 (2024).
36. Abdelmagid AD, Said AM, Abd El-Gawad EA, Shalaby SA, Dawood MAO. Glyphosate-induced liver and kidney dysfunction, oxidative stress, immunosuppression in Nile tilapia, but ginger showed a protection role. *Vet Res Commun.* 2023 Jun;47(2):445-455.
37. International Journal of Veterinary Science and Medical Diagnosis. (2023). Oxidative stress in *Tilapia guineensis* exposed to glyphosate in the laboratory. *Int J Vet Sci Med Diagn*, 8(2).
38. Tresnakova, N., Stara, A., & Velisek, J. (2021). Effects of Glyphosate and Its Metabolite AMPA on Aquatic Organisms. *Applied Sciences*, 11(19), 9004.
39. Castilhos Ghisi, N. de. (2012). Relationship Between Biomarkers and Pesticide Exposure in Fishes: A Review. *InTech*.
40. Thanomsit, C., Saowakoon, S., Wattanakornsiri, A., & Chalorcharoenying, W. (2020). Glyphosate (Roundup): Fate in aquatic environment, adverse effect and toxicity assessment in aquatic

- organisms. Naresuan University Journal: Science and Technology, (28)1, 65–76.
41. Klátyik, S., Simon, G., Oláh, M. et al. Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to 2023. *Environ Sci Eur* 36, 22 (2024).
42. Haluzová, Ivana, et al. "Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests" *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 4, no. 2, Slovak Academy of Sciences, 2011, pp. 85-89.
43. Grădinariu, L., Crețu, M., Vizireanu, C., & Dediu, L. (2025). Oxidative Stress Biomarkers in Fish Exposed to Environmental Concentrations of Pharmaceutical Pollutants: A Review. *Biology*, 14(5), 472.
44. Sánchez-Nuño, S., Carbonell, T., & Ibarz Valls, A. (2020). Redox Balance Affects Fish Welfare. *IntechOpen*.
45. Oros, A., Coatu, V., Damir, N., Danilov, D., Ristea, E., & Lazar, L. (2025). Molecular Mechanisms and Biomarker-Based Early-Warning Indicators of Heavy Metal Toxicity in Marine Fish. *Fishes*, 10(7), 339.
46. Samanta, P., Kumari, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., & Ghosh, A. R. (2018). Histopathological and Ultrastructural Alterations in Some Organs of *Oreochromis niloticus* Exposed to Glyphosate-based Herbicide, Excel Mera 71. *Journal of microscopy and ultrastructure*, 6(1), 35–43.
47. Dos Santos, A. P. R., Rocha, T. L., Borges, C. L., Bailão, A. M., de Almeida Soares, C. M., & de Sabóia-Morais, S. M. T. (2017). A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 168, 933–943.

48. Olurin, K. B. (2016). Histopathological effect of sub-lethal concentration of aluminum phosphide (Phostoxin) on *Clarias gariepinus* juveniles. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(7), 574–580.
49. Aribisala, O. A., Sogbanmu, T. O., & Kemabonta, K. A. (2022). Genotoxic, biochemical and histological biomarkers of subacute concentrations of paraquat and glyphosate in Nile Tilapia. *Environmental analysis, health and toxicology*, 37(2), e2022012.
50. Kale, O. E., Adebessin, A. N., Kale, T. F., Oladoja, F., Osonuga, I. O., Soyinka, O. O., Uwaezuoke, D., Olajide, O., Akinloye, V., Adedugbe, O., Odibosa, F., Akindele, F., Oladele, B., Wahab, M., & Ebele, C. C. (2023). Effects of glyphosate-based herbicide on gametes fertilization and four developmental stages in *Clarias gariepinus*. *Heliyon*, 9(4), e15048.
51. Acar, Ü., İnanan, B. E., Navruz, F. Z., & Yılmaz, S. (2021). Alterations in blood parameters, DNA damage, oxidative stress and antioxidant enzymes and immune-related genes expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to glyphosate-based herbicide. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 249, 109147.
52. Faria, M., Bedrossiantz, J., Ramírez, J. R. R., Mayol, M., García, G. H., Bellot, M., Prats, E., Garcia-Reyero, N., Gómez-Canela, C., Gómez-Oliván, L. M., & Raldúa, D. (2021). Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. *Environment international*, 146, 106253.
53. Modesto, K. A., & Martinez, C. B. (2010). Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294–299.

54. Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., & Lakra, W. S. (2013). DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2), 539–547.
55. do Carmo Langiano, V., et al. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the freshwater fish's antioxidant system. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 243–253.
56. Гриневич, Н. Є., Слюсаренко, А. О., Хом'як, О. А., Присяжнюк, Н. М., Михальський, О. Р., Трофимчук, А. М., ... & Павуско, З. А. (2021). Іхтіопатологія: методичні вказівки до виконання практичних робіт для студентів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 207 “Водні біоресурси та аквакультура”.
57. Dey, Sukhendu & Samanta, Palas & Pal, Sandipan & Mukherjee, Alope & Kole, Debraj & Ghosh, Apurba. (2016). Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). *Emerging Contaminants* (Elsevier). 2. 191-203.
58. Yang, Z., Zhao, D., Gu, J., Wu, R., Liu, B., Yu, G., Dong, P., Huang, X., Li, M., & Li, G. (2024). Investigation of Biototoxicity and Environmental Impact of Prometryn on Fish and Algae Coexistent System. *Water*, 16(17), 2531.
59. Iummato, María & Sabatini, Sebastián & Cacciatore, Luis & Cochón, Adriana & Cataldo, Daniel & Rios, Maria & Juarez, Angela. (2018). Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*. 163. 69-75.

60. Loro, V. L., Gluszczak, L., Moraes, B. S., Leal, C. A. M., Menezes, C., Murussi, C. R., Leitemperger, J., Schetinger, M. R. C., & Morsch, V. M. (2015). Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Neotropical Ichthyology*, 13(1), 229–236.
61. Abdelmagid, A. D., El Asely, A. M., & Said, A. M. (2021). Evaluation of *Foeniculum vulgare* impact on glyphosate hepato-toxicity in Nile tilapia: Biochemical, molecular and histopathological study. *Aquaculture Research*, 52(11), 5397–5406.
62. Santos, D., Cabecinha, E., Gago, J., Monteiro, S. M., & Luzio, A. (2025). Oxidative Stress, Phytochemical Screening, and Antioxidant Activity on Microalgae (*Arthrospira platensis*) After Exposure to Glyphosate and Microplastics. *Journal of xenobiotics*, 15(4), 106.
63. Lushchak, O. V., Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76(7), 932–937.
64. Obasi, David & Ibiam, Udu & Jennifer, N & Agbo, Ali. (2021). Biochemical Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias Gariepinus*). 4. 1472.
65. 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).
66. Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E. M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O., & Ceyhun, S. B. (2015). Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and

- swimming performance. *Ecotoxicology and environmental safety*, 111, 206–214.
67. Fan, Jinyu & Geng, Jinju & Ren, Hongqiang & Wang, Xiaorong. (2013). Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* exposed to glyphosate and its formulation. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 95. 10.1080/02772248.2013.863889.
68. Tawfeek, W.S., Kassab, A.S., Al-Sokary, E.T. et al. *Chlorella vulgaris* algae ameliorates chlorpyrifos toxicity in Nile tilapia with special reference to antioxidant enzymes and *Streptococcus agalactiae* infection. *Mol Biol Rep* 51, 616 (2024).
69. Juginu, M. S. (2018). Effect of glyphosate on biochemical and haematological parameters in fresh water fish, *Cyprinus carpio*. *Recent Scientific International Journal of Applied Science and Technology*, 3(1), 16–22.
70. Veas, F. (Ed.). (2011). *Acute phase proteins: Regulation and functions of acute phase proteins*. Rijeka, Croatia: InTech.
71. Peyghan, R., Khadjeh, G. H., & Enayati, A. (2014). Effect of water salinity on total protein and electrophoretic pattern of serum proteins of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 5(3), 225–229.
72. Hadwan, Mahmoud & Najm, Hussein. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in Brief*. 6. 194.
73. Sun, M., & Zigman, S. (1978). An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Analytical biochemistry*, 90(1), 81–89.

74. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
75. Mississippi State University Extension. Water quality and herbicide efficacy. Mississippi State University.
76. Lala, V., Zubair, M., & Minter, D. A. (2023). Liver Function Tests. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
77. Інтермедика-Україна. Автоматичний біохімічний аналізатор NTI BioChem FC-200.
78. ТОВ «Фелісіт». (2020). Інструкція до набору реактивів для визначення співвідношення білкових фракцій сироватки крові (REF № НР06.01, ТУ У 24.4-24607793-018:2003). Київ: Фелісіт.
79. Державна санітарна служба; Міністерство охорони здоров'я України. (2001, 20 вересня). Державні санітарні правила та норми ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001. Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті : Правила; № 137 [Законодавство України]. Верховна Рада України.
80. Aktukhanova NR, Seiilbek SN, Zayadan BK, Bolatkhan K, Bakytzhan RA, Domash GS, Bruce BD. Harnessing Microalgae and Cyanobacteria for Sustainable Pesticide Biodegradation: Advances, Challenges, and Ecological Benefits. *Microorganisms*. 2025; 13(10):2404.

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 стакана 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 їдкового 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, вимкнених 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.

18.3 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.