

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

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

**УМІСТ КАЛЬЦІЮ ТА ФОСФОРУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ
РІЗНОВІКОВИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО
УРАЖЕННЯ ДИКВАТОМ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 А групи
Дутчин Марія Василівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,
асистент **Николайчук І.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2025 р.
Зав. кафедрою _____ доц. Волощук О.М.

Чернівці – 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню умісту кальцію та фосфору в сироватці крові різновікових щурів за умов дикват-індукованого ураження.

Встановлено, що надходження токсичних доз промислового ксенобіотика диквату супроводжується зниженням рівня кальцію в сироватці крові щурів підліткового (60 днів) та зрілого (360 днів) віку із розвитком гіпокальціємії.

У 60-денних та 360-денних щурів за умов токсичного ураження гербіцидом дикватом встановлено підвищення рівня фосфору в сироватці крові з розвитком гіперфосфатемії.

Показано, що підліткові та зрілі щури демонструють найбільшу чутливість до змін у кальцієво-фосфорному обміні, що проявляються гіпокальціємією з одночасною гіперфосфатемією.

Ключові слова: кальцій, фосфор, дикват, токсичне ураження, різновікові щури

ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the study of calcium and phosphorus levels in the blood serum of rats of different ages under conditions of diquat-induced toxicity.

It was found that exposure to toxic doses of the industrial xenobiotic diquat is accompanied by a decrease in serum calcium levels in adolescent (60-day-old) and adult (360-day-old) rats, leading to the development of hypocalcemia.

In 60-day-old and 360-day-old rats, under conditions of toxic damage by the herbicide diquat, an increase in serum phosphorus levels with the development of hyperphosphatemia was found.

It has been shown that adolescent and mature rats demonstrate the greatest sensitivity to changes in calcium-phosphorus metabolism, manifested by hypocalcemia with simultaneous hyperphosphatemia.

Key words: calcium, phosphorus, diquat, toxic damage, age-specific rats

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

_____ **М.В. Дутчин**

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Роль кальцій-фосфорного обміну.....	7
1.2. Метаболізм кальцію.....	7
1.3. Метаболізм фосфору.....	9
1.4. Участь нирок, кишківника та кісткової тканини у підтриманні кальцій-фосфорного балансу.....	9
1.5 Вплив токсичних агентів на мінеральний обмін.....	10
1.5.1. Хімічні властивості диквату.....	10
1.6. Токсичний вплив на організми тварин.....	12
1.6.1. Генотоксичність та тератогенність.....	13
1.6.2. Модельні системи вивчення впливу диквату.....	14
1.6.3. Використання щурів як модельних організмів.....	15
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	17
2.1. Об'єкти та методи досліджень.....	17
2.2. Отримання сироватки крові.....	17
2.3. Робота на біохімічному аналізаторі НТІ Biochem FC-120.....	18
2.4. Визначення вмісту фосфору.....	19
2.5. Визначення вмісту кальцію.....	20
2.6. Статистична обробка даних.....	20
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	21
ВИСНОВКИ.....	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	31
ДОДАТКИ.....	34

ВСТУП

Дикват є одним із найпоширеніших контактних гербіцидів та десикантів, що широко застосовуються в сільському господарстві. Його токсичність зумовлена здатністю індукувати оксидативний стрес, під дією якого утворюються активні форми кисню та азоту, що деструктивно впливають на різні біохімічні процеси, до прикладу, мінеральний обмін [1]. Він, зокрема, може спричиняти серйозні порушення функціонування печінки, нирок та нервової системи [2]. Однак його вплив на кальцій-фосфорний баланс у ссавців, зокрема у щурів, досліджено недостатньо, що робить цю тему актуальною для наукового вивчення.

Кальцій-фосфорний обмін є одним із ключових метаболічних процесів в організмі, забезпечуючи структурну міцність кісток, нервово-м'язову провідність, згортання крові та підтримку кислотнолужного балансу [3]. Баланс між кальцієм і фосфором регулюється двома основними механізмами: кістковою резорбцією (руйнуванням старої кісткової тканини остеокластами) та мінералізацією (утворенням нової кістки остеобластами) [4]. Низький рівень кальцію в крові може призводити до остеопорозу, що характеризується зниженням щільності кісток і підвищеною ламкістю [5].

Фосфор є другим за кількістю мінералом після кальцію і входить до складу більшості клітинних структур. Близько 85% фосфору локалізовано в кістках і зубах, де він разом із кальцієм формує мінеральну основу кісткової тканини у вигляді гідроксиапатиту. Окрім цього, фосфор є необхідним компонентом аденозинтрифосфату (АТФ), що забезпечує енергетичний обмін у клітинах, а також бере участь у синтезі нуклеїнових кислот і фосфоліпідів, які є основою клітинних мембран. Вимірювання рівня фосфору в сироватці крові є важливим клінічним показником, що дозволяє оцінити функцію нирок і стан мінерального обміну [6].

Дисбаланс кальцію та фосфору може мати серйозні наслідки для організму, зокрема призводити до патологічних станів, таких як остеопороз, ниркова недостатність та порушення анаболічних і катаболічних процесів. Вплив диквату на кальцій-фосфорний баланс потребує подальших досліджень,

оскільки його здатність спричиняти оксидативний стрес може мати значний вплив на організм ссавців.

Метою даної роботи стало дослідження вмісту кальцію та фосфору в сироватці крові щурів за умов токсичного ураження дикватом.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль кальцій-фосфорного обміну

Обмін кальцію та фосфору відіграє важливу роль у підтримці численних фізіологічних функцій людського організму, зокрема у здоров'ї кісткової системи та мінеральному гомеостазі. Кальцій і фосфор є двома найпоширенішими мінералами в організмі: приблизно 99% кальцію і 85% фосфору зберігаються в кістках у вигляді гідроксиапатиту – кристалічної структури, що забезпечує міцність і стабільність скелетної системи [7]. Складна взаємодія між цими елементами, що регулюється різними гормонами, є критичною для таких процесів, як скорочення м'язів, клітинна сигналізація та вироблення енергії, що підкреслює значення збалансованого рівня мікро- та макроелементів для загального здоров'я [8].

Гормональна регуляція є ключовим аспектом метаболізму кальцію та фосфору, в основному залучаючи паратгормон, кальцитонін, вітамін D і фібробластний фактор росту 23 (FGF23). Паратгормон підвищує рівень кальцію в сироватці, мобілізуючи його з кісток, а також збільшуючи всмоктування в кишечнику та нирках, тоді як FGF23 сприяє екскреції фосфатів для підтримки балансу з рівнем кальцію [9]. Порушення цієї тонко налаштованої системи може мати серйозні наслідки для здоров'я, включаючи метаболічні порушення кісткової тканини та серцево-судинні ускладнення, особливо у пацієнтів із хронічною хворобою нирок (ХХН), які зазнають змін у мінеральному метаболізмі [7, 8, 10]. Зокрема, такі стани, як гіперфосфатемія, що виникає через порушення виведення фосфору, становлять значний ризик для пацієнтів із ХХН, оскільки призводить до судинного кальцинозу та підвищенню рівня смертності [7, 8].

1.2. Метаболізм кальцію

Обмін кальцію відіграє важливу роль у різних фізіологічних функціях організму, оскільки кальцій є найпоширенішим елементом. Понад 99% загального кальцію міститься в кістках у вигляді гідроксиапатиту $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, забезпечуючи структурну підтримку та слугуючи

резервуаром для підтримки рівня кальцію в крові [7]. Лише близько 1% кальцію знаходиться в позаклітинних рідинах, а його внутрішньоклітинні концентрації підтримуються на дуже низькому рівні [7, 10].

Гормональна регуляція значною мірою впливає на метаболізм Са. Паратгормон (ПТГ) підвищує рівень кальцію в сироватці крові шляхом стимуляції його вивільнення з кісток, збільшення реабсорбції у ниркових каналцях і посилення кишкового всмоктування завдяки активації вітаміну D [9]. І навпаки, коли рівень кальцію підвищується, щитоподібна залоза секретує кальцитонін, який інгібує активність ПТГ, зменшуючи вивільнення кальцію з кісток і підвищуючи його екскрецію із сечею [7]. Крім того, фібробластний фактор росту 23 (FGF23) визнаний ключовим регулятором обміну фосфору та кальцію. Підвищений рівень активної форми вітаміну D (1,25(OH)₂D) сприяє секреції FGF23, створюючи негативний зворотний зв'язок, який підтримує баланс фосфору та впливає на синтез ПТГ [9, 10].

Регуляція рівня кальцію передбачає баланс між всмоктуванням у тонкому кишечнику, обміном між позаклітинною рідиною та кістками, а також виведенням через нирки. Ефективність всмоктування кальцію обернено пропорційна його споживанню: при низькому надходженні кальцію організм посилює його всмоктування для підтримки гомеостазу [10]. Цей динамічний обмін відіграє критичну роль у ремоделюванні кісткової тканини, дозволяючи швидко мобілізувати кальцій за потреби [7]. Порушення обміну кальцію можуть спричиняти різні клінічні стани.

Наприклад, псевдогіпарпаратиреоз (ПГП) характеризується резистентністю до паратгормону через інактивуючі мутації в гені *gnas*, що впливає на гомеостаз кальцію та фосфору і призводить до характерних фенотипових ознак, таких як низький зріст і брахідактилія [10].

Розуміння складного балансу обміну кальцію та його гормональної регуляції є необхідним для діагностики та лікування метаболічних захворювань кісток.

1.3 Метаболізм фосфору

Фосфор є другим за поширеністю елементом у людському організмі після кальцію і відіграє ключову роль у різних фізіологічних процесах. Близько 85% фосфору міститься у кістках і зубах, переважно у вигляді гідроксиапатиту, тоді як решта знаходиться у м'яких тканинах і позаклітинних рідинах [7].

Фосфор необхідний для численних біологічних процесів, включаючи скорочення м'язів, клітинну сигналізацію та стабілізацію клітинних мембран [8, 9]. Він є складовим компонентом у процесах синтезу ДНК та РНК, що є важливим для росту, підтримки та відновлення тканин і клітин. Крім того, фосфор відіграє значну роль у збереженні та використанні енергії в організмі, сприяючи метаболічним процесам, які беруть участь в процесі синтезу аденозинтрифосфату (АТФ) для безлічі клітинних функцій [7, 8].

Рівень фосфору в плазмі підтримується за рахунок всмоктування фосфатів у кишечнику та реабсорбції у нирках. Ці процеси регулюються натрій-залежними фосфатними котранспортерами (Na^+/P_i -котранспортерами), що належать до родин генів *slc34* та *slc20* [8, 9]. Гормональні фактори також впливають на обмін фосфору; наприклад, фібробластний фактор росту 23 (FGF23) регулює екскрецію фосфатів і пригнічує синтез активного вітаміну D, тоді як паратгормон (ПТГ) може стимулювати вироблення FGF23 [10, 9].

Недостатнє споживання фосфору може призвести до гіпофосфатемії, що характеризується зниженням рівня фосфатів у крові, що, у свою чергу, може викликати м'язову слабкість, біль у кістках і порушення клітинних функцій [6]. Забезпечення відповідного рівня фосфору є необхідним для підтримки загального здоров'я та підтримки метаболічних процесів організму.

1.4 Участь нирок, кишківника та кісткової тканини у підтриманні кальцій-фосфорного балансу

Нирки регулюють виведення кальцію та фосфору з сечею, забезпечуючи їх реабсорбцію або екскрецію залежно від потреб організму. Під впливом ПТГ збільшується реабсорбція кальцію та зменшується реабсорбція фосфору. Активується вітамін D, що сприяє всмоктуванню кальцію в кишківнику.

Кишківник у свою чергу, забезпечує всмоктування кальцію та фосфору з їжі. Під впливом вітаміну D збільшує всмоктування кальцію.

Кісткова тканина слугує депо кальцію та фосфору, звідки вони можуть вивільнятися або накопичуватися залежно від потреб організму. Остеокласти руйнують кісткову тканину, вивільняючи кальцій та фосфор у кров. Остеобласти будують нову кісткову тканину, використовуючи кальцій та фосфор з крові.

Ці три органи тісно взаємодіють, щоб підтримувати оптимальний баланс кальцію та фосфору в організмі ссавців, забезпечуючи його нормальне функціонування [8].

1.5. Вплив токсичних агентів на мінеральний обмін

Токсичні речовини можуть викликати дисбаланс мікро- та макроелементів у організмі, і це в свою чергу може знижувати рівень кальцію та фосфору. Токсичні речовини, що порушують метаболізм кальцію та фосфору, становлять серйозну проблему для здоров'я живих організмів через їхню широку поширеність у довкіллі та потенційну здатність спричинити значні негативні наслідки для здоров'я. До таких речовин належать важкі метали, а також стійкі органічні забруднювачі та інші хімічні контамінанти. Основні механізми токсичного впливу цих речовин включають гормональні порушення, оксидативний стрес та втручання в засвоєння поживних речовин. Токсиканти можуть порушувати гормональну регуляцію гомеостазу кальцію та фосфору, що призводить до дисбалансу їхнього засвоєння та підвищеного ризику метаболічних розладів [11]. Розуміння механізмів, через які ці токсичні агенти впливають на гомеостаз життєво важливих мінералів, є критично важливим для мінімізації їхнього негативного впливу на здоров'я людини та довкілля [8, 12].

1.5.1. Хімічні властивості диквату

Дикват, хімічно відомий як дикват дибромід, є органічним дикатионом, що характеризується унікальними фізико-хімічними властивостями. Його

молекулярна маса становить 344,1 г/моль, а температура розкладу приблизно 335°C (635°F), при якій він розкладається, а не плавиться [13].

Сполука має високу розчинність у воді (700 г/л при 20°C) і певну розчинність у спиртах та гідроксильних розчинниках, проте практично не розчиняється в неполярних органічних розчинниках. Тиск насиченої пари диквату надзвичайно низький (<0,00001 мм рт. ст.), що означає, що він не випаровується легко та незначно поширюється у повітрі, зменшуючи ризик дрейфу під час обприскування [13]. Дикват є стабільним у нейтральних і кислих середовищах, але може гідролізуватися в присутності лужних матеріалів, що впливає на його гербіцидну активність і стійкість у навколишньому середовищі. Його стійкість і токсичність у довкіллі можуть змінюватися під впливом різних факторів, зокрема температури води, вологості ґрунту та рівня рН, що впливає на біодоступність речовини та її потенційну токсичність як для цільових, так і для нецільових організмів.

Дикват — це неселективний біпіридиновий гербіцид, структурно схожий на паракват, який широко застосовується для боротьби з бур'янами в сільському господарстві [14]. Він відомий своєю швидкою дією та ефективністю проти широкого спектра рослинних видів. Однак токсичність диквату викликає серйозні занепокоєння щодо його впливу на здоров'я людини та довкілля, особливо у випадках випадкового контакту або неправильного використання.

Токсикологічні ефекти диквату були детально вивчені, зокрема щодо його біодоступності та механізмів впливу на біологічні системи. Дослідження свідчать, що дикват може викликати оксидативний стрес, збільшуючи рівень активних форм кисню (АФК) та малонового діальдегіду (MDA), а також одночасно знижуючи активність антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза (SOD) і каталаза (CAT) [7, 15]. Дикват становить найбільшу загрозу для водних організмів. Дослідження показують, що він викликає оксидативний стрес, що призводить до нейротоксичних ефектів у різних видів [15]. Зокрема, дикват характеризується високою токсичністю для водних рослин, які є безпосередньо мішенню його гербіцидної дії.

Оксидативний стрес у свою чергу спричиняє фізіологічні порушення у рослин, зокрема зниженню вмісту хлорофілу та збільшення пероксидного окислення ліпідів [14]. Вплив диквату на нецільові водні організми може спричинити деградацію середовища існування та скорочення харчових ресурсів, що, зрештою, порушує екологічну рівновагу.

Вплив гербіциду пов'язаний із серйозною системною токсичністю і в організмах тварин, що вражає різні органи, зокрема шлунково-кишковий тракт, нирки та печінку [15]. Взаємодія диквату з іншими забруднювачами навколишнього середовища може посилювати його токсичні ефекти, ускладнюючи оцінку ризиків та підкреслюючи необхідність комплексного екологічного моніторингу [14].

1.6. Токсичний вплив на організми тварин

Гістопатологічне дослідження печінки у контрольних та оброблених дикватом тварин показало відсутність значних патологічних змін у контрольній групі, тоді як у групі, що зазнала впливу диквату, спостерігалися виражені порушення. У клітинах печінки качок відзначалися вакуолізація та жирове переродження, що вказує на потенційні порушення жирового обміну внаслідок експозиції дикватом [7]. Крім того, ураження дикватом асоціюється з оксидативним стресом, що проявляється підвищеною активністю каспаз та зміненим співвідношенням Вах/Bcl-2, яке спричиняє апоптоз клітин печінки. До того ж контакт із дикватом може спричинити значні порушення функціонування мітохондрій у різних типах клітин, зокрема у гепатоцитах [16].

Вплив цього гербіциду може спричинити також ураження шлунково-кишкового тракту, що проявляється тяжкою анорексією та розширенням кишечника. Споживання диквату у різних тварин пов'язане з пошкодженням кількох органів, особливо нирок, легень і серця, а у важких випадках може призводити до системної токсичності та органної недостатності.

Дикват також має нейротоксичні властивості, зокрема через утворення АФК, що спричиняє посилене перекисне окислення ліпідів та дегенерацію аксонів у нервових тканинах [7].

Довготривала дія диквату продемонструвала негативний вплив на репродуктивне здоров'я, знижуючи якість статевих клітин і впливаючи на ранній ембріональний розвиток в експериментальних моделях. А довготривалий вплив асоційований з формуванням катаракти у щурів і собак, що підкреслює потенційні довготривалі ризики, пов'язані з дикватом [1].

1.6.1. Генотоксичність та тератогенність

Дослідження, проведені на модельних організмах, таких як *Xenopus laevis* та *Danio rerio*, продемонстрували важливі дані про мутагенні властивості диквату, зокрема його здатність пошкоджувати ДНК, зокрема спричиняти утворення дволанцюгових розривів. Ця речовина пов'язана з низкою шкідливих біологічних ефектів, включаючи цитотоксичність, генотоксичність, мутагенність і канцерогенність. Мутагенність і генотоксичність часто взаємопов'язані; при впливі мутагенних агентів, таких як дикват, клітини можуть зазнавати селективного тиску, що призводить до реверсійних мутацій, підкреслюючи його здатність індукувати генетичні зміни [1]. Дослідження [17] також підтверджує, що дикват має цитотоксичні, генотоксичні та мутагенні властивості. Ці механізми підкреслюють мутагенний вплив диквату, оскільки оксидативний стрес є відомим фактором, що сприяє мутагенезу шляхом безпосереднього пошкодження ДНК або утворення ДНК-аддуктів [1].

Крім того, токсичні ефекти диквату посилюються у присутності інших забруднювачів довкілля. Дослідження [16] показало, що одночасний вплив гербіцидів, таких як триазини, може підвищувати токсичність органофосфатних інсектицидів, що вказує на складну взаємодію між різними класами токсикантів. Використання модельних організмів у дослідженнях токсичності диквату допомогло розкрити механізми його шкідливого впливу, що має вирішальне значення для розробки стратегій мінімізації ризиків, пов'язаних із його застосуванням у сільському господарстві та промисловості [1].

1.6.2. Модельні системи вивчення впливу диквату

Модельні системи відіграють важливу роль в оцінці токсичних, мутагенних та тератогенних ефектів різних речовин, зокрема диквату. Однією з найважливіших моделей, що використовується у цих дослідженнях, є *Xenopus laevis* – вид жаби, який широко застосовується в біологічних експериментальних дослідженнях.

Xenopus laevis має низку переваг, що роблять його ідеальним об'єктом для вивчення біології розвитку та токсикології. *Xenopus laevis* можна легко отримати у спеціалізованих постачальників, а також розводити у великих обсягах у лабораторних умовах, що сприяє масштабним експериментам [14, 1]. До того ж самки можуть бути індуковані до нересту кілька разів на рік, що забезпечує постійний запас ембріонів, необхідний для досліджень розвитку та токсикологічних тестів [14, 1]. Порівняно великий розмір ооцитів *Xenopus* (~1,0–1,3 мм у діаметрі) дає змогу легко маніпулювати ними перед заплідненням. Крім того, самки виділяють значну кількість ооцитів, що робить можливою *in vitro*-фертилізацію [1]. А завдяки зовнішньому заплідненню та ембріональному розвитку *Xenopus laevis*, вчені можуть спостерігати та аналізувати розвиток на всіх стадіях, що дає змогу досліджувати вплив довкілля на онтогенез [1]. Ранній ембріональний розвиток *Xenopus laevis* відбувається дуже швидко – від запліднення до стадії пуголовка проходить приблизно чотири дні при температурі 22–24 °С. Це дозволяє швидко проводити експерименти та оцінювати токсичний вплив речовин на розвиток [14].

Одним із ключових застосувань моделі *Xenopus* у токсикології є тест FETAX, який розроблено для оцінки тератогенного потенціалу хімічних речовин, включаючи дикват. Цей біоаналіз використовує ембріони *Xenopus laevis* для дослідження впливу токсичних речовин на ранній розвиток, що робить його потужним та гнучким інструментом у дослідженнях екологічної та розвитку токсикології [14].

1.6.3. Використання щурів як модельних організмів

Щури є популярними в біомедичних дослідженнях завдяки їхній фізіологічній та генетичній подібності до людини, а також їхній здатності надавати цінні дані про вплив на здоров'я людини. Крім того, спільний генетичний склад між людьми та щурами (приблизно 99% генів) підвищує значущість отриманих результатів, особливо у токсикології та оцінці безпеки лікарських засобів [18].

Важливість використання моделей щурів у дослідженні диквату зумовлена широким застосуванням цього гербіциду в сільському господарстві. Дослідження показують, що дикват може мати серйозні наслідки для здоров'я, в першу чергу вражаючи очі, нирки та печінку, і таким чином ймовірно викликати такі стани, як катаракта та ниркова дисфункція [19].

Щури мають певні переваги в різних сферах досліджень. Вони широко застосовуються у токсикології, тератології, ендокринології, онкології, неврології, серцево-судинних дослідженнях та експериментальній геронтології. Їхній більший розмір тіла та органів дозволяє проводити складні процедури, такі як багаторазовий відбір проб, *in vivo* електрофізіологію та передові хірургічні техніки, включаючи нейрохірургію та нейровізуалізацію. Останні досягнення у технології редагування генів ще більше зміцнили роль щурів у вивченні ефективності та безпеки лікарських засобів, часто забезпечуючи більш точні результати порівняно з традиційними мишачими моделями. Їхні когнітивні здібності також роблять їх придатними для досліджень поведінкових розладів, таких як залежність, оскільки рівень їх інтелекту перевищує рівень інтелекту мишей.

Великий обсяг фундаментальних досліджень фізіології щурів і механізмів розвитку хвороб дає змогу ефективніше розробляти та тестувати нові терапії, які більш точно відтворюють патології людських захворювань[20].

Щури відіграли вирішальну роль у вивченні впливу диквату, широко використовуюваного гербіциду, через різні експериментальні дослідження, які пролили світло на його токсикологічні ефекти.

Кілька досліджень розглядали репродуктивну та розвиткову токсичність, пов'язану з впливом диквату на щурів. Одне з ключових відкриттів [18] показало, що не було чіткої асоціації між пероральним впливом диквату та несприятливими репродуктивними наслідками у щурів, навіть при дозах до 25 мг/кг/день протягом кількох поколінь. Ці результати були підтвержені дослідженнями, які не виявили значних впливів на репродуктивну функцію у щурів, які отримували дикват у контрольованих умовах. Однак вищі дози, введені через шлунковий зонд вагітним щурам, а також іншим видам, таким як миші та кролі, свідчили про певні тератогенні ефекти, хоча вони спостерігалися переважно при найвищих досліджених дозах, що вказує на відсутність підвищеної чутливості у потомства.

Щури також використовувалися для оцінки нейроповедінкової токсичності, пов'язаної з впливом диквату. Дослідження [2], присвячене нейроповедінковим впливам суміші пестицидів, що містить дикват, показало значні зміни у рівні дослідницької активності та тривожності у щурів. Крім того, були виявлені симптоми, такі як депресія та втрата апетиту, що ще більше сприяє розумінню впливу диквату на неврологічне здоров'я.

Окрім поведінкових оцінок, гістопатологічні дослідження на щурах відіграли ключову роль у виявленні внутрішніх наслідків впливу диквату. Були зафіксовані патологічні ураження в різних органах, включаючи печінку та легені, демонструючи широкий спектр гістопатологічних змін після введення диквату [21].

Такі результати є надзвичайно важливими для розуміння загальних наслідків токсичності диквату для здоров'я тварин і потенційних ризиків для людей через вплив на довкілля. Ці дослідження ще раз підтверджують роль щурів як важливих модельних організмів у токсикологічних дослідженнях, надаючи критично важливі дані для регуляторних органів щодо встановлення параметрів безпеки та терапевтичних рекомендацій, пов'язаних із впливом диквату.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи досліджень

Для здійснення експерименту використовували білих безпородних щурів вагою від 110 до 130 г і віком від 2 до 12 місяців. Впродовж дослідів щури перебували в пластикових клітках із вільним доступом до питної води та з піщаною підстилкою. Тварини отримували стандартний раціон віварію.

Маніпуляції на експериментальних тваринах проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», прийнятих на 7-й Національній конференції з біоетики та відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей».

Моделювання гострого токсичного ураження дикватом проводили шляхом внутрішньочеревно (інтраперитонеально) одноразово в дозі 115,5 мг/кг маси тіла відповідно до опублікованих даних [18]. Розчин готували на основі фізіологічного розчину (0,9% NaCl). Тварини були попередньо зважені для точного розрахунку дози.

У ході проведення експерименту тварин поділили на дві групи:

1 – здорові щури (контрольна група).

2 – щури, яким моделювали гостре токсичне ураження дикватом.

Оцінку вмісту кальцію та фосфору в сироватці крові здійснювали на щурах трьох вікових груп: 60, 150 та 360 днів.

Умертвіння тварин проводили під легким ефірним наркозом.

2.2. Отримання сироватки крові

Щоб отримати сироватку з крові, відбирали кров у щурів з печінкової вени та поміщали в центрифужні пробірки. Тоді задля кращої ретракції тромба пробірки з кров'ю витримували протягом 30 хвилин за температури 37°C. Після цього сироватку відокремлювали методом центрифугування зразків при 3000 об/хв впродовж 15 хвилин. Відділену сироватку одразу використовували для аналізу.

2.3. Робота на біохімічному аналізаторі НТІ Biochem FC-120

Дослідні зразки аналізували та вимірювали на автоматичному біохімічному аналізаторі НТІ Biochem FC-120 (США). Аналізатор знаходиться на базі кафедри біохімії та біотехнологій, Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича.

На початку роботи з аналізатором увімкнули джерела безперебійного живлення. Після приєднання аналізатора до мережі, його увімкнули кнопкою на бічній панелі приладу. Після запуску приладу, автоматично почало запуск програмне забезпечення Biochem FC-120, і система відкрила вікно вибору користувача. Одразу після цього вибирали ім'я користувача, на клавіатурі водили пароль, тоді для входу в систему користувача – натиснули кнопку «ЛОГІН». Після входу система автоматично налаштувалась та ініціалізувалась.

Попередньо до початку роботи ми перевірили розміщення та наповнення ємності з дистильованою водою. Перевірили також, щоб трубка для забору дистилляту була не заблокована, не зігнута і не перекручена для презперевного та точного аналізу. Надалі ми зробили заміну сегментів кювет з 1 по 9 . Після кожної заміни натиснули кнопку «ОК». Після того як замінили кювети ми провели стабілізацію лампи і розпочали тест лише тоді, як у верхній частині екрану відобразилось «ГОТОВО». Згодом після проведених маніпуляцій у аналізатор встановили диск з реагентами, який попередньо був охолоджений і тоді витриманий при кімнатній температурі впродовж 20 хвилин. Для правильного встановлення диска з реагентами, потрібно тримати вертикально ручку, вирівняти маркер в центрі диска з маркером на роторі та опустити диск з реагентами до упору. Реактиви кальцію та фосфору, зберігали за кімнатної температури та встановлювали у правильне положення на диску окремо. Після цього в мікропробірки у відповідні положення на диску додавали 300 мікролітрів сироватки крові, попередньо заморожену перед початком роботи. Одразу після внесення сироватки переходили до екрану аналізатора та натискали стилусом кнопку «ЗАПИТ» у головному меню, щоб відкрити вікно «ПАРАМЕТРИ» зразка. Тоді встановлювали необхідні

параметри: Диск зразків → Диск 1 та вказували позицію зразка: позиція → 1. Надалі вказується тип зразка: «ЗВИЧАЙНИЙ», і ставимо галочку (•). Вказуємо тип проби: сироватка. Вибираємо тести, які потрібно виконувати: кальцій і фосфор, далі натискаємо кнопку «ЗБЕРЕГТИ». Аналогічні операції проводились і для інших зразків сироватки крові. Натиснули клавішу «СТАТУС» для перегляду кожної тестової пробірки, кювет, флаконів із реагентами. Потім натиснули «СТАРТ», вибрали сортування «За тестами», видалили відмітку «Перевірити рівень реагентів» після чого натиснули «ТАК». Прилад розпочав роботу, а у верхньому полі вікна було зазначено час аналізу зразків. Коли тестування дослідних зразків завершилось, на головному екрані вибрали клавішу «РЕЗУЛЬТАТИ» та роздрукували отримані дані.

2.4. Визначення вмісту фосфору

Для визначення концентрації фосфору в сироватці крові щурів було використано автоматичний біохімічний аналізатор НТІ Biochem FC-120 (США), який забезпечує високоточне та стандартизоване вимірювання біохімічних показників.

Аналіз проводили з використанням комерційного набору реагентів виробництва High Technology Inc. (США). Вимірювання концентрацій здійснювалося у фотометричному режимі відповідно до інструкції виробника.

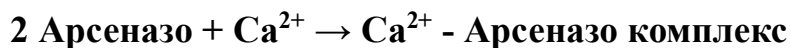
Фосфор визначали прямим методом визначення неорганічного фосфату. Принцип методу полягає в тому, що неорганічний фосфат взаємодіє з молібдатом амонію в кислому середовищі з утворенням пофарбованого в жовтий колір фосфомолібденового комплексу, що має поглинання при 340 нм. Поглинання при даній довжині хвилі прямо пропорційно концентрації неорганічного фосфору в зразку.

Визначення проводили при температурі реакції 37°C (автоматично підтримується аналізатором). Кожен зразок аналізувався в подвійному повторі.

2.5. Визначення вмісту кальцію

Для визначення концентрації кальцію в сироватці крові щурів було використано автоматичний біохімічний аналізатор HTI Biochem FC-120 (США), який забезпечує високоточне та стандартизоване вимірювання біохімічних показників. Аналіз проводили з використанням комерційного набору реагентів виробництва High Technology Inc. (США). Вимірювання концентрацій здійснювалося у фотометричному режимі відповідно до інструкції виробника.

Кальцій визначали колориметричним методом з арсеназо III при довжині хвилі ~ 650 нм. Співвідношення кальцію і барвника для утворення комплексу: одна частина зразка на 100 частин реагенту. Зміна поглинання при 650 (600-670) нм прямо пропорційно концентрації кальцію в зразку.



Синьо-фіолетове забарвлення стає рожевим

2.6. Статистична обробка даних

Статистичний аналіз результатів експерименту здійснювали за допомогою табличного редактора Microsoft Excel на персональному комп'ютері. У програмному середовищі проводили розрахунок середніх арифметичних значень, на основі яких будували графіки. Для оцінки достовірності відмінностей між групами застосовували методи варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично достовірною при значенні ймовірності $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У цьому розділі представлені результати експериментального дослідження впливу диквату на кальцій-фосфорний обмін у щурів. Модель отруєння дикватом у щурів була створена шляхом одноразового введення гербіциду через зонд. Аналіз проводився за двома основними показниками: концентрація кальцію та фосфору в сироватці крові тварин контрольних та дослідних груп певного віку.

Дикват (1,1-етилен-2,2-біпіридилій) — це широко використовуваний агрохімікат, токсичність якого спричиняє пошкодження численних тканин, включно з легенями, печінкою, нирками та головним мозком [5]. Дикват, сполука з редокс-циклом, спричиняє системну токсичність через посилене утворення вільних радикалів. *In vitro* дослідження показали, що ці сполуки є потужними генераторами активних форм кисню (АФК) завдяки редокс-циклу і у свою чергу призводять до перекисного окиснення ліпідів та решти супутніх пошкоджень спричинених оксидативним стресом [12]. Нирки є одним із основних органів-мішеней при отруєнні дикватом. У дослідженні [22] у щурів із гострим отруєнням дикватом було зафіксовано суттєве порушення функції нирок за короткий проміжок часу, при цьому показники функції нирок – азот сечовини у крові та креатинін – були значно вищими у групі впливу порівняно з контрольною групою [23].

Дослідження рівнів кальцію та фосфору в крові є важливим індикатором метаболічного та функціонального стану кісткової, ниркової та ендокринної систем, які особливо чутливі до оксидативного стресу. Дикват, як потужний прооксидант, спричиняє генерацію активних форм кисню, що запускає каскад ушкоджень клітинних мембран, порушує іонний транспорт, а також змінює функцію нефронів – основного місця регуляції кальцій-фосфатного балансу.

Умови токсичного ураження дикватом можуть призводити до: зниження реабсорбції кальцію в нирках, порушення виведення фосфору, дисбалансу вітаміну D₃, що регулює всмоктування обох елементів у кишечнику, вторинного гіперпаратиреозу як компенсаторної реакції.

Особливу цінність має аналіз цих змін у тварин різного віку, оскільки з віком змінюється як активність кальцій-фосфатного обміну, так і чутливість тканин до оксидативного стресу. Молоді організми можуть мати ефективніші антиоксидантні системи та кращу регенеративну здатність, тоді як у зрілих щурів зростає ризик метаболічних ускладнень.

Таким чином, визначення рівнів кальцію та фосфору у різновікових тварин за умов дикват-індукованого ураження дозволяє: виявити порушення електролітного гомеостазу, оцінити ступінь нефро- та гепатотоксичності, визначити вікові особливості адаптаційних реакцій.

Ці показники можуть бути використані як чутливі біомаркери токсичного навантаження, що має практичне значення для розробки захисних стратегій та оцінки ризиків при контакті з гербіцидами

Кальцій – один із найважливіших макроелементів в організмі, що відіграє ключову роль у мінералізації кісткової тканини, скороченні м'язів, передаванні нервових імпульсів та підтримці клітинного метаболізму. Його баланс підтримується складною системою гормональної регуляції, яка включає паратгормон, кальцитонін та активну форму вітаміну D [24]. Однак токсичний вплив зовнішніх факторів може викликати порушення кальцієвого обміну.

Результати проведених нами досліджень показали, що зміни рівня кальцію в сироватці крові різновікових щурів відбуваються лише в тварин 60-денного та 360-денного віку зі зниженням даного показника порівняно з контролем (рис. 3.1). Натомість у тварин віком 150 днів рівень кальцію у дослідній групі не відрізнявся від контрольної. Це може свідчити про відносну стійкість або компенсаторні можливості організму щурів у цьому віковому періоді, що дозволяє зберігати стабільний кальцієвий обмін навіть за токсичного впливу.

З огляду на отримані результати, можна припустити, що зниження рівня кальцію у щурів 60-денного віку (підліткові) при токсичному ураженні промисловим ксенобіотиком може бути викликане кількома механізмами:

через пригнічення активності вітаміну D, що особливо можливе у молодих щурів, що призводить до зниження абсорбції кальцію в кишечнику [25].

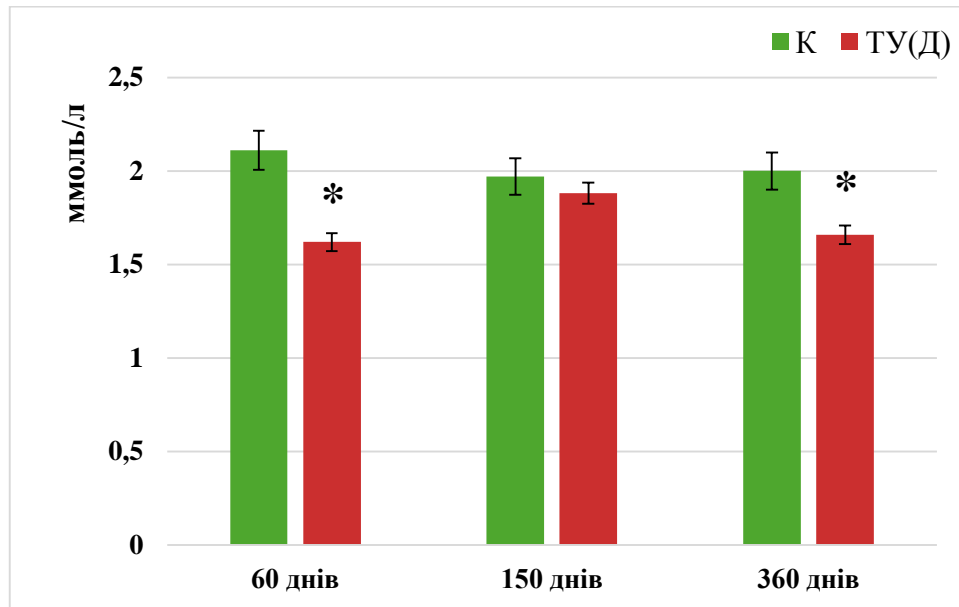


Рис. 3.1. Вміст кальцію в сироватці крові щурів за умов токсичного ураження дикватом

*Примітка: К – контроль, ТУ(Д) – тварини, яким моделювали токсичне ураження дикватом; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.*

Роль вітаміну D₃ у підтриманні метаболічного балансу, зокрема кальцій-фосфорного обміну, вивчається в контексті різних патологічних станів, включно з токсичним ураженням печінки, кишечника та нирок. Особливу увагу в останні роки приділяють його здатності зменшувати оксидативний стрес та регулювати запальні процеси.

У дослідженні [26] оцінювали вплив різних доз вітаміну D₃ на стан птахів, яким внутрішньочеревно вводили дикват – потужний індуктор оксидативного стресу. Як наслідок, додавання вітаміну D₃ зменшувало втрату ваги та покращувало забійний вихід, спостерігалось покращення рівню рН м'язів після забою. До того ж ведення вітаміну зменшувало пошкодження печінки, кишечника та м'язової тканини, стимулювало розвиток селезінки як імунного органу та підвищувало рівень антиоксидантів у сироватці крові, печінці та тонкому кишечнику.

Вітамін D₃ реалізує свою дію через активацію рецептора вітаміну D (VDR). Дослідження показують, що у пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника та раком ободової кишки відзначають знижений рівень VDR [27], що свідчить про його значення у формуванні імунної відповіді. Через взаємодію з VDR вітамін D₃ регулює синтез прозапальних та протизапальних цитокінів: пригнічує IL-1 β , IL-6, TNF- α – ключові медіатори запалення [18] та стимулює IL-10 – протизапальний інтерлейкін [18].

У дослідженні [26] після введення диквату у курей значно підвищувалися рівні IL-1 β , IL-6, TNF- α і IL-10, що свідчило про активну запальну відповідь. Однак добавка VD₃ сприяла зниженню IL-1 β , IL-6 і TNF α , одночасно підвищуючи рівень IL-10, причому ефект був дозозалежним.

Подібні результати отримали [18] у дослідженні на щурах, де оксидативний стрес індукувався діетилнітрозаміном. Дієта з вітаміном D₃ сприяла зниженню рівнів IL-1 β , IL-6 та TNF- α [15]. Також у бройлерів, що зазнавали теплового стресу, додавання 25-ОН-D₃ знижувало рівень TNF- α [25].

Ще один вагомий чинник – нефротоксичність, що призводить до втрати кальцію із сечею, тому порушення фільтрації та реабсорбції кальцію в ниркових каналцях сприяє розвитку гіпокальціємії. Також метаболічний ацидоз призводить до вимивання кальцію з кісток у кров, але при цьому порушується його нормальне використання клітинами, що спричиняє вторинний дефіцит [28].

Водночас зниження рівня кальцію в сироватці крові у щурів зрілого віку після токсичного ураження дикватом може бути наслідком комплексного порушення регуляторних механізмів кальцій-фосфатного обміну, викликаного оксидативним стресом.

Дикват, як потужний індуктор активних форм кисню (АФК), спричиняє ушкодження клітинних мембран, ендотелію судин, а також порушує функцію ниркових каналців, відповідальних за реабсорбцію кальцію. В умовах оксидативного стресу можливе: зниження активності кальційзв'язувальних білків, що порушує транспорт і утримання кальцію в крові; зменшення синтезу активної форми вітаміну D₃ (кальцитріолу) в нирках, що знижує кишкову

абсорбцію кальцію; підвищення екскреції кальцію із сечею внаслідок ушкодження проксимальних каналців; порушення функції паращитовидних залоз, що регулюють кальцієвий гомеостаз через паратгормон [12, 23, 4].

У зрілому віці ці ефекти посилюються внаслідок вікової недостатності компенсаторних систем, зниження функціональної активності нирок і зменшення ефективності антиоксидантного захисту. Це робить організм більш вразливим до порушень мінерального обміну під впливом токсичних агентів.

Таким чином, зниження вмісту кальцію після дії диквату у щурів зрілого віку може розглядатися як чутливий індикатор нефротоксичності та метаболічної дестабілізації, спричиненої оксидативним стресом.

Такі вікові відмінності у чутливості до дії диквату можуть бути пов'язані з особливостями метаболізму у різні періоди онтогенезу, підвищеною активністю антиоксидантних систем у репродуктивних особин, ефективністю гормональної регуляції (ПТГ, кальцитонін, вітамін D, FGF23), а також функціональним станом нирок і кишківника. Це у свою чергу може свідчити про те, що вплив диквату має вікову залежність – підліткові (60 днів) та зрілі (360 днів) тварини виявляються більш чутливими до токсичної дії промислового ксенобіютика диквату.

Отже, за умов токсичного впливу диквату зниження рівня кальцію в сироватці крові відбувається лише у тварин 60-денного (підліткового) та 360-денного (зрілого) віку. Такий характер змін може свідчити про знижену ефективність компенсаторних механізмів підтримання електролітного гомеостазу в зазначені вікові періоди.

Водночас на тлі зниження вмісту кальцію в сироватці крові щурів 60-денного та 360-денного віку за умов токсичного ураження дикватом спостерігається зростання концентрації фосфору порівняно зі значеннями контролю (рис. 3.2).

У щурів 60-денного віку, які перебувають на етапі активного постнатального росту, фосфатно-кальцієвий гомеостаз є особливо чутливим до зовнішніх порушень. Ураження гербіцидом дикватом, що супроводжується

гіпокальціємією, може запускати каскад компенсаторних, ендокринних та нефротоксичних змін, що призводять до підвищення рівня фосфору в крові.

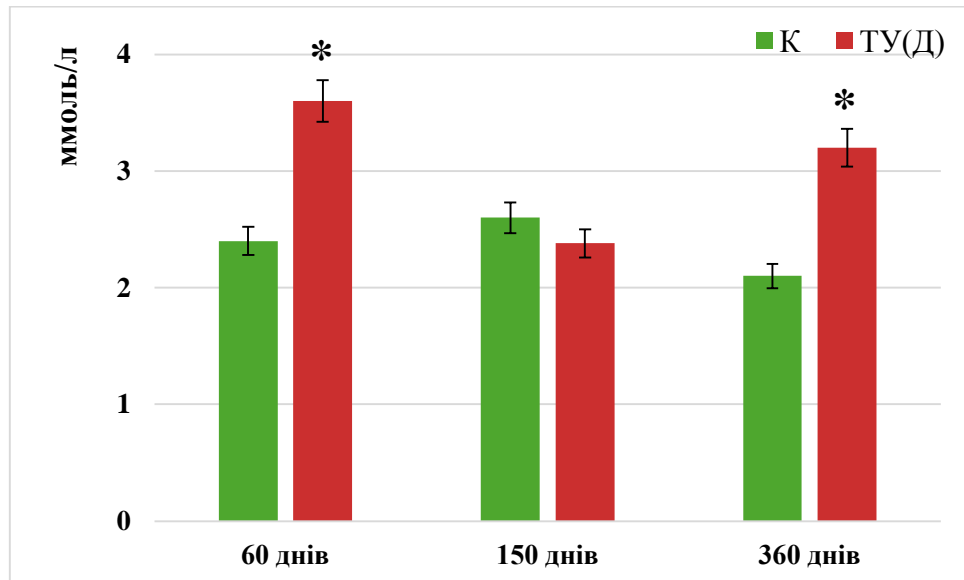


Рис. 3.2. Вміст фосфору в сироватці крові щурів різного віку за умов токсичного ураження дикватом

*Примітка: К – контроль, ТУ(Д) – тварини, яким моделювали токсичне ураження дикватом; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.*

Встановлені зміни можна пояснити наступним чином. На тлі зниження кальцію в сироватці крові стимулюється секреція паратгормону, який мобілізує кальцій і фосфати з кісткової тканини, підвищує резорбцію кісток – джерело обох іонів, рефлекторно підвищує фосфати в крові в короткостроковому періоді [29].

З іншого боку, дикват, як прооксидант, викликає пошкодження проксимальних каналців нирок, що знижує здатність до виведення фосфатів, спричиняє затримку фосфору в крові.

Також це можна пояснити зниженням активності кальцитріолу ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Пошкодження нирок дикватом може призводити до зниження 1-альфа-гідроксилази, що супроводжуватиметься зніженням активної форми вітаміну D, відповідно порушенням всмоктування кальцію з подальшою

гіпокальціємією, що призводитиме до стимуляції паратгормону та посилене вивільнення фосфору з кісток [30].

У 60-денних щурів ще триває інтенсивний ріст скелета, тому баланс кальцій/фосфор є динамічно змінним, організм швидше реагує на дефіцит кальцію через посилену резорбцію кісткової тканини, надлишок фосфору може не виводитись належним чином через токсичне пригнічення ниркових механізмів.

Таким чином, підвищення концентрації фосфору у крові може мати негативні наслідки, включаючи кальцифікацію м'яких тканин, порушення роботи серцево-судинної системи та зміну кісткового метаболізму. Тому отримані дані свідчать про потенційну небезпеку накопичення фосфору у тварин за умов токсичного ураження дикватом [26].

Отже, підвищення фосфору в сироватці крові на тлі гіпокальціємії у 60-денних щурів після дії диквату є результатом порушення фосфор-кальцієвого обміну через активацію остеолізу (через ПТГ), ниркову дисфункцію, вікову активність метаболічних процесів. Це є маркером порушення регуляції мінерального гомеостазу, характерного для інтоксикацій з нефротоксичним компонентом.

У щурів 150-денного віку (репродуктивні) відносно стабільне значення фосфору, оскільки в цій групі зазвичай зберігається найвища стійкість до токсичних ушкоджень. Це можна пояснити тим, що у разі відсутності гіпокальціємії – не буде вираженої стимуляції паратгормону, тому фосфатемія лишається компенсованою.

Підвищення вмісту фосфору в крові у 360-денних щурів за умов ураження гербіцидом дикватом на тлі гіпокальціємії є наслідком дезрегуляції кальцій-фосфатного обміну, зумовленої комплексом вікових та токсичних впливів.

Ключовими механізмами за даних умов можуть бути: активація паратгормонового шляху через гіпокальціємію (гіпокальціємія стимулює секрецію паратгормону (ПТГ); ПТГ активує резорбцію кісткової тканини, вивільняючи іони кальцію та фосфату); порушення фосфатної екскреції

внаслідок ниркової токсичності (дикват викликає ушкодження проксимальних каналців, що пригнічує здатність нирок до екскреції фосфатів; незважаючи на сигнал ПТГ, нирки не виводять фосфор ефективно, тому відбувається накопичення фосфору в крові (гіперфосфатемія)) [31].

Можливо, також має місце вікове зниження ниркового резерву. У 360-денному віці спостерігається фізіологічне зниження ниркової фільтраційної здатності. Це додатково ускладнює виведення надлишку фосфатів з організму.

Отже, підвищення рівня фосфору в крові у щурів 360-денного віку після дії диквату є результатом дії гіпокальціємії внаслідок токсичного ушкодження нирок, що посилюється віковим зниженням функціональної активності нефронів.

Такий дисбаланс є типовим для ниркової дисфункції і може бути використаний як ранній біомаркер нефротоксичності гербіцидів у старіючих організмів.

Як уже зазначалось дикват спричиняє ушкодження печінки та нирок [1], а саме ці органи відповідальні за гідроксилювання та активацію вітаміну D₃ [5], що підтверджує подвійний вплив токсичної дії: метаболічний (через порушення активації вітаміну D₃) та системний (через втрату його захисних властивостей). Крім регуляції імунітету, вітамін D₃ грає ключову роль у кальцій-фосфорному гомеостазі, сприяючи абсорбції кальцію в кишечнику, зменшенню втрат кальцію з сечею, регуляції активності парацитовидної залози.

Таким чином, ураження нирок і печінки дикватом може призводити до порушення кальцій-фосфорного обміну через зниження рівня активного вітаміну D₃, що вказує на потенційний зв'язок між токсичністю диквату та розвитком метаболічних порушень у щурів.

Порушення кальцій-фосфорного балансу може мати серйозні наслідки для організму, зокрема погіршення стану кісткової тканини: підвищений ризик розвитку гіпокальціємії або гіперфосфатемії з одночасним загостренням оксидативного стресу через дисбаланс іонів. Це підкреслює актуальність даної

роботи та необхідність більш глибоких досліджень токсичних ефектів диквату на метаболізм мінералів у різних модельних організмах.

Отримані нами результати демонструють потенційну загрозу кальцій-фосфорному обміну при впливі гербіцидів, а також підтверджують гіпотезу про те, що дикват має негативний вплив на мінеральний обмін, зокрема на рівень кальцію та фосфору в організмі.

ВИСНОВКИ

1. Надходження токсичних доз промислового ксенобіотика диквату супроводжується зниженням рівня кальцію в сироватці крові щурів підліткового (60 днів) та зрілого (360 днів) віку із розвитком гіпокальціємії.
2. У 60-денних та 360-денних щурів за умов токсичного ураження гербіцидом дикватом встановлено підвищення рівня фосфору в сироватці крові з розвитком гіперфосфатемії.
3. Підліткові та зрілі щури демонструють найбільшу чутливість до змін у кальцієво-фосфорному обміні, що проявляються гіпокальціємією з одночасною гіперфосфатемією за умов токсичного ураження дикватом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Li K. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*. 2016. V. 171 P. 40–48.
2. Mao Z. Simultaneous determination of diquat and its two primary metabolites in rat plasma by ultraperformance liquid chromatography– tandem mass spectrometry and its application to the toxicokinetic study. *Forensic Toxicology*. 2022. V. 40 (2), P. 332–339.
3. Bikle D. Calcium-sensing receptor in GtoPdb V. 2023.1. IUPHAR/BPS. *Guide to Pharmacology*. 2023. DOI: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/f12/2023.1>
4. Peacock M. Calcium metabolism in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010. V. 5. P. 23–30.
5. Christakos S. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological Reviews*. 2015. V. 96 (1). P. 365–408.
6. Shaker J. Calcium and phosphate homeostasis. *Endotext*. 2023 . URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279023/>
7. Viriato C. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*. 2020. V. 266, 129018.
8. Kanbay M. The pathophysiology and management of vascular calcification in chronic kidney disease patients. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 2023. V. 21 (2). P. 75–85.
9. Muleya M. A comparison of the bioaccessible calcium supplies of various plant-based products relative to bovine milk. *Food Research International*. 2023. V. 175.
10. Zhu S. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discovery*. 2024. V. 10 (1):71

11. See W. Cellular and Molecular Events Leading to Paraquat-Induced Apoptosis: Mechanistic Insights into Parkinson's Disease Pathophysiology. *Molecular Neurobiology*. 2022. V. 59 (6). 3353–3369
12. Alkadi H. A review on free radicals and antioxidants. *Infectious Disorders-Drug Targets*. 2018. V. 20 (1). P. 16–26.
13. Ren Y. Imaging findings and toxicological mechanisms of nervous system injury caused by Diquat. *Molecular Neurobiology*. 2024. V. 61 (11). P. 9272–9283.
14. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. *Diquat review technical report*. 2024. URL: <https://www.apvma.gov.au/sites/default/files/202407/Diquat%20Review%20Technical%20Report%20-%202024.pdf>
15. Yoon C. Developmental Toxicity and Teratogenic Effects of Dicarboximide Fungicide Iprodione on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Fishes*. 2024. V. 9 (11). 425.
16. Aparecida M. Impact on aquatic and soil biota and human health. *In InTech eBooks*. 2013. DOI: <https://doi.org/10.5772/55851>
17. Lv M. Construction of a mortality risk prediction model for patients with acute diquat poisoning based on clinically accessible data. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2024. V. 19 (1). DOI: 10.1186/s12995-024-00416-7
18. Zhang J. Mechanism of intestinal injury induced by acute diquat poisoning in rats. 2024. V. 36 (3). P. 293–297.
19. Andersen M. Ethics and *Animal Experimentation*. *An Acad Bras Cienc*. 2019. V. 91 (1).
20. Ghasemi A. The laboratory rat: Age and body weight matter. 2021. DOI: : <https://doi.org/10.17179/excli2021-4072>
21. Cui S. Study on the therapeutic effect of glucocorticoids on acute kidney injury in rats exposed to diquat. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2023. V. 166.

22. Wu Y. Kidney and lung injury in rats following acute diquat exposure. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022. V. 23 (4).
23. Kunert K. Herbicide-Induced radical damage and antioxidative systems. *In CRC Press*. 2020. P. 45–63.
24. Babić Leko M. Environmental factors that affect parathyroid hormone and calcitonin levels *International journal of molecular sciences*. – 2021. V. 23, №1. P. 44.
25. Schwalfenberg G. Exploring Interactions between Nutrients and Toxicants in Clinical Medicine *The Scientific World Journal*. 2015. V. 2015, Article ID 318595
26. Nong K. Effects of the vitamin D3 on alleviating the oxidative stress induced by diquat in Wenchang chickens. *Animals*. 2023. V. 13 (4).
27. Zeng D. Clinical and pathological characteristics of acute kidney injury caused by diquat poisoning. *Clinical Toxicology*. 2023. V. 61 (9). P. 705–708.
28. Kim G. Renal Mechanisms for Hypercalciuria Induced by Metabolic Acidosis *American Journal of Nephrology*. 2022. V. 53, №11–12. P. 839–846.
29. Centeno P. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion *Nature Communications*. 2019. V. 10. Article number: 4693.
30. Al-Bekairi. A. Vitamin D and Acute Kidney Injury: A Reciprocal Relationship *Biomolecules*. 2024. V. 15, № 4. P. 586.
31. Palmer B. Physiology and pathophysiology of calcium, phosphate, and magnesium metabolism *Kidney International*. 2016. V. 89, № 5. P. 898–910.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватися наступних заходів безпеки:

- забороняється заходити в лабораторію у верхньому одязі;
- працювати в біохімічній лабораторії можна тільки в спеціальному халаті, оскільки ймовірна можливість забруднення, псування одягу при потрапляння їдких реактивів.

Правила роботи з реактивами

- концентровані кислоти та луги повинні знаходитися під витяжною шафою;
- усі дослідження з отруйними речовинами та речовинами з їдким запахом проводити тільки під витяжною шафою;
- наливати або насипати реактиви слід тільки над столом;
- не слід залишати відкритими банки з реактивами;
- пролиті або розсипані реактиви потрібно негайно видалити зі столу, витерти стіл ганчіркою та промити водою;
- пролиті концентровані кислоти необхідно засипати піском, потім зібрати пісок лопаткою. Дане місце необхідно промити розчином соди та витерти ганчіркою;
- під час роботи з органічними розчинниками (спирти, ефіри, ацетон, бензол тощо) не можна визначати речовину за запахом, щоб уникнути отруєння їх парами;
- наповнення піпеток розчинами органічних розчинників, кислот, лугів проводять тільки за допомогою груші;
- уважно стежити за тим, щоб реактиви (особливо кислоти і луги) не потрапляли на обличчя, руки та одяг;
- не ходити по лабораторії з концентрованими кислотами, а наливати їх тільки в певному, відведеному для цього місці;

- не забруднювати реактиви під час роботи: не плутати пробки від склянок, які містять різні реактиви; надлишок взятого реактиву не виливати назад у посуд;
- набирати кожен реактив тільки призначеною для цього піпеткою і в жодному разі не плутати їх;
- у випадку потрапляння на шкіру концентрованої кислоти, уражене місце необхідно промити великою кількістю води, а потім розведеним розчином соди;
- при потраплянні розчинів лугів на шкіру уражене місце потрібно обробити спочатку розведеною кислотою, а потім водою.

Правила роботи з нагрівальними приладами

- перед тим як запалити спиртівку переконатися, що поблизу немає легкозаймистих рідин (спирт, ефір тощо);
- запалювати спиртівку можна тільки сірником;
- у пробірці можна нагрівати лише невелику кількість розчину, рідина повинна займати не більше 1/3 об'єму пробірки;
- пробірку при нагріванні необхідно направляти в сторону від себе і людей, які знаходяться поруч;
- не можна нахилитися над спиртівкою: спочатку пробірку з розчином потрібно прогріти всю, а потім нагрівати в потрібному місці, не виймаючи з полум'я спиртівки;
- не можна нагрівати пробірку довго в одному місці, оскільки рідина швидко закипить і вихлюпнеться із пробірки;
- нагрівати пробірку потрібно нижче рівня рідини в ній;
- при нагріванні рідини не можна торкатися колбою палаючого гніту, завжди дотримуватися правил безпеки при нагріванні, не допускати випліскування рідини (час від часу відводити пробірку від полум'я, не нагрівати її у вертикальному положенні);
- після нагрівання слід відразу загасити спиртівку, накривши

полум'я ковпачком;

□ при опіках на обпечене місце потрібно покласти вату, змочену розчином перманганату калію.

Правила роботи з лабораторним обладнанням

Центрифуги

□ перед центрифугуванням центрифужні пробірки врівноважують та розміщують у центрифугі симетрично;

□ центрифужна камера повинна бути закрита кришкою;

□ під час роботи центрифуги забороняється відкривати кришку камери;

□ після відключення центрифуги необхідно дати можливість ротору зупинитися, забороняється гальмувати ротор рукою.

Автоматичні піпетки

□ тримаючи піпетку у вертикальному положенні натиснути кнопку до першого упору (фаза А);

□ занурити наконечник в рідину на глибину 3 до 5 мм (фаза В);

□ набрати рідину в наконечник повільно відпускаючи кнопку, трохи почекати і вийняти наконечник з рідини (фаза С);

□ доторкнутися наконечником до внутрішньої стінки посудини і спорожнити наконечник, плавно натискаючи кнопку до першого упору з такою ж швидкістю як при взятті проби (фаза D);

□ почекати близько 1 секунди, натискаючи кнопку піпетки до другого упору, видалити залишки рідини і вийняти піпетку, ковзаючи наконечником по внутрішній стінці посудини (фаза E);

□ після зняття наконечника піпетка готова до повторення циклу роботи;

□ забороняється набирати рідину піпеткою без наконечника;

□ під час роботи з рідиною, що має температуру, відмінну від температури навколишнього середовища більше 5°C рекомендується багаторазово прополоскати наконечники;

□ після закінчення роботи слід помістити піпетку в штативі.