

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КОРБУШ МАРІЯ ЮРІЇВНА**

УДК 574:612.32/.33:614.71(043.3)

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**БАР'ЄРНА ФУНКЦІЯ КИШЕЧНИКА ЗА ДІЇ КАРБОНВМІСНИХ  
НАНОЧАСТИНОК-ЗАБРУДНЮВАЧІВ ПОВІТРЯ ПРИРОДНОГО ТА  
АНТРОПОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

Спеціальність – 091-Біологія

Галузь знань – 09-Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

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

\_\_\_\_\_ М.Ю. Корбуш

Науковий керівник:

Толстанова Ганна Миколаївна, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2023

## АНОТАЦІЯ

**Корбуш М. Ю. Бар'єрна функція кишечника за дії карбонвмісних наночастинок-забруднювачів повітря природного та антропогенного походження.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2023.

Бар'єрна функція кишечника є фундаментальним аспектом здоров'я організму та відіграє ключову роль у захисті організму від шкідливих речовин, токсинів та патогенних мікроорганізмів, які потрапляють у нього через шлунково-кишковий тракт (ШКТ). В основі бар'єрної функції кишечника лежить складна система механічних, біохімічних та імунологічних процесів, які контролюють проникнення речовин через епітеліальний шар кишечника. Крім того, кишкова мікробіота грає важливу роль у підтримці цілісності кишкового бар'єру, виробляючи корисні метаболіти, захищаючи від патогенів, та регулюючи імунну відповідь.

Порушення бар'єрної функції кишечника може призвести до проникнення небезпечних агентів в організм, що у подальшому може сприяти розвитку різних захворювань, алергій та імунологічних порушень, зробивши організм більш вразливим перед інфекційними захворюваннями. Відомо, що порушення цілісності кишкового бар'єра може грати ключову роль у розвитку запальних захворювань кишечника, таких як хвороба Крона та виразковий коліт. Хоча точні механізми залишаються об'єктом активного дослідження, припускається, що таке порушення може сприяти хронічному запаленню, змінам у мікробіоті кишечника та втраті функції абсорбції.

В умовах збільшеного рівня забруднення повітря, особливо в областях з інтенсивною промисловістю та інтенсивним автомобільним трафіком, виникає ще більша загроза порушенню цілісності кишкового бар'єра. Особливу

небезпеку становлять тверді частинки – група забруднювачів повітря, що містять вуглецеві сполуки з органічними речовинами та/або важкими металами. Тверді частинки можуть відрізнятися між собою за формою, походженням, хімічним складом, але основним параметром їх класифікації є розмір. Тверді частинки поділяють на грубі (діаметром до 10 мкм), дрібні (діаметром до 2,5 мкм) та наддрібні (нано-) частинки (діаметром до 100 нм).

В залежності від розміру тверді частинки можуть проявляти різні властивості. Відомо, що грубі частинки не здатні глибоко проникати в організм, а здебільшого осідають у верхніх дихальних шляхах або трахеї, а дрібні частинки та наночастинки можуть проникати у бронхи та альвеоли, де можуть попадати у кровоносну систему. Більше того, тверді частинки можуть потрапляти в організм через ковтання повітря, яке вдихається, із забрудненою їжею чи водою або завдяки мукоциліарному кліренсу, під час якого частинки, захоплені слизом, виштовхуються у ротову порожнину, де потім можуть проковтуватися зі слиною і потрапляти у ШКТ. Це зумовлює здатність твердих частинок не тільки спричиняти порушення дихальної та серцево-судинні систем, а й впливати на розвиток запальних процесів у ШКТ.

І хоча ряд досліджень продемонстрував здатність грубих та дрібних твердих частинок порушувати цілісність кишкового бар'єру та впливати на склад і різноманітність кишкової мікробіоти, проте основну та найбільшу загрозу становлять тверді наночастинки, які завдяки своєму розміру мають унікальні фізико-хімічні властивості.

Тому метою дисертаційного дослідження було оцінити ефект дії твердих карбонвмісних наночастинок-забруднювачів повітря природного та антропогенного походження на стан бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки, її прозапальні зміни та метаболічну активність кишкової мікробіоти в умовах *in vitro*, *ex vivo* та *in vivo*.

Для виконання роботи використовували бактеріологічні (визначення загальної кількості бактерій шляхом посіву на селективні середовища),

цитологічні (культивування та визначення життєздатності клітин), хіміко-аналітичні (визначення кислотності молока методом титрування з NaOH), імунологічні (Вестерн-блот), електрофізіологічні (дослідження функції епітеліального препарату товстої кишки за допомогою системи камер Уссінга), фізіологічні, спектрофотометричні та біохімічні методи.

На першому етапі роботи ми визначили ступінь токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання різних порід деревини та деревних компонентів, а саме: деревини та кори берези, деревини тополі, деревини та гілля сосни, на життєздатність клітин кишечника лінії COLO 205 та функції епітелію товстої кишки щурів. Ми продемонстрували що всі види твердих наночастинок виявляли токсичний дозозалежний вплив, який спричиняв стійкі зміни. Найменший ступінь токсичності проявляли тверді наночастинок, отримані внаслідок згорання кори берези, а найсильнішу – тверді наночастинок, отримані від згорання деревини тополі. Тверді наночастинок, отримані від згорання деревини берези та сосни проявляють помірну ефективність впливу.

На другому етапі ми порівняли ефект дії твердих наночастинок природного походження, отриманих від згорання деревини тополі, та антропогенного походження, отриманих від згорання медичних масок, на стан бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів за двох шляхів гострого введення твердих наночастинок: внутрішньовенного та перорального. Гостре (3-годинне) введення твердих наночастинок внутрішньовенно призводило до пошкодження ендотелію судин та розвитку запалення у слизовій оболонці товстої кишки щурів, проте не спостерігалось значних змін у стані слизового бар'єру. Пероральне введення твердих наночастинок призводило до зменшення кількості глікопротеїнів у складі поверхневого слизу епітелію товстої кишки та значного збільшення транслокації бактерій у кров ворітної вени, що вказує на порушення мукозального шару та цілісності кишкового бар'єра.

Таким чином, нами вперше показано різницю у механізмі дії твердих наночастинок природного та антропогенного походження залежно від шляху їх введення в організм щурів.

Далі ми дослідили зміни бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів за довготривалої, 7-добової, експозиції твердих наночастинок, отриманих внаслідок згорання деревини тополі та медичних масок. У нашому експерименті пероральне введення твердих наночастинок протягом 7 діб призводило до значного погіршення фізіологічного стану щурів: втрати маси тіла, збільшення вмісту води у фекаліях та схильності до розвитку діареї. Крім того, довготривала експозиція твердих наночастинок спричинювала деградацію слизової оболонки кишечника, зміни у складі просвітної мікробіоти з появою умовно-патогенних мікроорганізмів, порушення цілісності ендотелію судин та транслокації бактерій до кровотоку.

Транспорт іонів у товстій кишці є ключовим процесом, що забезпечує функціонування цього органу та підтримує гомеостаз в організмі. У нашій роботі для дослідження транспорту іонів через епітеліальний бар'єр використовувалася система камер Уссінга. Отримані результати дослідження показали зниження струму короткого замикання та рівня відповіді на стимулювальну дію карбахоліну та збільшення парацелюлярної проникності після 7-добового введення твердих наночастинок, отриманих внаслідок згорання деревини тополі та медичних масок, у товстій кишці щурів. Ця реакція супроводжувалася збільшенням рівнів активності прозапального маркера мієлопероксидази та експресії редокс-чутливого транскрипційного фактора EGR-1. При цьому важливо зазначити на те, що найбільш виражені зміни були виявлені після введення твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі на відміну від твердих наночастинок отриманих від згорання медичних масок.

Порушення цілісності та функціонування кишкового бар'єра розглядається як один з основних факторів патогенезу запальних захворювань кишечника, тому ми оцінили ефект дії твердих наночастинок природного та антропогенного

походження на ступінь прозапальних змін в слизовій оболонці товстої кишки щурів та схильність до розвитку коліту. 7-добове введення твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі та медичних масок, підвищувало чутливість щурів до розвитку експериментального коліту порівнянно із контрольною групою щурів з модельованим колітом, збільшуючи рівень активації мієлопероксидази, масу товстої кишки та проникність ендотелію судин органу, знижуючи кількість глікопротеїнів слизової оболонки й електрогенний транспорт іонів, а також пригнічуючи карбахолін-стимульовану секрецію іонів хлору через епітелій товстої кишки.

У забезпеченні стійкості до колонізації товстої кишки патогенними мікроорганізми важливу роль відіграють представники нормобіоти кишечника. Тверді наночастинок здатні впливати на мікроорганізми, змінюючи їх кількісний склад, і цей вплив може бути ключовим фактором у виникненні багатьох захворювань. Під час нашого дослідження ми вперше виявили відмінності у впливі твердих наночастинок, отримані від згорання деревини тополі та медичних масок, за різних концентрацій (20 мкг/мл, 40 мкг/мл та 80 мкг/мл) на ростові показники та метаболічну активність представників транзитної та облігатної мікробіоти кишечника: *Escherichia coli* B906, *Staphylococcus aureus* B-918 та *Lactobacillus plantarum* 691.

Тверді наночастинок виявили різну інгібувальну дію на ріст та життєздатність цих штамів, проявляючи як бактеріостатичний, так і бактерицидний вплив залежно від походження та концентрації. Тверді наночастинок продемонстрували безпосередній вплив на лактозоферментуючий штам *Escherichia coli* B-906, що характеризувався появою від 8% до 27% штамів, не здатних ферментувати лактозу, зростанням здатності до біоплівкоутворення за концентрації 20 мкг/мл диму тополі та здатністю до формування резистентності до ампіциліну та норфлораксацину та зниженням чутливості до цефтріаксону після культивування протягом 72 годин у присутності твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі та медичних масок.

Тверді наночастинки обох типів також посилювали агресивний потенціал умовно-патогенного штаму *Staphylococcus aureus* B-918, сприяючи утворенню біоплівки та розвитку резистентності до ампіциліну та меропенему, а крім того, знижували чутливість до левоміцетину, норфлуксацину та цефтріаксону.

Також ми встановили здатність твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі та медичних масок, пригнічувати ріст та розвиток *Lactobacillus plantarum* 619, який є одним з ключових представників нормобіоти кишечника, зменшувати здатність до формування біоплівки та інгібувати вироблення цим штамом молочної кислоти.

Таким чином, у роботі було вперше системно досліджено ефект дії твердих наночастинок-забруднювачів повітря природного та антропогенного походження, доведено залежність їх впливу від концентрації, тривалості дії та шляху введення, а також встановлено їхню здатність порушувати бар'єрну функцію слизової оболонки товстої кишки щурів, стимулювати розвиток прозапальних змін, підвищувати схильність до розвитку коліту а також впливати на ростові показники та метаболічну активність представників мікробіоти кишечника.

**Ключові слова:** тверді частинки, наночастинки, забруднення повітря, бар'єрна функція кишечника, запалення, коліт, мікробіота, шлунково-кишковий тракт

## ABSTRACT

***Korbush M. Yu. Gut barrier function under the action of carbon-containing air pollution nanoparticles of natural and anthropogenic origin.*** – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of 09-Biology in the speciality 091–Biology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2023.

The intestinal barrier function is a fundamental aspect of overall health. It is crucial in protecting the body from harmful substances, toxins, and pathogenic microorganisms that enter it through the gastrointestinal tract (GIT). At the core of the intestinal barrier function lies a complex system of mechanical, biochemical, and immunological processes that control the passage of substances through the intestinal epithelial layer. In addition, the gut microbiota plays a significant role in maintaining the integrity of the intestinal barrier, producing beneficial metabolites, defending against pathogens, and regulating the immune response.

Disruption of the intestinal barrier function can lead to the entry of harmful agents into the body, which can subsequently contribute to the development of various diseases, allergies, and immunological disorders, making the body more susceptible to infectious diseases. It is known that the disruption of the integrity of the intestinal barrier can play a key role in the development of inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis. Although the exact mechanisms remain the subject of active research, it is suggested that such disruption may contribute to chronic inflammation, changes in the gut microbiota, and impaired absorption function.

With elevated levels of air pollution, especially in regions with intense industrial activity and heavy traffic, there is an even greater risk of compromising the integrity of the intestinal barrier. Particulate matter poses a particular danger - a group of air pollutants containing carbon compounds with organic substances and/or heavy metals. Particulate matter can vary in shape, origin, and chemical composition, but their

primary classification parameter is size. Particulate matters are categorized as coarse (up to 10  $\mu\text{m}$  in diameter), fine (up to 2.5  $\mu\text{m}$  in diameter), and ultrafine (nano-) particles (up to 100 nm in diameter).

Depending on their size, particulate matter can exhibit different properties. It is known that coarse particles are generally unable to penetrate deeply into the body and tend to settle in the upper respiratory tract or the trachea. In contrast, fine and ultrafine particles can penetrate the bronchi and alveoli, where they can enter the bloodstream. Moreover, particulate matter can enter the body through the swallow of contaminated air, ingestion with contaminated food or water, or through mucociliary clearance, during which particles captured by mucus are expelled into the oral cavity, where they can then be swallowed, entering the GIT. This ability of particulate matter not only contributes to respiratory and cardiovascular system disturbances but also affects the development of inflammatory processes in GIT.

While some studies have demonstrated the ability of both coarse and fine particulate matter to disrupt the integrity of the intestinal barrier and influence the composition and diversity of the gut microbiota, the primary and most significant threat comes from nanoparticles, which, due to their size, possess unique physicochemical properties.

Therefore, the dissertation research aimed to assess the effects of carbon-containing nanoparticles, air pollutants of natural and anthropogenic origin, on the state of the mucosal barrier function of the colon, its pro-inflammatory changes, and the metabolic activity of the gut microbiota in *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* conditions.

To conduct the study, we utilized bacteriological (determination of total bacterial count through selective culture media), cytological (cultivation and assessment of cell viability), chemical-analytical (determination of milk acidity using titration with NaOH), immunological (Western blot), electrophysiological (evaluation of the colonic epithelium's function using the Ussing chamber system), physiological, spectrophotometric, and biochemical methods.

In the first stage of the research, we assessed the toxicity of nanoparticles obtained from the combustion of various types of wood and wood components, specifically birch wood and bark, poplar wood, and pine wood and branches, on the viability of COLO 205 cell line and the colonic epithelial function in rats. We demonstrated that all types of nanoparticles exhibited dose-dependent toxic effects, resulting in persistent changes. The lowest degree of toxicity was observed in nanoparticles derived from the combustion of birch bark, while the highest toxicity was observed in nanoparticles obtained from the combustion of poplar wood. Nanoparticles from birch and pine wood showed moderate effectiveness.

In the second stage, we compared the effects of naturally derived nanoparticles obtained from the combustion of poplar wood with anthropogenic nanoparticles obtained from the combustion of medical masks on the barrier function of the colonic mucosa in rats, administered through two acute routes: intravenous and oral. Acute (3-hour) intravenous administration of nanoparticles led to vascular endothelial damage and inflammation in the colonic mucosa of rats, but significant changes in the mucosal barrier were not observed. Oral administration of nanoparticles resulted in a decrease in the quantity of glycoproteins in the colonic epithelium's surface mucus and a significant increase in bacterial translocation into the portal vein, indicating disruption of the mucosal layer and intestinal barrier integrity.

Thus, we have demonstrated for the first time the difference in the mechanism of action of nanoparticles of natural and anthropogenic origin, depending on the route of administration in rats.

Next, we examined changes in the barrier function of the colonic mucosa in rats after prolonged (7 days) exposure to nanoparticles derived from the combustion of poplar wood and medical masks. In our experiment, oral administration of nanoparticles for 7 days resulted in significant deterioration of the physiological condition of the rats, including body weight loss, increased water content in faeces, and a tendency to develop diarrhoea. Moreover, prolonged exposure to nanoparticles caused the degradation of the intestinal mucosa, changes in the composition of luminal

microbiota with the appearance of opportunistic microorganisms, disruption of endothelial integrity of blood vessels, and bacterial translocation into the bloodstream.

Ion transport in the colon is a key process that ensures the organ's functioning and maintains overall body homeostasis. In our study, we used the Ussing chamber system to investigate ion transport across the epithelial barrier. The results showed a decrease in short-circuit current and the response to carbachol stimulation, as well as an increase in paracellular permeability after 7 days of administration of nanoparticles derived from the combustion of poplar wood and medical masks in the colons of rats. This reaction was accompanied by increased levels of the pro-inflammatory marker myeloperoxidase activity and the expression of the redox-sensitive transcription factor EGR-1. Importantly, the most significant changes were observed following the administration of nanoparticles from the combustion of poplar wood, as opposed to nanoparticles from the combustion of medical masks.

Disruption of the integrity and function of the intestinal barrier is considered one of the key factors in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Therefore, we evaluated the effects of nanoparticles of natural and anthropogenic origin on the degree of pro-inflammatory changes in the colonic mucosa of rats and their susceptibility to colitis. Seven-day administration of nanoparticles from the combustion of poplar wood and medical masks increased the susceptibility of rats to experimental colitis compared to the control group of rats with induced colitis. This was characterized by an increase in myeloperoxidase activation, colon weight, endothelial permeability, a reduction in glycoproteins in the mucosal layer, disruption of ion transport, and a decrease in carbachol-stimulated chloride ion secretion across the colonic epithelium.

In maintaining resistance to colonization of the colon by pathogenic microorganisms, the representatives of the gut's normal microbiota play a crucial role. Nanoparticles have the potential to influence microorganisms, altering their quantitative composition, and this impact may be a key factor in the development of various diseases. During our research, we discovered differences in the impact of nanoparticles, derived from the combustion of poplar wood and medical masks, at

different concentrations (20 µg/ml, 40 µg/ml, and 80 µg/ml) on the growth and metabolic activity of transient and obligate gut microbiota representatives: *Escherichia coli* B906, *Staphylococcus aureus* B-918, and *Lactobacillus plantarum* 691.

Nanoparticles exhibited varying inhibitory effects on the growth and viability of these strains, displaying both bacteriostatic and bactericidal effects depending on their origin and concentration. Nanoparticles obtained from the combustion of poplar wood had a direct impact on the lactose-fermenting strain *Escherichia coli* B-906, leading to the emergence of 8% to 27% of strains unable to ferment lactose, increased biofilm formation potential at a concentration of 20 µg/ml of poplar wood smoke, and the development of resistance to ampicillin and norfloxacin, as well as decreased sensitivity to ceftriaxone after 72 hours of cultivation in the presence of nanoparticles.

Additionally, nanoparticles from both sources enhanced the aggressive potential of the opportunistic strain *Staphylococcus aureus* B-918, promoting biofilm formation and the development of resistance to ampicillin and meropenem, along with a decrease in sensitivity to levomycetin, norfloxacin, and ceftriaxone.

We also found that nanoparticles derived from the combustion of poplar wood and medical masks were capable of inhibiting the growth and development of *Lactobacillus plantarum* 619, which is one of the key representatives of gut normal microbiota, decreasing the ability for biofilm formation and suppressing lactic acid production.

In conclusion, our study systematically investigated the effects of air pollution nanoparticles of natural and anthropogenic origin. We demonstrated the dependency of their influence on concentration, duration of exposure, and route of administration. We also established their ability to disrupt the barrier function of the colonic mucosa, stimulate pro-inflammatory changes, increase susceptibility to colitis, and impact the growth and metabolic activity of gut microbiota representatives.

**Keywords:** particulate matter, nanoparticles, air pollution, intestinal barrier function, inflammation, colitis, microbiota, gastrointestinal tract

## Список публікацій здобувача

### Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Paliienko, K., **Korbush, M.**, Krisanova, N., Pozdnyakova, N., Borysov, A., Tarasenko, A., Pastukhov, A., Dudarenko, M., Kalynovska, L., Grytsaenko, V., Garmanchuk, L., Dovbynychuk, T., Tolstanova, G., & Borisova, T. (2022). Similar in vitro response of rat brain nerve terminals, colon preparations and COLO 205 cells to smoke particulate matter from different types of wood. *Neurotoxicology*, 93, 244–256. – Q2 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank. (особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів до опублікування).

2. **Korbush M.Yu.**, Serhiichuk T.M., Yumyna Y.M., Borisova T.O., Tolstanova G.M. (2023). The effect of particulate matter of natural and anthropogenic origin on growth indicators and sensitivity to antibiotics of *Escherichia coli* B906. *Microbiological journal*, 85(4), P. 34-45. (особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів до опублікування і підготовка статті до друку).

3. **Korbush, M.**, Tolstanova, G. (2023). Intestinal barrier integrity under effect of particulate matter from cottonwood combustion. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*, 93(2), 22-28. (особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів до опублікування і підготовка статті до друку).

### Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. **Корбуш М.Ю.**, Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М., Борисова Т.О. (2021). Тверді частинки диму підвищують схильність до запальних захворювань кишечника. У: *VIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»*. Київ, Україна, 18-19 листопада 2021. сс. 54-56.
2. **Korbush M.**, Yumyna A., Serhiichuk T., Tolstanova G., Borisova T. (2022). Influence of synthesized water-suspended preparations of carbon-containing smoke nanoparticles from natural and synthetic origins on the growth indicators of *Escherichia coli* B906. In: *IV international scientific conference «Microbiology and Immunology - the development outlook in the 21st century»*. Kyiv, Ukraine, September 22-23, 2022. p. 43.
3. **M. Korbush**, K. Paliienko, T. Dovbynychuk, T. Borisova, G. Tolstanova. (2022). Particulate matter from natural precursor increases susceptibility to inflammatory bowel disease. In: *30<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week 2022 Poster Presentations*. Vien, Austria, October 8-11, 2022. United European Gastroenterol J, 10. pp. 620-621.
4. **Корбуш М.Ю.** Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М., Борисова Т.О. (2022). Тверді наночастинки диму сприяють виникненню прозапальних змін у кишечнику. У: *IX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень*. Київ, Україна, 18-19 листопада 2022. сс. 260-261.
5. Іщук А.М., Юмина А.Я., **Корбуш М.Ю.**, Сергійчук Т.М., Борисова Т.О., Толстанова Г.М. (2023). Вплив твердих наночастинок-забруднювачів повітря синтетичного походження на ростові показники *Lactobacillus*

*plantarum*. У: *Youth Biological Conference*, Київ, Україна, 15 квітня 2023. сс. 19-23

6. **Корбуш М.Ю.**, Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М., Борисова Т.О. (2023). Тверді наночастинки диму від згоряння деревини тополі як фактор порушення бар'єрної функції кишечника. У: *XX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя»*. Київ, Україна 27-28 квітня 2023. сс. 185-189.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....</b>	<b>21</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>22</b>
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1. Характеристика бар'єрної функції кишечника .....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.1. Будова кишкового бар'єра .....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.2. Регуляція проникності кишкового бар'єра .....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.3. Порушення бар'єрної функції кишечника у патогенезі запальних захворювань кишечника.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2. Роль мікробіоти у бар'єрній функції кишечника.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3. Тверді частинки як складові забрудненого повітря .....</b>	<b>37</b>
<b>1.3.1. Характеристика та класифікація твердих частинок .....</b>	<b>39</b>
<b>1.3.2. Роль твердих частинок у порушенні бар'єрної функції кишечника</b>	<b>41</b>
<b>1.3.3. Зміни кишкової мікробіоти, викликані забрудненням повітря .....</b>	<b>45</b>
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1. Реактиви та матеріали .....</b>	<b>48</b>
<b>2.2. Синтез препаратів із твердими наночастинками .....</b>	<b>49</b>
<b>2.3. Експериментальні тварини.....</b>	<b>50</b>
<b>2.4. Схема проведення експериментів .....</b>	<b>50</b>
<b>2.5. Визначення маси тіла щурів.....</b>	<b>54</b>
<b>2.6. Визначення загальної маси органів дослідних тварин .....</b>	<b>55</b>
<b>2.7. Визначення вмісту води у фекаліях.....</b>	<b>55</b>
<b>2.8. Моделювання експериментального коліту.....</b>	<b>55</b>

2.9. Реєстрація електрофізіологічних характеристик у камері Уссінга .....	56
2.10.Визначення парацелюлярної проникності епітеліального бар'єра товстої кишки.....	58
2.11.Культивування клітин лінії COLO 205.....	59
2.12.Бактеріологічні дослідження .....	60
2.12.1. Приготування бактеріологічних суспензій.....	60
2.12.2. Побудова кривої росту бактерій.....	61
2.12.3. Визначення життєздатності мікроорганізмів.....	61
2.12.4. Визначення здатності до біоплівкоутворення.....	62
2.12.5. Визначення антибіотикочутливості.....	62
2.12.6. Визначення кількості молочної кислоти .....	63
2.12.7. Бактеріологічний аналіз пристінкової мікробіоти товстої кишки щурів .....	64
2.12.8. Визначення транслокації бактерій у кров.....	64
2.13.Визначення проникності ендотелію товстої кишки щурів.....	65
2.14.Активність мієлопероксидази слизової оболонки товстої кишки.....	65
2.15.Визначення глікопротеїнів слизу за методом Шиф-реакції.....	66
2.16.Вестерн-блот аналіз.....	67
2.17.Розрахунок розміру вибірки.....	69
2.18.Статистична обробка результатів.....	69
<b>РОЗДІЛ 3 ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКЦІЇ КЛІТИН COLO 205 ТА ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ТОВСТОЇ КИШКИ НА ТВЕРДІ НАНОЧАСТИНКИ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>71</b>
3.1. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини берези .....	71

<b>3.2. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання кори берези .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі .....</b>	<b>78</b>
<b>3.4. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини сосни.....</b>	<b>81</b>
<b>3.5. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання гілля сосни .....</b>	<b>84</b>

## **РОЗДІЛ 4 ХАРАКТЕРИСТИКА БАР'ЄРНОЇ ФУНКЦІЇ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ КОРОТКО- І ДОВГОТРИВАЛОЇ ЕКСПОЗИЦІЇ ТВЕРДИХ НАНОЧАСТИНОК ПРИРОДНОГО ТА АНТРОПОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ.....**

<b>4.1. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на бар'єрну функцію товстої кишки щурів за різних шляхів одноразового введення .....</b>	<b>91</b>
<b>4.1.1. Зміни бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів за внутрішньовенного введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1.2. Зміни бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів після перорального введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження.....</b>	<b>94</b>
<b>4.2. Характеристика прозапальних змін у товстій кишці щурів після 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження.....</b>	<b>98</b>
<b>4.2.1. Вплив 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження на клінічні показники стану щурів .....</b>	<b>98</b>

4.2.2. Зміни слизового бар'єра товстої кишки щурів після 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження<sup>99</sup>

4.2.3. Порушення електрофізіологічних показників епітелію товстої кишки щурів після 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження ..... 104

4.3. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на перебіг запальних процесів у кишечнику щурів за йодоацетамід-індукованого коліту ..... 110

4.3.1. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на зміни проникності слизової оболонки товстої кишки за йодоацетамід-індукованого коліту ..... 110

4.3.2. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на іонний транспорт та трансепітеліальну проникність товстої кишки щурів за йодоацетамід-індукованого коліту..... 112

4.3.3. Ефект твердих наночастинок природного та антропогенного походження на прозапальні зміни за умови йодоацетамід-індукованого коліту..... 114

**РОЗДІЛ 5 ХАРАКТЕРИСТИКА КІЛЬКІСНИХ ТА ЯКІСНИХ ЗМІН ПРЕДСТАВНИКІВ МІКРОБІОТИ КИШЕЧНИКА ПІСЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ У СЕРЕДОВИЩІ ІЗ ТВЕРДИМИ НАНОЧАСТИНКАМИ..... 119**

5.1. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники та чутливість до антибіотиків *Escherichia coli* B-906 ..... 124

5.2. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники та чутливість до антибіотиків *Staphylococcus aureus* B-918 ..... 132

<b>5.3. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники, здатність до утворення біоплівки та продукування молочної кислоти <i>Lactobacillus plantarum</i> 691 .....</b>	<b>119</b>
<b>УЗАГАЛЬНЕННЯ.....</b>	<b>141</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>153</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>156</b>
<b>ДОДАТОК А.....</b>	<b>183</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

- АФК – активні форми кисню;
- ВК – виразковий коліт;
- ГС – тверді наночастинки, отримані від згорання гілля сосни;
- ДБ – тверді наночастинки, отримані від згорання деревини берези;
- ДТ – тверді наночастинки, отримані від згорання деревини тополі;
- ДС – тверді наночастинки, отримані від згорання деревини сосни;
- ЕБ – (барвник) Еванс блакитний;
- ЗЗК – запальні захворювання кишечника;
- ЙА – йодоацетамід;
- КБ – тверді наночастинки, отримані від згорання кори берези;
- КЖК – кількість життєздатних клітин
- КЛЖК – коротколанцюгові жирні кислоти;
- КУО – колонієутворююча одиниця;
- ММ – тверді наночастинки, отримані від згорання медичних масок;
- МПО – мієлопероксидаза;
- МЦ – метилцелюлоза;
- ПВДФ – полівінілідендифлуорид;
- СФР – стерильний фізіологічний розчин;
- ТНЧ – тверді наночастинки;
- ТЧ – тверді частинки;
- ХК – хвороба Крона
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт;
- EGR-1 – early growth response 1 (білок ранньої відповіді 1);
- FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеїн ізотіоціанат);
- $I_{sc}$  – струм короткого замикання
- TJ – tight junction (щільні контакти).

## ВСТУП

**Актуальність.** Останні десятиліття спостерігається швидкий розвиток урбанізації та індустріалізації суспільства, що приводить до значного збільшення забруднення повітря. Відповідно до дослідження Global Burden of Disease, забруднення повітря знаходиться на четвертому місці серед факторів ризику захворювань та передчасної смертності, викликаючи понад 13 мільйонів смертей щорічно [1]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, близько 90 % населення дихає повітрям, яке не відповідає максимально допустимим нормам забрудненості [2].

Забруднення повітря може бути обумовлене різноманітними речовинами, але особливу небезпеку представляють тверді частинки (ТЧ). Ці частинки можуть проникати в організм людини, спричиняючи розвиток запальних, оксидативних та канцерогенних процесів. Відмічається, що ТЧ не лише викликають респіраторні [3, 4] та серцево-судинні [5–7] захворювання, але й можуть сприяти розвитку захворювань травної системи, таких як коліт, хвороба Крона та синдром подразненого кишечника [8–11].

Бар'єрна функція кишечника полягає у запобіганні проникненню шкідливих речовин, токсинів та патогенних мікроорганізмів з кишкового простору до внутрішнього середовища організму, одночасно забезпечуючи утримання корисних речовин та мікроорганізмів у кишечнику. Це досягається завдяки інтегрованій системі механічних, біохімічних та імунологічних процесів, які забезпечують цілісність та регулювання проникнення речовин через епітеліальний шар кишечника [12–15]. Кишкова мікробіота також бере участь у підтримці сталості кишкового бар'єра, забезпечуючи захист від потенційно шкідливих мікроорганізмів, продукцію корисних метаболітів та регуляцію імунної відповіді [16–19].

Низка досліджень показала, що ТЧ здатні порушувати цілісність кишкового бар'єра [20], збільшувати експресію прозапальних цитокінів [21, 22], змінювати

кількісне співвідношення і видову різноманітність кишкової мікробіоти [23–25], що може призводити до дисбіотичних порушень та розвитку запальних захворювань кишечника (ЗЗК) [18, 26]. Крім того, відомо, що ТЧ можуть впливати на метаболічні процеси в кишечнику, зокрема, змінюючи активність ферментів та концентрацію коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) [24].

Однак, наведені дослідження використовували ТЧ розміром 2,5-10 мкм, проте найбільшу небезпеку становлять ТЧ діаметром 100 нм і менше (тверді наночастинки, ТНЧ). В залежності від розміру, походження та складу ТЧ мають різні ступінь токсичності та силу впливу на організм, тому дослідження механізму дії ТНЧ на бар'єрну функцію кишечника та їхньої ролі у розвитку запальних процесів критично важливими для створення ефективних стратегій попередження, лікування та профілактики ЗЗК.

**Мета і завдання:** Метою дисертаційного дослідження було оцінити ефект дії твердих карбонвмісних наночастинок-забруднювачів повітря природного та антропогенного походження на стан бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки, її прозапальні зміни та метаболічну активність кишкової мікробіоти в умовах *in vitro*, *ex vivo* та *in vivo*.

Відповідно до зазначеної мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити ступінь токсичності твердих наночастинок, отриманих від згоряння різних порід деревини та деревних компонентів, на життєздатність клітин кишечника лінії COLO 205 та функції епітелію товстої кишки щурів.

2. Порівняти ефект дії твердих наночастинок природного та антропогенного походження на стан бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів за різних шляхів гострого введення твердих наночастинок.

3. Схарактеризувати зміни бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів за довготривалої експозиції твердих наночастинок природного та антропогенного походження.

4. Оцінити ефект дії твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ступінь прозапальних змін в слизовій оболонці товстої кишки щурів та схильність до розвитку коліту.

5. Порівняти дії твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники та метаболічну активність представників транзиторної та облігатної нормобіоти кишечника.

**Об'єкт дослідження:** бар'єрна функція слизової оболонки товстої кишки щурів у нормі та за умов модельованого коліту.

**Предмет дослідження:** вплив твердих карбонвмісних наночастинок природного та антропогенного походження на стан бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів у нормі та за умов модельованого коліту.

**Методи дослідження:** У роботі були застосовані бактеріологічні (визначення загальної кількості бактерій шляхом посіву на селективні середовища), цитологічні (культивування та визначення життєздатності клітин), хіміко-аналітичні (визначення кислотності молока методом титрування з NaOH), імунологічні (Вестерн-блот), електрофізіологічні (дослідження функції епітеліального препарату товстої кишки за допомогою системи камер Уссінга), фізіологічні, спектрофотометричні та біохімічні методи.

**Наукова новизна результатів.** Вперше системно досліджено вплив твердих наночастинок, отриманих від згорання різних матеріалів як природного, так і антропогенного походження, на бар'єрну функцію кишечника: 1) нами вперше експериментально визначено ступінь токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання 3-х порід деревини та 2-х типів деревних компонентів, *in vitro* та *ex vivo*; 2) встановлено комплексну дію твердих наночастинок природного та антропогенного походження на кишечник, показана їхня здатність порушувати цілісність кишкового бар'єра та підтверджено залежність механізму їхнього впливу від шляху введення в організм; 3) визначено чіткі зв'язки між походженням, дозою та тривалістю дії твердих наночастинок і їх впливом на кишечник; 4) показано здатність твердих наночастинок порушувати бар'єрну

функцію кишечника шляхом зменшення гліканової частини слизової оболонки, зміни складу кишкової мікробіоти, збільшення парацелюлярної проникності та порушення іонного транспорту, а також посилення імунної відповіді; 5) нами експериментально доведено здатність твердих наночастинок збільшувати схильність до розвитку коліту; 6) вперше показано вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники, метаболічні й адгезивні властивості окремих представників облигатної (*Lactobacillus plantarum*) та транзиторної (*Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*) мікробіоти кишечника.

**Практичне значення.** Результати дослідження дозволяють краще розуміти потенційні ризики, пов'язані з контактом із твердими наночастинами, що можуть утворюватися при згорянні деревини, пожежах, під час перероблення сміття тощо, та їхню роль у патогенезі запальних захворювань кишечника. Отримані результати можуть стати основою для розробки нових стратегій профілактики та лікування дисфункції шлунково-кишкового тракту, що виникають після потрапляння в організм твердих карбонвмісних наночастинок. А виявлені зміни у мікробіоті кишечника можуть вказувати на можливі шляхи розвитку нових напрямків для захисту кишечника від небезпечних впливів наночастинок.

Матеріали дисертації впроваджені у навчальний процес при викладанні курсу «Основи молекулярної фармакології» на кафедрі супрамолекулярної хімії Навчально-наукового інституту високих технологій та «Лабораторного практикуму з біофізики» на кафедрі біофізики та медичної біоінформатики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, а також в онлайн-практикуми Open Educational Resources Інформаційного центру науки і техніки імені Лейбніца у Німеччині.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертанткою самостійно був проведений інформаційний пошук, експериментальні дослідження, аналіз і статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів досліджень.

Формування ідеї роботи, планування схеми експерименту та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, обговорення отриманих результатів і формулювання висновків було проведено за участі наукового керівника.

Допомогу та супровід у проведенні досліджень надавали: н.с., к.б.н. Довбинчук Т.В. (моделювання експериментального коліту, дослідження функцій епітеліальних препаратів товстої кишки); доц., к.б.н. Сергійчук Т.М. (мікробіологічні дослідження), проф., д.б.н. Гарманчук Л.В. (робота із культурою клітин).

Синтез і підготовка препаратів із твердими наночастинками були виконані відділом нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом проф., д.б.н. Борисової Т.О. Дана співпраця відображається у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: VIII та IX Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень» (2021, 2022, Київ, Україна); IV International Scientific Conference «Microbiology and Immunology - the development outlook in the 21st century». (September 22-23, 2022, Kyiv, Ukraine); 30th United European Gastroenterology Week 2022 (October 8-11, 2022, Vien, Austria); I Молодіжній науково-практичній інтернет-конференції Youth Biological Conference, (15 квітня 2023, Київ, Україна), XX Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя» (27-28 квітня 2023, Київ, Україна).

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана за грантової підтримки Національного фонду досліджень України в рамках проєкту «Глутамат/ГАМК сигналювання в двонаправленій системі комунікації кишечник - мозок: фокус на шкідливий

вплив карбон-вмісних наночастинок-забруднювачів повітря» (№2020.02/0147, 2020-2023).

Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради Навчально-наукового інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №4 від 11 листопада 2019 року.

Уточнення теми дисертаційної роботи затверджено на засіданні Вченої ради Навчально-наукового інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 11 від 21 червня 2023 року.

**Публікації.** За темою дисертаційного дослідження опубліковано 9 наукових праць, серед них 3 статті у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України, з яких 2 публікації у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus (з них 1 публікація у періодичному науковому виданні, віднесеному до другого квартилю (Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank), а також 6 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень і їх обговорення, узагальнення, висновків, списку використаних джерел (250 посилань). Дисертаційна робота викладена на 185 сторінках (з яких 134 сторінки основної частини), містить 6 таблиць і 48 рисунків.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Характеристика бар'єрної функції кишечника

Бар'єрна функція кишечника є складним інтегрованим механізмом, який виконує подвійну роль: забезпечує селективне поглинання і запобігає проникненню патогенів і токсинів до системного кровообігу.

У першу чергу, кишковий бар'єр виконує важливу функцію фізичного й імунологічного захисту від мікроорганізмів, вірусів, харчових антигенів і токсинів зовнішнього середовища. Цей бар'єр діє як перешкода, що запобігає проникненню шкідливих речовин у внутрішнє середовище організму [13].

У той же час кишковий бар'єр є вибірково проникним, він дозволяє переміщення основних дієтичних поживних речовин, електролітів, амінокислот, коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК), цукрів, води та окремих мікробних метаболітів з просвіту кишечника до кровообігу. Процес всмоктування поживних речовин є необхідним для забезпечення нормального функціонування організму та підтримки енергетичного балансу [27–29].

Кишковий бар'єр також регулює і сприяє розвитку імунної толерантності до харчових антигенів та нормальної комунікації з кишковою мікробіотою. Клітини імунної системи взаємодіють з епітелієм кишечника, щоб забезпечити адекватну імунологічну відповідь та запобігти надмірній запальній реакції [30].

##### 1.1.1. Будова кишкового бар'єра

Кишковий бар'єр являє собою складну багатошарову структуру, до якої входять епітеліальний шар, слизовий шар та розташовані під ним імунні клітини.

Епітеліальний шар складається з одношарового циліндричного епітелію, який утворює неперервну оболонку на поверхні кишечника. Епітеліальні клітини мають різну функціональну спеціалізацію та морфологію, залежно від їх розташування в кишечнику. Основними типами епітеліальних клітин є ентероцити, келихоподібні клітини, ентероендокринні клітини, клітини Панета та М-клітини [14].

Ентероцити є найпоширенішим типом клітин і відповідають за поглинання поживних речовин, секрецію антимікробних агентів та регуляцію проникнення речовин через епітеліальний шар. Келихоподібні клітини виробляють і вивільняють муцин, що утворює слиз для забезпечення захисного шару навколо епітелію. Ентероендокринні клітини синтезують та виділяють гормони та нейромедіатори, що регулюють функції кишечника та імунної системи, наприклад, відповідають за загоєння ран епітеліальними клітинами. Клітини Панета синтезують антимікробні пептиди та лізоцим, які знищують патогени, а М-клітини сприяють транспортуванню антигенних частинок до імунних клітин [31, 32].

Слизовий шар переважно складається з глікопротеїнів – муцинів, які є високомолекулярними білками, що містять велику кількість олігосахаридних ланцюгів. У кишечнику ідентифіковано понад 20 типів муцинів, які поділяються на дві групи: секреторні (гель-формуєчі), що включають MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC19, та мембранозв'язані, що локалізуються на апікальній мембрані епітелію [33].

Структура муцинів характеризується наявністю тандемних повторів (variable number tandem repeats, VNTR), які містять велику кількість амінокислотних залишків серину і треоніну. Ці повтори приєднуються олігосахаридами, що формують глікан, який складає 60-80 % маси молекули муцину [34].

Хоча слиз, розташований по всьому кишечнику, містить однакові біологічні компоненти, властивості слизу змінюються залежно від відділу кишечника, в

якому він розташований [35]. Тонка кишка містить один шар слизу, який нещільно прикріплений до епітелію і є легкопроникним. Товщина слизового шару тут становить приблизно 150-300 мкм. Дистальний відділ товстої кишки містить два шари слизу: адгезивний внутрішній шар слизу та слабкоадгезивний зовнішній шар слизу[36]. Внутрішній слизовий шар товстої кишки по суті стерильний, а зовнішній слизовий шар утримує кишкову мікробіоту. У сукупності товщина цих двох шарів становить близько 700 мкм [36].

Кишковий бар'єр включає різні імунні клітини, такі як Т- і В-лімфоцити, які взаємодіють для захисту кишечника від патогенів і запобігання запаленню. Т-лімфоцити, зокрема CD4+ та CD8+ Т-клітини, мають ключову роль у регуляції імунної відповіді та контролю запалення в кишечнику. Вони взаємодіють з іншими клітинами імунної системи, такими як макрофаги та дендритні клітини, і виробляють специфічні цитокіни, які впливають на вогневу відповідь та регуляцію запалення [37, 38]. В-лімфоцити виробляють антитіла, що допомагають розпізнавати інфекційні агенти та нейтралізувати їх дію. У кишечнику присутні повністю диференційовані клітини В-лімфоцитів, відомі як плазматичні клітини. Ці клітини продукують значну кількість антитіл, зокрема секреторного класу IgA. IgA виконують важливу функцію у захисті слизової оболонки, оскільки специфічно розпізнають інфекційні агенти та перешкоджають їх проникненню через епітеліальний бар'єр [39, 40].

### **1.1.2. Регуляція проникності кишкового бар'єра**

Регуляція проникності кишкового бар'єра являє собою комплексний механізм, який забезпечує селективне проникнення речовин через епітеліальний шар кишечника, одночасно запобігаючи проникненню шкідливих мікробіологічних агентів та токсинів. Це досягається завдяки різноманітним

міжклітинним з'єднанням, що забезпечують фізичну зв'язаність між клітинами та регулюють проникність через клітинний шар.

Одним з основних механізмів міжклітинної регуляції є щільні контакти (tight junctions, TJ) [13, 16]. Білки щільних контактів, такі як клаудини, оклюдини та *zonula occludens* (ZO), утворюють комплекси, які з'єднуються між собою та з актиновим цитоскелетом внутрішньої сторони клітин [41–43]. Ці білки розташовані на апікальній стороні епітеліального шару та утворюють суцільне поясоподібне кільце на стику між апікальною та латеральною мембраною епітеліальних клітин [15]. Білки TJ регулюють проникність через парацелюлярний (простір між клітинами) шлях. Вони контролюють розмір пор та вибірково пропускають речовини, що дозволяє епітелію перешкоджати проникності шкідливих речовин, токсинів та мікробним патогенам через клітинний шар [44].

Білки TJ взаємодіють з різними внутрішньоклітинними молекулами, такими як білки адгезивних контактів (adherens junctions, AJ), десмосоми та цитоскелет, що забезпечує стійкість та цілісність міжклітинних з'єднань [43]. Цей взаємозв'язок допомагає підтримувати функціональну проникність кишкового бар'єра та захищає його від несприятливого впливу зовнішнього середовища [43].

Крім того, міжклітинна регуляція проникності залежить від різних посттрансляційних модифікацій білків, які складають міжклітинні з'єднання. Ці модифікації включають фосфорилювання, глікозилювання та протеолітичний розклад білків, які можуть впливати на їх функцію та структуру. Наприклад, фосфорилювання клаудинів та оклюдинів може регулювати їх взаємодію та проникність через міжклітинні проміжки [45].

Крім білків TJ, інші міжклітинні з'єднання, такі як з'єднання типу AJ та десмосоми, також впливають на регуляцію проникності кишкового бар'єра. Вони забезпечують механічну стійкість і з'єднання між клітинами, що сприяє

збереженню цілісності тканини і захисту від проникнення патогенних мікроорганізмів та інших шкідливих речовин [13, 16].

### **1.1.3. Порушення бар'єрної функції кишечника у патогенезі запальних захворювань кишечника**

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК) є групою хронічних захворювань, які характеризуються запаленням шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Дві найбільш поширені форми ЗЗК – хвороба Крона (ХК) і виразковий коліт (ВК) [46].

ХК є запальним захворюванням, яке може вражати будь-яку ділянку ШКТ: від ротової порожнини до анального отвору [47]. Хвороба характеризується утворенням запальних ділянок, які можуть виявлятися у вигляді виразок, стенозів та гранулематозних запалень. ХК може призводити до позакишкових ускладнень і має багато загальних симптомів, таких як діарея, біль у животі, ректальна кровотеча, втрата ваги та енергії [48].

ВК – хронічний запальний стан, який часто поширюється від прямої кишки до інших ділянок товстої кишки [49]. Він характеризується симптомами запалення, такими як кровотеча, невідкладність (відчуття необхідності негайного випорожнення) і тенезми (тягучий біль з відчуттям неповної дефекації) [50–52]. ВК може мати рецидивно-ремісійний характер з періодами активності та ремісії [53].

Хоча етіологія ЗЗК залишається невідомою, останні дослідження показують, що підвищена кишкова проникність є ключовим фактором у їх патогенезі. Пацієнти з активною формою ЗЗК мають підвищену кишкову проникність, яка може бути прогностичною ознакою рецидивів [54]. Також дослідження показали, що підгрупа пацієнтів із високим ризиком ЗЗК має або підвищену кишкову проникність на початковому рівні, або надмірне збільшення проникності у

відповідь на стимуляцію. При цьому у 10-25 % родичів пацієнтів із ЗЗК також спостерігається збільшена кишкова проникність [54–57].

Експериментальні дослідження на мишах підтверджують зв'язок між порушенням кишкової бар'єрної функції та ЗЗК. Миші з генетичними модифікаціями, які призводять до симптомів, подібних до ЗЗК, мають підвищену кишкову проникність ще до розвитку захворювання. Наприклад, в  $IL-10^{-/-}$  мишей розвивається ХК-подібний коліт з підвищеною кишковою проникністю, яку можна знизити лікуванням антагоністом зонуліну [58–60]. Інші моделі мишей, які мають генетичні модифікації, такі як  $mdr1a^{-/-}$  і  $SAMP/Yit$ , також демонструють зв'язок між кишковою проникністю і розвитком коліту [61, 62].

Дослідження на мишах також показують, що інші фактори, такі як зміни в експресії білків зонуліну і клаудину, можуть сприяти розвитку ЗЗК. Зміни в цих білках можуть впливати на щільність міжклітинних контактів і сприяти підвищенню кишкової проникності [63, 64]. Окрім цього, зміни в експресії білків TJ також можуть впливати на бар'єрну функцію епітелію кишечника. Наприклад, зниження експресії оклюдину і зміни в розподілі клаудину-2, -3, -4, -5 та -8 можуть призводити до порушення бар'єрної функції у пацієнтів із ЗЗК [65, 66]. Однак, ці зміни можуть бути наслідком патогенезу захворювання, а не його причиною.

Збільшення відшарування епітеліальних клітин також може призводити до підвищеної проникності кишечника [67]. Дослідження на  $IL-10^{-/-}$  мишах показали, що збільшення частоти епітеліальних щілин у кишці корелює з підвищеною кишковою проникністю [68]. Крім того, такі цитокіни, як фактор некрозу пухлини альфа ( $TNF-\alpha$ ) та інтерферон гамма ( $IFN-\gamma$ ), можуть збільшувати відшарування епітеліальних клітин, що вказує на участь надмірної запальної реакції у сприянні посилення кишкової проникності [69–71].

Недавні дослідження також вказують на те, що підвищена кишкова проникність сама по собі може бути недостатньою для виникнення ЗЗК. В одному з таких досліджень використовувалися трансгенні миші, у яких активна міозинкіназа легкого ланцюга конститутивно експресувалася у кишковому епітелії

[72]. Ці миші мали значну дисфункцію кишкового бар'єра та підвищену кишкову проникність, однак це не спричиняло спонтанний розвиток коліту. Припускається, що інші фактори, наприклад, дисбаланс мікробіоти чи підвищена імунна відповідь, також можуть відігравати роль у розвитку ЗЗК.

## 1.2. Роль мікробіоти у бар'єрній функції кишечника

Мікробіота кишечника – це багатошарове та складне співтовариство мікроорганізмів, яке здатне виконувати різноманітні функції та впливати на здоров'я макроорганізму. Вона складається з тисяч видів бактерій, які нараховують понад 100 трильйонів клітин [73]. Найпоширеніші філуми бактерій, що населяють кишечник, включають *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* та інші [74]. Кожен з цих філумів містить багато різних родів та видів бактерій. Конкретний склад мікробіоти кишечника може варіювати від особи до особи, залежно від різних факторів, таких як генетика, дієта, вік, стан здоров'я та використання лікарських препаратів. Крім того, мікробіота може змінюватися від часу до часу в реакції на зміни у середовищі та життєвих умовах [75].

Мікробіота кишечника розташована головним чином в слизовому шарі кишечника. При цьому розташування є неоднорідним, найбільш інтенсивна колонізація спостерігається у товстій кишці, де слизовий шар є товстішим [76, 77]. Мікроорганізми взаємодіють з муцином, який служить для них джерелом вуглецю та енергії [78]. Деякі види бактерій, зокрема коменсальні мікроорганізми, можуть виробляти фактори, які полегшують їхню адгезію до слизового шару. Це дозволяє їм встановити стабільні взаємовідносини з господарем. Подібна адаптація була виявлена у *Lactobacillus* і *Bacteroides*, де присутність багатоповторних адгезинів на поверхні клітини дозволяє утримувати бактерії в шарі слизу [35, 79].

Також виявлено, що на поверхні слизової оболонки деякі бактерії утворюють біоплівки – складні мікробні спільноти, вбудовані у позаклітинний матрикс полімерних речовин. Ці біоплівки спостерігаються у кишечнику здорових мишей, щурів і людей та забезпечують додатковий захисний бар'єр між мікробіотою та епітеліальними клітинами кишечника, у тому числі – від патогенів [80–83].

Синтрофна та симбіотична взаємодія мікробів у шарі слизу створює середовище, здатне не тільки керувати селекцією мікробної спільноти, а й регулювати секрецію слизу. Дослідження показали, що кількість келихоподібних клітин у germ-free (у яких відсутні мікроорганізми) мишей та щурів була зниженою, а їхній розмір зменшився вдвічі порівняно зі звичайними мишами [84–86]. Відповідно, шар слизу у таких тварин був тоншим і містив більше нейтральних і сульфатованих муцинів. При цьому після колонізації germ-free тварин кишковою мікробіотою здорових тварин, властивості слизового шару ставали такими ж, як у звичайних тварин [87].

Зміни у слизовому шарі відбуваються і під час колонізації кишечника патогенними мікроорганізмами. Патогени можуть впливати на слизовий шар кількома способами: індукувати гіперсекрецію муцину, пригнічувати його вироблення, знижуючи активність келихоподібних клітин, розкладати або змінювати глікозилювання, змінювати властивості муцину і його здатність взаємодіяти з іншими молекулами [12].

Такі порушення слизового бар'єра можуть спричинити переміщення коменсальних і патогенних мікроорганізмів, а також їхніх метаболітів до поверхні епітелію. Це може стимулювати вивільнення TNF- $\alpha$  й IFN $\gamma$ , які здатні підсилювати запальну відповідь та збільшувати проникність епітелію [12, 88].

З іншого боку, деякі бактерії сприяють зниженню проникності епітелію шляхом вивільнення цитокінів, які мають протизапальний ефект. Наприклад, TGF- $\beta$  (трансформуючий фактор росту бета) та IL-10 можуть зменшувати запальну відповідь і підтримувати цілісність епітеліального бар'єра [88].

Вплив на імунний статус та метаболізм господаря відбувається, у тому числі, за допомогою синергетичного ефекту мікробних метаболітів. Кишкова мікробіота метаболізує харчові компоненти, розкладаючи їх на різні метаболіти та виробляючи широкий спектр активних метаболітів. Ці метаболіти можуть бути отримані з харчових продуктів, синтезовані *de novo* або модифіковані з вже синтезованих господарем [16].

На сьогоднішній день, за оцінками вчених, в кишечнику людини мікроорганізмами виробляються близько 50 000 мікробних метаболітів, серед яких виокремлюють КЛЖК, вітаміни (зокрема вітамін К та вітаміни групи В), похідні індолу, метаболіти жовчних кислот, кон'юговані жирні кислоти, поліаміни, бактеріоцини, аутоіндуктори та інші [89–91].

КЛЖК – низькомолекулярні жирні кислоти з вуглецевим ланцюгом довжиною від 2 до 6 вуглецевих атомів, які утворюються в результаті метаболізму харчових волокон такими мікроорганізмами, як *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Enterobacter*, *Faecalibacterium* [17, 92, 93]. Основні КЛЖК – ацетат, пропіонат та бутират – використовуються колоноцитами як паливо для синтезу АТФ, надаючи їм енергію для функціонування та збереження цілісності епітелію [19, 94]. Крім того, вони впливають на диференціювання імунних клітин господаря, а також регулюють сприйнятливність до інших патогенів [12, 95].

Особливу увагу звертають на бутират, який крім енергетичної функції також виявляє протизапальні властивості [96, 97]. Він здатний інгібувати запальні процеси в кишечнику шляхом модуляції вироблення цитокінів та інших запальних медіаторів. Nielsen et.al. показали, що низькі концентрації бутирату сприяють значному збільшенню експресії MUC2 – головного муцину слизового шару [98]. У той же час, високі концентрації бутирату знижували виробництво MUC2, і, відповідно, таким чином знижували бар'єрну функцію кишечника [98–100].

Дослідження також вказують на те, що КЛЖК стимулюють експресію білків TJ у клітинах епітелію кишечника. Лікування з використанням КЛЖК знижує парацелюлярний транспорт, експресію білків ZO-1, клаудину й оклюдину, посилює

інгібування активації NLRP3 інфламасоми та аутофагії [101, 102]. Крім того, лікування бутиратом призводить до зниження рівня IL-1 $\beta$ , що свідчить про його користь у захисті від порушення бар'єра, спричиненого запаленням [103].

Здатність впливати на цілісність кишкового бар'єра шляхом регулювання продукування цитокінів та/або експресію білків TJ показали також й інші мікробні метаболіти, зокрема індол [104], дезоксихолева та урсохолева кислоти [105, 106], кон'югована лінолева кислота [107, 108], спермідин та інші поліаміди [109, 110], уролітин [111].

Таким чином, зміни у складі мікробіоти кишечника можуть впливати на бар'єрну функцію шляхом регулювання цитокінів, продукції слизу, експресії білків TJ і виробництва метаболітів. Ці зміни дедалі більше пов'язують із ЗЗК, які часто супроводжуються пошкодженням кишкового бар'єра. Дослідження показують, що у хворих на ЗЗК перебіг хвороби супроводжується дисбактеріозом [26, 112, 113]. Наприклад, зниження представників родів *Faecalibacterium*, *Coprococcus* і *Roseburia* та збільшення кількості патогенних бактерій, таких родів як *Ruminococcus* і *Escherichia*, було пов'язано зі збільшеною проникністю кишкового бар'єра та розвитком запалення у хворих на ХК та ВК [18, 112–114]. Однак, залишається незрозумілим, причиною чи наслідком запалення є дисбактеріоз, який виникає у хворих на ЗЗК.

### 1.3. Тверді частинки як складові забрудненого повітря

Забруднення атмосферного повітря являє собою процес проникнення в атмосферу Землі шкідливих агентів різного походження та хімічного складу, що негативно впливає на здоров'я та життєдіяльність живих організмів. У всьому світі внаслідок впливу забруднювачів повітря середня тривалість людського життя скорочується приблизно на 1,8 року [115]. У 2019 році забруднення повітря стало причиною 46 100 передчасних смертей в Україні (рис. 1.1.).

Близько 90 % людей дихають повітрям, яке не відповідає максимально допустимим нормам забрудненості [2]. Найвразливішими до впливу забрудненого повітря групами є діти, вагітні жінки, люди похилого віку та люди із захворюваннями серця та легень [116]. Більшу ймовірність зазнати впливу вищих рівнів забруднення повітря мають і ті, хто знаходиться у несприятливому становищі, пов'язаним із соціально-економічними чинниками або етнічною приналежністю [117]. Крім того, щороку близько 3 мільярдів людей стикаються з високим рівнем забруднення повітря у своїх домівках, оскільки вони використовують природні палива, газ та вугілля для готування їжі, опалення житла та інших побутових потреб [118].

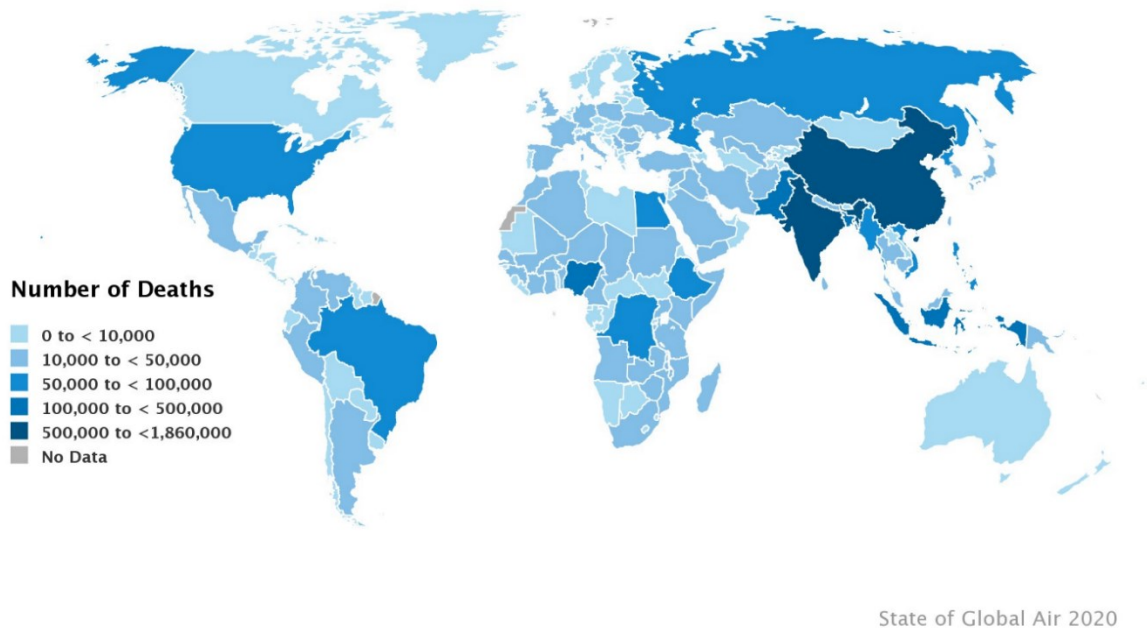


Рис. 1.1. Мапа смертності, спричиненої забрудненням повітря по всьому світу у 2019 році. [119]

Склад забрудненого повітря залежить від джерел забруднення, обсягу та швидкості викидів, погодних умов та інших факторів. Джерела забруднення повітря можуть бути природними (наприклад, вулканічні викиди та лісові пожежі, природні катаклізми) або антропогенними (пов'язаними з діяльністю людини) [120].

За локалізацією забруднення поділяють на внутрішні та зовнішні [121]. Внутрішнє забруднення характеризується наявністю шкідливих контамінантів у повітрі в закритих просторах, таких як житлові будинки, офіси, школи тощо. Такі забруднювачі можуть походити з різних джерел: процесів згоряння, будівельних матеріалів, побутових хімікатів, тютюнового диму та біологічних агентів. Типовими забруднювачами повітря в приміщенні є леткі органічні сполуки, формальдегід, оксид вуглецю, діоксид азоту, частки пилу, пліснява, пилок та алергени. Зовнішнє забруднення – це забруднення навколишнього середовища, яке відбувається в наслідок викидів від транспортних засобів, промислової діяльності, електростанцій, сміттєспалювальних та нафтохімічних заводів, літаків, кораблів тощо. Типовими зовнішніми забруднювачами повітря є оксиди азоту, оксиди сірки, озон, вуглекислий і чадний газ та тверді частинки (ТЧ).

На сьогодні Global Burden of Disease виокремлює вплив трьох основних забруднювачів повітря: приземний озон, побутове забруднення та ТЧ [1]. За останніми даними Всесвітньої організації охорони здоров'я саме забруднення атмосферного повітря ТЧ стало причиною 4,2 мільйона передчасних смертей у всьому світі у 2019 році [122].

### **1.3.1. Характеристика та класифікація твердих частинок**

ТЧ є групою забруднювачів повітря, які містять вуглецеві сполуки з органічними речовинами та/або важкими реакційноздатними металами, такими як мідь, цинк, залізо, ванадій та нікель [123]. Вони також можуть містити сульфати, нітрати, поліциклічні ароматичні вуглеводні тощо. Розмір і форма ТЧ можуть варіюватися. Вони можуть мати як елементарну, так і складну хімічну структуру. Крім того, їх склад може змінюватися при взаємодії з іншими ТЧ, а також під впливом окислювальної дії озону або низького рівня рН навколишнього середовища [124].

ТЧ можуть мати як природне, так і антропогенне походження. Природні джерела включають лісові пожежі, природні пилові бурі, пилок, морську сіль. Антропогенні джерела ТЧ – це частинки пластику, транспортні вихлопи, аерозолі та інше [125–127].

Основним параметром класифікації ТЧ є їх розмір. За розміром частинок виділяють грубі, дрібні та наддрібні частинки.

Грубі частинки (ТЧ<sub>10</sub>) мають діаметр до 10 мкм, є найбільшими серед всіх частинок і можуть бути видимими у повітрі. Вони містять широкий спектр частинок різного походження і складу. До ТЧ<sub>10</sub> належать пил, пилок, спори грибів, частинки ґрунту, зола, оксиди металів та багато іншого [127, 128]. Через їхній розмір період існування цих частинок триває від хвилини до кількох годин, а їх розповсюдження може досягати 10 км [128, 129]. ТЧ<sub>10</sub> можуть проникати в організм, здебільшого осідаючи у верхніх дихальних шляхах або трахеї [130].

Дрібні частинки (ТЧ<sub>2.5</sub>) мають діаметр 2,5 мкм. Ці частинки можуть перебувати у повітрі протягом тривалого періоду часу, який може становити від кількох тижнів до місяців [128]. Вони також можуть розповсюджуватись на значні відстані, досягаючи сотень або навіть тисяч кілометрів [127, 129]. Оскільки розмір ТЧ<sub>2.5</sub> дуже малий, вони можуть у бронхи та альвеоли легень [131]. Це робить їх особливо небезпечними для здоров'я.

Надрібні (нано)частинки (ТЧ<sub>0.1</sub>) розміром менше 100 нм є найдрібнішими серед забруднюючих компонентів повітря [132]. Частинки такого розміру можуть уникнути захисної дії мукоциліарного кліренсу та поглинання альвеолярними макрофагами. Вони проникають глибоко в дихальні шляхи, зокрема до альвеол, де можуть попадати у кровоносну систему. Дослідження показують, що легені є основною мішенню для цих частинок, хоча їх також можуть виявити в інших органах, таких як печінка, нирки, серце та мозок [133]. Ці частинки здатні перетинати клітинні мембрани та безпосередньо взаємодіяти з клітинними структурами. Дослідження на тваринах та *in vitro* показали, що гострий вплив

ТЧ<sub>0.1</sub> може призводити до змін у функції легень і запалення дихальних шляхів [134].

Токсичність та патофізіологічні механізми дії різних видів ТЧ теж можуть значно варіюватися. Деякі з них можуть бути мутагенними, спричиняти окисне пошкодження макромолекул, активувати запальні процеси та призводити до загибелі клітин [135]. Ці пошкодження клітин на молекулярному рівні, включаючи мітохондрії та ДНК, можуть активувати сигнальні шляхи апоптозу.

Присутність металів у складі ТЧ, зокрема заліза, може сприяти підвищенню активності ферментів супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази, що може призводити до фероптозу (залежного від заліза виду клітинної смерті) [136]. ТЧ<sub>2,5</sub> можуть активувати шляхи аутофагії, що залежать від цитокінів, передаючи сигнали через toll-подібні рецептори, шлях JAK-STAT (Янус-кіназа) для активації транскрипції, а також через мітохондріальну циклооксигеназу 2 та простагландин Е-синтазу. Внаслідок впливу ТЧ різних розмірів та походження спостерігаються збільшені рівні в тканинах таких біологічно активних речовин, як С-реактивний білок, TNF- $\alpha$  та IL-1, IL-6 та IL-8. Ці речовини грають важливу роль у запальних процесах і можуть сприяти розвитку патологічних станів [137, 138].

### **1.3.2. Роль твердих частинок у порушенні бар'єрної функції кишечника**

Як вже було зазначено, здатність ТЧ проникати в організм напряму залежить від їх розміру. Чим менший розмір, тим більше вони можуть проникати в глибші ділянки дихальної системи і впливати на органи та тканини. ТЧ<sub>10</sub> переважно осідають у носовій порожнині, гортані та трахеї. Їх розмір не дозволяє проникати крізь стінки альвеол, тому зазвичай вони осідають у верхніх дихальних шляхах [130]. Хоча ці частки можуть викликати деякі подразнення, кашель та запалення в дихальних шляхах, вони загалом менш шкідливі, оскільки мають обмежений

доступ до біологічних структур організму.  $ТЧ_{2.5}$  та  $ТЧ_{0.1}$  здатні проникати у нижні ділянки дихальної системи, проходячи крізь фільтраційні механізми верхніх дихальних шляхів і осідаючи у бронхах та бронхіолах [139]. Особливістю  $ТЧ_{2.5}$  та  $ТЧ_{0.1}$  є їхня здатність потрапляти у легеневі капіляри через респіраторний ендотелій, після чого ці частинки можуть бути транспортовані кровоносними судинами до різних органів та тканин в організмі (рис. 1.2.) [140, 141].

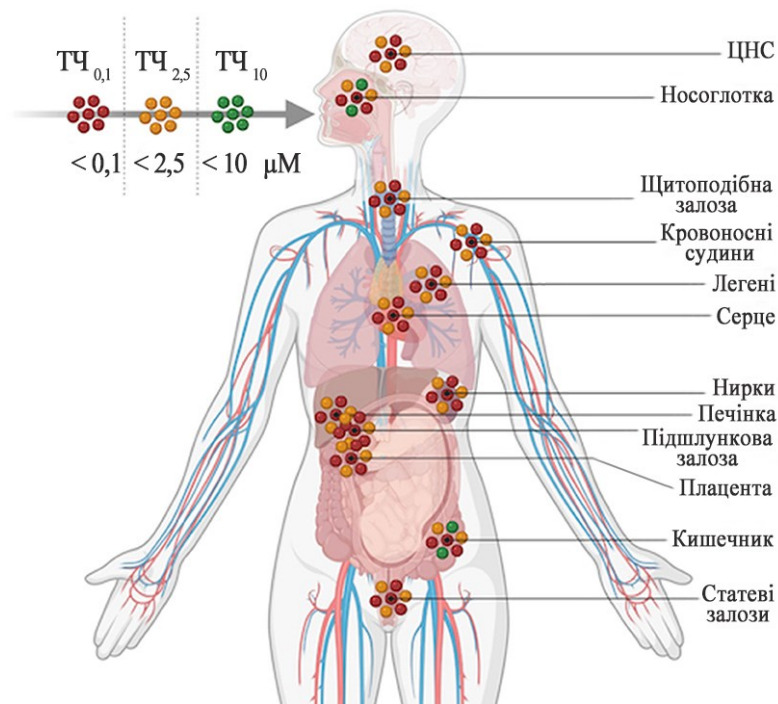


Рис. 1.2. Проникна здатність твердих частинок в залежності від їх розміру [141]

Крім того,  $ТЧ_{2.5}$  та  $ТЧ_{0.1}$  можуть потрапляти в організм не тільки через інгаляційний шлях, але й через нюховий епітелій [142], а також завдяки мукоциліарному кліренсу – захисному механізму, який забезпечує очищення дихальних шляхів від сторонніх частинок та забруднень [143]. Цей механізм залучає основні дихальні шляхи та епітеліальні клітини підслизових залоз, які виробляють слиз, який рухається за допомогою війок, що знаходяться на поверхні цих клітин. Рух війок спрямований вгору, у напрямку ротової порожнини, що сприяє виведенню сторонніх частинок з дихальних шляхів.

Однак, частина ТЧ, що потрапляє до ротової порожнини шляхом мукоциліарного кліренсу, може проковтнутися зі слиною і потрапляти в ШКТ [144].

ТЧ, завдяки своїй високій проникній здатності та здатності транспортуватися до різних органів та тканин, стають причиною значної кількості захворювань. Легені, як найбільш уразливий орган, є основним місцем розвитку патологій, пов'язаних з ТЧ, оскільки саме там більшість цих частинок фільтрується та осідає. Астма [145, 146], захворювання дихальних шляхів [3, 4], запалення легень [147, 148], ідіопатичний фіброз [149] та інші захворювання дихальної системи є наслідком впливу ТЧ. Серцево-судинна система теж є уразливою до дії ТЧ. Зокрема, ТЧ<sub>2.5</sub> проявляються як значний фактор, що асоціюється з підвищеним ризиком серцевої недостатності, ішемічної хвороби серця, інсульту, атеросклерозу, аритмій та гіпертензії. [6, 7].

Однак дедалі більше зацікавленості вчених та лікарів викликає здатність ТЧ впливати на розвиток запальних процесів у ШКТ. Результати епідеміологічних досліджень щодо зв'язку між забрудненням повітря та ЗЗК є суперечливими. Дослідження пацієнтів у дорослому віці показують, що тривала експозиція ТЧ<sub>2.5</sub> може зменшувати ризик розвитку захворювань кишечника [9]. Інше дослідження не виявило зв'язку між експозицією до ТЧ<sub>2.5</sub> під час вагітності та раннього дитинства та ризиком розвитку запальних захворювань кишечника у дітей [10]. Однак наступне дослідження показало, що у пацієнтів віком 40-69 років тривалий вплив різних забруднювачів повітря був пов'язаний зі збільшеним ризиком розвитку ВК [150]. Крім того, Dorofeev et. al. встановили, що у хворих на ВК із забруднених ТЧ<sub>2.5</sub> територій значно знижений рівень MUC2, що свідчить про порушення продукування слизу кишечника [11]. Також ряд досліджень демонструє зв'язок між рівнем забруднення повітря та ризиком розвитку інших захворювань кишечника. Високі концентрації частинок ТЧ<sub>2.5</sub> асоціюються з підвищеним ризиком госпіталізацій через різні захворювання кишечника, включаючи ЗЗК, неспецифічні болі в животі, ентерит та виразки шлунку [8, 151–

153]. Зокрема, Gu et al. виявили, що кожне збільшення концентрації ТЧ<sub>2.5</sub> на 10 мкг/л пов'язане зі значним зростанням кількості госпіталізацій через ЗЗК [154].

Подібна розбіжність у результатах може пояснюватися як відмінністю географічних та популяційних характеристик, так і тим, що різні типи забруднювачів повітря можуть мати різний механізм впливу на розвиток патології та кишковий бар'єр загалом.

Дослідження *in vitro* показали, що ТЧ можуть індукувати апоптоз та утворення активних форм кисню в клітинах Сасо-2 [21] і знижувати рівні ZO-1, клаудин-1 і десмоколіну на моделі кишечника людини *ex vivo* [155].

Дослідження на тваринах показали, що у мишей, яких піддавали тривалій експозиції ТЧ<sub>10</sub>, спостерігалось ушкодження епітелію товстої кишки [20, 156, 157] та збільшення транслокації [158]. Проте такі результати вказують на здатність ТЧ<sub>10</sub> механічно пошкоджувати структуру епітелію кишечника.

У групи мишей, підданих впливу грубих ТЧ<sub>2.5</sub>, було виявлено вищий рівень системного окислювального стресу, що проявлялося в підвищених рівнях каталази, супероксиддисмутази та малондіальдегіду [22, 159]. Це свідчить про можливий вплив ТЧ<sub>2.5</sub> на редокс-процеси в кишечнику. Пошкодження епітелію кишечника супроводжувалося збільшеним запаленням та підвищеним рівнем прозапальних цитокінів: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 та IL-1 $\beta$  [21, 22, 160, 161]. Повідомлялося також, що ТЧ<sub>2.5</sub> може пошкоджувати TJ, про що свідчить низька експресія оклюдину, клаудину та ZO-1 [159, 160, 162].

Ці спостереження показують, що прямо чи опосередковано ТЧ сприяють підвищенню проникності кишечника і, таким чином, можуть відігравати патогенну роль у розвитку ЗЗК через порушення епітеліального бар'єра. Проте механізм дії в залежності від розміру та складу ТЧ не відомий.

### 1.3.3. Зміни кишкової мікробіоти, викликані забрудненням повітря

Вплив забруднення повітря та ТЧ на мікробіоту кишечника стає все більшим предметом досліджень, але, незважаючи на добре вивчений вплив забруднювачів навколишнього середовища на різні стани здоров'я, на сьогодні мало відомо про те, як саме забруднення повітря впливає на кишкову мікробіоту.

Дослідження, проведене на мишах, показало зміни у складі кишкової мікробіоти після тривалого інгаляційного впливу великими концентраціями ТЧ<sub>2.5</sub> протягом 12 місяців [163]. Дослідники виявили, що хронічний вплив ТЧ<sub>2.5</sub> призводить до дисбіотичних змін: збільшення 24 таксонів бактерій і 21 таксону грибів. Друге дослідження, також проведене на мишах, встановило, що вплив ТЧ<sub>2.5</sub> протягом 3 тижнів призводить до змін складу мікробіоти по всьому ШКТ [144]. Виявлені дисбіотичні зміни були більш вираженими у проксимальних частинах кишечника і включали зниження кількості *Firmicutes* і збільшення родин *Lactobacillaceae* та *Rikenellaceae*. Тимчасове збільшення кількості *Lactobacillus* у фекаліях мишей після 7-денної експозиції ТЧ<sub>2.5</sub> було підтверджено іншим дослідженням, проте до 28 дня їхня кількість зменшувалася [156].

Кілька інших досліджень на тваринах повідомляють про вплив ТЧ на зміни у співвідношенні *Firmicutes/Bacteroides*, збільшення кількості *Verrucomicrobia* та зменшення *Fibroacteres* та *Ruminococcus* [23–25, 164, 165]. А експерименти з трансплантації фекальної мікробіоти підтвердили, що у мишей, які не зазнавали прямого впливу ТЧ, а лише отримали кишкову мікробіоту від мишей, що були піддані впливу ТЧ, виявлявся такий же фенотип пошкодження епітелію, як у мишей, що зазнали впливу ТЧ [156].

Епідеміологічні дослідження, що вивчають зв'язок між забрудненням повітря та змінами мікробіоти кишечника, поки що обмежені. Одне дослідження, проведене в Китаї на 6627 дорослих пацієнтах встановило, що концентрації ТЧ<sub>2.5</sub> та ТЧ<sub>0.1</sub> у регіоні негативно корелюють з індексами альфа-різноманіття кишкової

мікробіоти: зменшувалася кількість представників таких філумів, як *Firmicutes*, *Proteobacteria* та *Verrucomicrobia*, і спостерігався вплив на деякі таксони в рамках філуму *Bacteroidetes* [166]. Інше дослідження, проведене на групі хворих на ХК з регіонів України з високим рівнем забруднення ТЧ<sub>2.5</sub>, виявило зменшення кількості *Bacteroidetes*, *Akkermansia muciniphila* і *Faecalibacterium prausnitzii* та збільшення *Proteobacteria* [11]. Такі зміни вказують на дисбаланс між мікроорганізмами у кишечнику, що може бути пов'язано зі збільшеним ризиком розвитку захворювань кишечника.

Однак варто зауважити, що вплив ТЧ на склад і різноманіття мікробіоти кишечника залежить від їх розміру, концентрації та тривалості дії. Хоча наявні дослідження не розкривають точні механізми взаємодії ТЧ з мікроорганізмами, їх результати свідчать про значний вплив забруднювачів навколишнього середовища на мікробіоту кишечника.

### Узагальнення до розділу

Кишковий бар'єр є складною системою, що забезпечує фізичний, хімічний та імунологічний захист організму від зовнішніх агентів, таких як патогени, токсини та алергени.

Складові кишкового бар'єра включають епітеліальні клітини, що утворюють стінку кишечника, слизовий шар, що покриває його поверхню, й імунні клітини. Ці компоненти працюють разом, щоб не допустити проникнення патогенних мікроорганізмів та інших речовин у внутрішнє середовище організму, забезпечити цілісність бар'єра та нормальну функцію кишкового тракту. Порушення бар'єрної функції кишечника можуть призвести до розвитку ЗЗК.

Важливу роль у бар'єрній функції кишечника відіграє мікробіота. Мікроорганізми, що населяють кишечник, сприяють підтримці цілісності кишкового бар'єра шляхом перешкоджання прикріпленню до епітелію

патогенних видів, продукування метаболітів, таких як КЛЖК, та взаємодії з імунною системою кишечника, сприяючи балансу між про- і протизапальними відповідями. Зміни в складі та функції мікробіоти можуть впливати на бар'єрну функцію кишечника. Відомо, що дисбактеріоз призводить до послаблення бар'єрної функції та збільшення проникнення патогенних мікроорганізмів і токсинів через стінку кишечника, що зі свого боку може сприяти запальним відповідям та розвитку ЗЗК.

Останні дослідження показують, що забруднення повітря ТЧ може впливати на кишковий бар'єр та мікробіоту кишечника. Ці забруднювачі можуть спричиняти пошкодження епітелію, кількісні та якісні зміни мікробного складу, викликати запалення та порушувати функції кишечника.

Однак ступінь та характер впливу ТЧ залежать від різноманітних аспектів: розміру, походження, концентрації, тривалості дії. Ці фактори можуть взаємодіяти та модифікувати вплив ТЧ на організм, що створює складність у розумінні цього процесу. Окрім того, на сьогодні бракує досліджень впливу наддрібних наночастинок, які завдяки своєму розміру мають унікальні фізико-хімічні властивості. Тому існує необхідність у подальших дослідженнях, що фокусуватимуться на механізмах впливу ТЧ, у тому числі наночастинок, на бар'єрну функцію та мікробіоту кишечника.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Реактиви та матеріали

У роботі було використано реактиви:

- виробництва Sigma-Aldrich, США: COLO 205 (CB\_87091201) йодоацетамід (ЙА), метилцелюлоза (МЦ), уретан, Еванс блакитний (ЕБ), FITC-декстран, карбахолін, тритон X-100, тріс-НСІ, тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), буфер Лемлі; інгібітори протеїназ і фосфатаз (1 мкМ ортованадат натрію), бичачий сироватковий альбумін;

- виробництва Amersham Biosciences, США: люмінол, нітроцелюлозна мембрана Hybond-ECL, ПВДФ-мембрана (Hybond-P);

- українського виробництва: NaCl (Інфузія), аскорбінова кислота (Лекхім), диски з антибіотиками (Фармактив);

- антитіла: первинні антитіла до EGR-1 (sc-189, Santa-Cruz Biotechnology, США) та  $\beta$ -актин (BM5180, Boster Biological Technology, США), вторинні антитіла мишачі анти-кролячі (1:1000, sc-2357, Santa Cruz Biotechnology, США) та кролячі анти-мишачі (1:2500, sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, США);

- також: диференційно-діагностичні середовища (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія), MRS Broth (Condalab, Іспанія), N-ацетил-1-цистеїн (Sandoz, Швейцарія), гідроксид натрію (Merck, Німеччина), маркер молекулярної маси білків 20-120 кДа (CHEMICON International, США);

та інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. (Хімлаборреактив, Україна).

Препарати із твердими наночастинками були синтезовані та надані відділом нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом проф., д.б.н. Борисової Т.О.

Штам *Lactobacillus plantarum* 691 був наданий Інститутом мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України.

## 2.2. Синтез препаратів із твердими наночастинками

Синтез та підготовка препаратів із ТНЧ проводилися відділом нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом проф., д.б.н. Борисової Т.О.

Дим від різних видів деревини та деревинних компонентів, таких як деревина та кора берези, деревина тополі, деревина та гілля сосни, а також дим від медичних масок, були кількісно зібрані в лабораторних умовах під час усіх фаз горіння: полум'яного, тліючого та змішаного (коли полум'яна і тліюча фази присутні одночасно). Контроль за викидами диму здійснювався за допомогою монітора якості повітря/міні-лазерного монітора PM2.5/SDL607 [167]. При спалюванні 10 г матеріалу було зібрано викиди диму, і 4000 мл аерозолу було пропущено через 5 мл води для отримання суспендованих у воді препаратів із твердими частинками [168].

Для отримання твердих частинок нанорозміру зразки диму проходили багатоступеневу фільтрацію через фільтри Millipore різного розміру [169]. Розмір частинок у підготовлених зразках контролювався за допомогою методу динамічного розсіювання світла з використанням лазерного кореляційного спектрометра Zetasizer-3, Malvern Instruments (Великобританія). Для цього приладу використовувався гелій-неоновий лазер LGN-111 з потужністю 25 мВт і довжиною хвилі 633 нм [169].

Після фільтрації отримані зразки висушували для вимірювання концентрації твердих компонентів диму, а також калібрували та стандартизували за їх оптичними характеристиками для подальших біологічних експериментів [168].

Оптичні властивості ТНЧ були досліджені за допомогою ультрафіолетово-видимої абсорбції та фотолюмінесцентної спектроскопії з використанням спектрофотометра Lambda Bio (PerkinElmer) і спектрофлуориметра QuantaMaster (PTI).

### 2.3. Експериментальні тварини

Досліди були проведені на 199 дорослих білих нелінійних самцях щурів масою 180-250 г. Тварин утримували в акредитованому віварії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за стандартних умов щодо температури (21-23 °С), освітлення (12/12 год), вологості (30–35 %), раціону (повнораціонний корм для лабораторних тварин К-12-4) та з вільним доступом до води згідно з нормами, встановленими законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006 №3447-IV. Проведення експериментів здійснювали відповідно до вимог комісії з питань біоетики Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №5 від 5 вересня 2023 р.), а також «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Початком експерименту вважався перший день введення діючої або контрольної речовини.

### 2.4. Схема проведення експериментів

I. Дослідження ступеня токсичності ТНЧ, отриманих від згоряння різних порід деревини та деревних компонентів, проводили: (1) на культурі клітин лінії COLO 205; (2) на епітеліальному препараті товстої кишки щурів (рис. 2.1.). Щурів випадковим чином розподілили на одинадцять груп:

- 1 група – контроль (n = 5);
- 2 група – деревина берези (ДБ) у концентрації 20 мкг/мл (n = 5);
- 3 група – ДБ у концентрації 40 мкг/мл (n = 5);
- 4 група – кора берези (КБ) у концентрації 20 мкг/мл (n = 5);
- 5 група - КБ у концентрації 40 мкг/мл (n = 5);

6 група – деревина тополі (ДТ) у концентрації 20 мкг/мл ( $n = 5$ );

7 група – ДТ у концентрації 40 мкг/мл ( $n = 5$ );

8 група – деревина сосни (ДС) у концентрації 20 мкг/мл ( $n = 5$ );

9 група – ДС у концентрації 40 мкг/мл ( $n = 5$ );

10 група – гілля сосни (ГС) у концентрації 20 мкг/мл ( $n = 5$ );

11 група – ГС у концентрації 20 мкг/мл ( $n = 5$ ).

Аутопсію проводили шляхом інгаляції  $\text{CO}_2$  з подальшою цервікальною дислокацією зранку, від 9 до 11 години, у перший день експерименту.



Рис. 2.1. Схематична візуалізація дослідження ступеню токсичності суспендованих у воді твердих наночастинок, отриманих від згоряння різних порід деревини та деревних компонентів.

II. Для порівняння короткотривалого впливу ТНЧ природного та антропогенного походження на стан кишкового бар'єра товстої кишки щурів дослідження було виконано з використанням двох шляхів одноразового введення ТНЧ (рис. 2.2.). Незалежно від шляху введення, аутопсію проводили через 3 години після введення ТНЧ. У першому випадку щурам одноразово вводили ТНЧ, отримані від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 6$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 6$ ), у хвостову вену у дозі 500 мкг/100 г маси тіла. Контрольній групі ( $n = 6$ ) вводили 0,1 мл 0,9 %-го стерильного фізіологічного розчину (СФР). У другому випадку щурам одноразово вводили ДТ ( $n = 10$ ) та ММ ( $n = 10$ ) перорально у дозі

180 мкг/100 г маси тіла за допомогою шлункового зонда. Контрольна група (n = 10) отримувала 0,3 мл фізіологічного розчину.

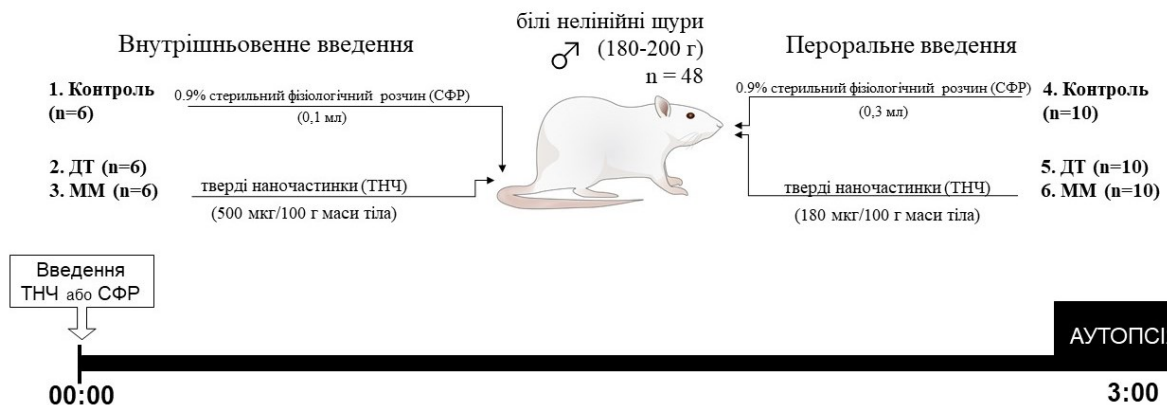


Рис. 2.2. Схематична візуалізація дослідження порівняльної дії твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ) та медичних масок (ММ), на стан бар'єрної функції слизової оболонки кишечника за внутрішньовенного та перорального введення.

III. Для дослідження змін стану бар'єрної функції товстої кишки при довготривалому впливі ТНЧ та визначення їхньої здатності посилювати запальні процеси за експериментально-індукованого коліту, щурів випадковим чином розподіляли на 6 груп (рис. 2.3.):

1 група (n = 16) – контроль, тваринам вводили 0,3 мл 0,9 %-го СФР перорально впродовж 7 діб, за 2 години до аутопсії ректально вводили 0,1 мл 1 % розчину метилцелюлози (МЦ);

2 група (n = 16) – контроль з модельованим колітом, тваринам вводили 0,3 мл 0,9 %-го СФР перорально впродовж 7 діб, за 2 години до аутопсії ректально вводили 0,1 мл 6 % розчину йодоацетаміду (ЙА);

3 група (n = 16) – довготривалий вплив ДТ, тваринам вводили ДТ у дозі 180 мкг/100 г маси тіла перорально впродовж 7 діб, за 2 години до аутопсії ректально вводили 0,1 мл 1 % розчину МЦ;

4 група (n = 16) – довготривалий вплив ММ, тваринам вводили ММ у дозі 180 мкг/100 г маси тіла перорально впродовж 7 діб, за 2 години до аутопсії ректально вводили 0,1 мл 1 % розчину метилцелюлози МЦ;

5 група (n = 16) – довготривалий вплив ДТ з модельованим колітом, тваринам вводили ДТ у дозі 180 мкг/100 г маси тіла перорально впродовж 7 діб, за 2 години до аутопсії ректально вводили 0,1 мл 6 % розчину ЙА;

6 група (n = 16) – довготривалий вплив ММ з модельованим колітом, тваринам вводили ММ у дозі 180 мкг/100 г маси тіла перорально впродовж 7 діб, за 2 години до аутопсії ректально вводили 0,1 мл 6 % розчину ЙА.

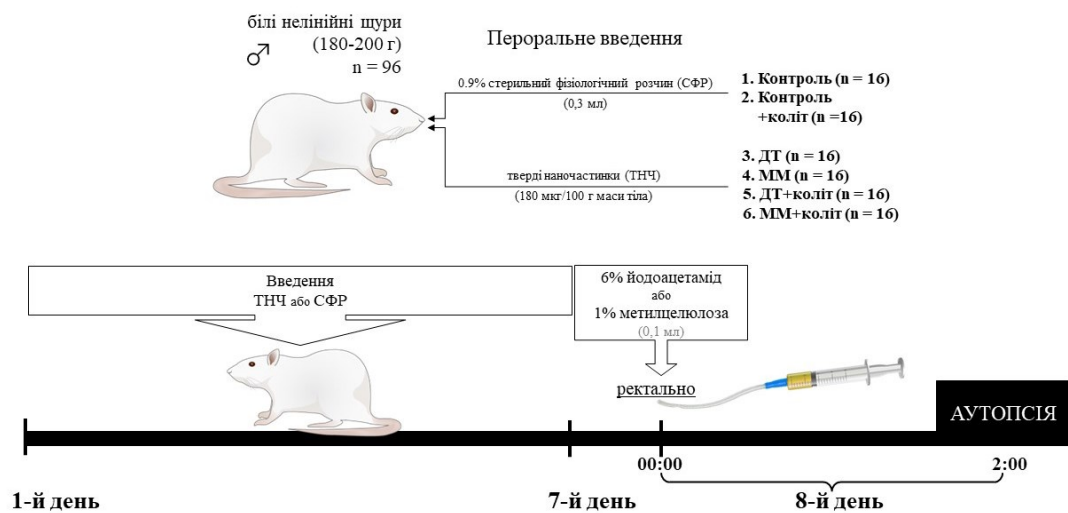


Рис. 2.3. Схематична візуалізація дослідження довготривалого впливу твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ) та медичних масок (ММ), на стан бар'єрної функції товстої кишки щурів.

Аутопсію проводили на 8й день експерименту шляхом інгаляції  $\text{CO}_2$  з подальшою цервікальною дислокацією.

IV. Для дослідження впливу ТНЧ на ростові показники та метаболічну активність представників мікробіоти кишечника для кожного зі штамів *Escherichia coli* B-906, *Staphylococcus aureus* B-918, *Lactobacillus plantarum* 691 визначали: (1) динаміку росту протягом 72 годин культивування методом спектрофотометрії; (2) інтенсивність росту методом бактеріологічних посівів на селективні середовища на 24, 48 та 72 години культивування; (3) формування

біоплівки методом десорбції барвника на полістироловому планшеті на 24, 48 та 72 години культивування (рис. 2.4.). Для штамів штамів *Escherichia coli* В-906 та *Staphylococcus aureus* В-918 визначали також чутливість до антибіотиків диско-дифузійним методом на 24, 48 та 72 години культивування, а для штаму *Lactobacillus plantarum* 691 – здатність до синтезу молочної кислоти методом титрування на 24 та 48 години культивування.


	<i>Escherichia coli</i> В-906	<i>Staphylococcus aureus</i> В-918	<i>Lactobacillus plantarum</i> 691	
Початкова концентрація культур: $10^5$ КУО/мл 	 Динаміка росту методом спектрофотометрії 0-72 год експерименту	 Інтенсивність росту методом бактеріологічних посівів на селективні середовища 24, 48, 72 год експерименту		
	 Формування біоплівки методом десорбції барвника на полістироловому планшеті 24, 48, 72 год експерименту		 Чутливість до антибіотиків диско-дифузійним методом 24, 48, 72 год експерименту	
			 Синтез молочної кислоти методом титрування 24, 48 год експерименту	

Рис. 2.4. Схематична візуалізація дослідження впливу твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ) та медичних масок (ММ), на ростові показники та метаболічну активність представників транзитornoї та облігатної нормобіоти кишечника.

## 2.5. Визначення маси тіла щурів

Маса тіла щурів була виміряна на кількох етапах експерименту. Перше зважування проводилося на 1-й день до початку введення речовини. Наступне зважування відбувалося на 8-й день експерименту. Зважування проводили перед початком моделювання коліту та до проведення апоморфінового тесту.

Для вимірювання ваги, кожну тварину по черзі поміщали в чашу електронних вагів. Після кожного зважування значення на циферблаті тарувалися, щоб уникнути

отримання неточних результатів. Початкову масу тіла тварин вважали за 100 % і розраховували подальшу масу у відсотках відносно 1-го дня експерименту.

## **2.6. Визначення загальної маси органів дослідних тварин**

Маса товстої кишки, селезінки та цекуму щурів була виміряна на 8-й день експерименту. Органи були вилучені під час аутопсії та поміщені на електронні ваги. Після кожного зважування, значення на циферблаті були таровані, щоб уникнути отримання неточних результатів. Отриману масу органів представляли у відношенні до 100 г маси тіла тварини (мг/100 г тіла).

## **2.7. Визначення вмісту води у фекаліях**

Для визначення вмісту води у фекаліях були зібрані свіжі фекалії щурів на останній день експерименту. Спочатку вимірювали вологу масу фекалій ( $m_w$ ) та висушували їх у термостаті протягом 24 годин при температурі 60 °C для отримання сухої маси ( $m_d$ ). Для розрахунку вмісту води ( $W$ , %) використовували формулу:

$$W = 100 \% - (m_d \times 100 \% \div m_w) \quad (2.1).$$

## **2.8. Моделювання експериментального коліту**

Експериментальний коліт у щурів було індуковано за 2 години до аутопсії шляхом одноразового ректального введення 0,1 мл 6 %-го розчину йодоацетаміду, розчиненого в 1 %-му розчині метилцелюлози, на відстані 7 см від анального отвору за допомогою гумового катетера S8 (Rüsch, Німеччина) [170]. Контрольній групі вводили 0,1 мл 1 %-го розчину метилцелюлози.

Під час аутопсії 7 см, які відповідали ділянці ураження, відрізали, промивали та зважували та оцінювався рівень набряку.

## 2.9. Реєстрація електрофізіологічних характеристик у камері Уссінга

Для дослідження електрофізіологічних характеристик епітелію товстої кишки щурів використовували систему камер Уссінга (VCC MC6, Physiological Instruments, США) (рис. 2.5.).

Перед початком кожного експерименту установку калібрували без досліджуваного зразка в умовах, що повторювали експериментальні:

1. Кожну півкамеру заповнювали 5 мл Кребса-Рінгера (у мМ): 117 NaCl; 5,9 KCl; 24,8 NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 NaHPO<sub>4</sub>×<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (0,1 M); 1,2 MgCl<sub>2</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>.
2. Температура розчину підтримувалася на рівні 37 °С.
3. Для постійної оксигенації розчину застосовувався карбоген (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>).

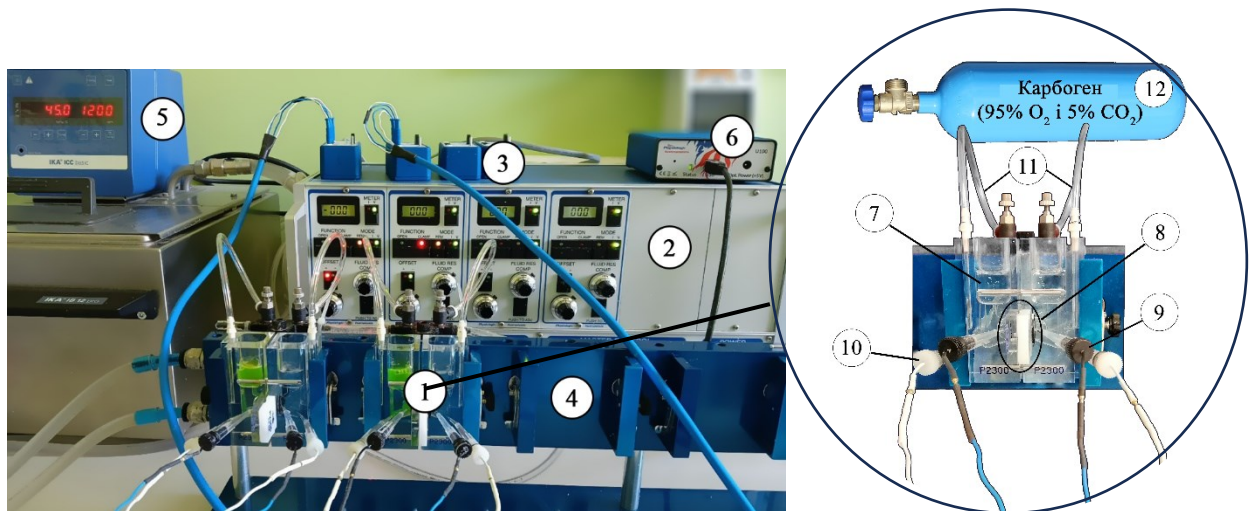


Рис. 2.5. Будова системи камер Уссінга для дослідження електрофізіологічних характеристик епітелію кишечника: 1 – камера Уссінга; 2 – мультіканальний вольт-амперний блок-фіксатор; 3 – модулі фіктивної мембрани; 4 – водяна сорочка; 5 – водяна баня; 6 – апаратне забезпечення системи збору й обробки даних; 7 – півкамера; 8 – слайдер; 9 – каломельний електрод для

вимірювання різниці потенціалів; 10 – хлорсрібний електрод, через які пропускається струм; 11 – газові трубочки; 12 – газовий балон із карбогеном.

Під час калібрування виконували компенсацію різниці потенціалів на електродах напруги і компенсацію електричного опору розчину. Після цього проводився повторний збір установки з досліджуваним зразком.

Підготовку зразка проводили не довше 15 хвилин, щоб запобігти втраті життєздатності тканин [171]. У щурів вирізали товсту кишку на відстані 1-го см від анального отвору та біля цекуму. Кишку розрізали вздовж по брижейці та промивали в охолодженому розчині Кребса-Рінгера. Далі відділяли повздовжній м'язовий шар, залишаючи лише слизовий та підслизовий шари.

Для дослідження використовували фрагменти товстої кишки дистального відділу. Фрагмент розміром  $0,5 \text{ см}^2$  відрізали, уникаючи великих капілярів і лімфовузлів, та закріплювали на слайдері. Для виключення пошкоджених зразків, цілісність тканини перевіряли додатково за допомогою бінокюляра. Після чого слайдер вставляли вертикально в отвір між півкамерами з однаковою слизово-підслизовою орієнтацією для всіх дослідів. Кожну півкамеру заповнювали 5 мл розчину Кребса-Рінгера при температурі  $37^\circ\text{C}$  та оксигенацією карбогеном [172].

Одразу після вмонтування зразка до півкамери зі сторони слизового шару (апикальної) додавали 10 мМ маніту, а до півкамери зі сторони підслизового шару (латеральної) – 10 мМ глюкози для досягнення осмотичної рівноваги.

Реєстрацію струму короткого замикання ( $I_{sc}$ ) проводили при фіксованій напрузі 0 мВ. Залежно від площі досліджуваної тканини, отримані значення були нормалізовані на площу в один ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) [171].

Після вмонтовування слайдера з фрагментом кишечника в камеру, тканині давали приблизно 20 хвилин для адаптації до умов експерименту та стабілізації електрофізіологічних параметрів.

Для визначення ступеня токсичності ТНЧ з різних порід деревини та деревних компонентів на функцію епітелію товстої кишки після стабілізації тканини з апікальної сторони відбирали розчин, а потім негайно додавали еквівалентний об'єм відповідного препарату з ТНЧ (або СФР для контрольної групи) до тієї ж сторони, щоб досягти кінцевої концентрації 20 мкг/мл або 40 мкг/мл. Реєстрацію показників проводили протягом 90 хвилин.

Для дослідження ефекту 7-добового введення ДТ та ММ на функцію епітелію товстої кишки після стабілізації тканини реєстрували значення  $I_{sc}$  протягом 45 хв. На 46-й хвилині для дослідження  $Ca^{2+}$ -залежної секреції йонів до апікальної сторони додавали розчин карбахоліну (кінцева концентрація у півкамері становила 50 мкМ).

## **2.10. Визначення парацелюлярної проникності епітеліального бар'єра товстої кишки**

Для визначення парацелюлярної проникності епітеліального бар'єра використовували маркер флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC)-декстран масою 4 кДа (Sigma, США) [173].

Після стабілізації тканини з апікальної сторони камери відбирали 500 мкл розчину і додавали 500 мкл FITC-декстрану (фінальна концентрація 1 мг/мл). Після чого з латеральної сторони відбирали по 100 мкл і переносили на чорний 96-лунковий планшет. Для визначення ступеня токсичності ТНЧ з різних порід деревини та деревних компонентів зразки відбирали на 30-й і 60-й хвилинах експерименту, а для дослідження змін на функцію епітелію товстої кишки у щурів після 7-добового введення ДТ та ММ – на 15-й, 30-й та 45-й хвилинах.

Визначення інтенсивності сигналу FITC-декстрану у зразках здійснювали з допомогою спектрофотометра Synergy HT (BioTek Instruments, США) за довжини хвилі збудження 485 нм та довжини хвилі поглинання 528 нм.

Значення коефіцієнта проникності ( $P_{app}$ ) виразили з рівняння Фіка та розраховували за наступною формулою [174]:

$$P_{app} = \frac{J}{\Delta C}, (2.2)$$

Оскільки:

$$J = \frac{\vartheta}{A*t}, (2.3)$$

$$\vartheta = \frac{C_1}{V}, (2.4)$$

$$\Delta C = (C_0 - C_1), (2.5)$$

то:

$$P_{app} = \frac{C_1}{V*S*t*(C_0 - C_1)}, (2.6)$$

де:  $J$  – густина потоку речовини (моль/см<sup>2</sup>×с);

$C_0$  – концентрація FITC-декстрану в розчині з серозного боку в початковий момент часу (моль/л);

$C_1$  – концентрація FITC-декстрану в розчині з мукозальної сторони через відповідний проміжок часу інкубації (моль/л);

$V$  – об'єм розчину з мукозальної сторони мембрани (л);

$S$  – площа досліджуваної ділянки тканини (см<sup>2</sup>);

$t$  – час перенесення декстрану через мембрану.

З огляду на співвідношення 1 л = 1000 см<sup>3</sup>, розмірність проникності виражається в см/с.

## 2.11. Культивування клітин лінії COLO 205

Клітини лінії COLO 205 (CB\_87091201, Sigma-Aldrich, США) висівали у 24-лункові планшети з концентрацією 70 000 клітин/мл в об'ємі 1,5 мл культурального середовища RPMI 1640 з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки. Клітини пройшли період адаптації тривалістю 20 годин [175].

Після цього у 24 лунки додавали відповідно ДБ, КБ, ДТ, ДС або ГС у концентрації 20, 40 або 80 мкг/мл для кожного типу (по 24 лунки для кожної концентрації кожного типу ТНЧ). Підрахунок клітин проводили після 24 та 72 годин інкубації з ТНЧ. Після цього суспензію клітин об'ємом 500 мкл відбирали в окремі мікропробірки, центрифугували при 500 g протягом 10 хвилин. Отриманий осад розчиняли в 20 мкл фізіологічного розчину та 20 мкл трипанового синього. Розрахунок співвідношення живих і мертвих клітин проводили за допомогою камери Горяєва за формулою:

$$x = (a \times 4000 \times b) / c \quad (2.7)$$

де  $a$  – сума клітин, підрахованих у певному об'ємі камери;  $b$  – кількість підрахованих квадратиків;  $c$  – розведення клітинної суспензії.

Зібрані дані представляють результати трьох незалежних експериментів для кожної концентрації кожного виду ТНЧ.

## 2.12. Бактеріологічні дослідження

### 2.12.1. Приготування бактеріологічних суспензій

Для дослідження впливу ТНЧ на окремих представників мікробіоти кишечника використовували штами *Escherichia coli* В-906 та *Staphylococcus aureus* В-918 з колекції культур кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та *Lactobacillus plantarum* 691, наданого Інститутом мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України.

Добові культури досліджуваних мікроорганізмів доводили до концентрації  $10^5$  колонієутворюючих одиниць (КУО) на мл за допомогою Densi-La-Meter II (Ерба Лахема, Чехія), засівали у колби із рідким середовищем: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ, Himedia, Індія) для *E. coli* В-906 та *S. aureus* В-918; MRS Broth

для *L. plantarum* 691 (Condalab, Іспанія). Вихідна посівна концентрація становила  $10^4$  КУО/мл.

До середовищ додавали ДЧ або ММ у концентрації 20 мкг/мл, 40 мкг/мл або 80 мкг/мл. У якості контролю використовували поживне середовище із додаванням лише відповідної культури мікроорганізму.

Культивування проводили на шейкері-інкубаторі ES-20 (Biosan, Латвія) за температури 37 °С і сталій швидкості обертання 200 rpm.

### 2.12.2. Побудова кривої росту бактерій

Дослідження росту бактерій проводили одразу після додавання ТНЧ у поживне середовище. У 96-луночний планшет вносили по 200 мкл контролю та кожної проби у трьох повторностях, після чого закривали прозорою адгезивною плівкою для планшетів. У якості Blank використовували стерильне середовище МПБ. Оптичну густину культури вимірювали на спектрофотометрі  $\mu$ Quant (BioTek, США) за довжини хвилі 540 нм впродовж 72 год.

Всі вимірювання проводили не менше двох разів для кожної культури, результати усереднювали.

### 2.12.3. Визначення життєздатності мікроорганізмів

Для визначення кількості життєздатних клітин (КЖК) на 24-у, 48-у та 72-у години культивування з колб із суспензіями культур, описаних у п. 2.11.1, здійснювали висів за секторним методом Голда [176] на щільні поживні середовища: Ендо для *E. coli* В-906, маніто-сольовий агар для *S. aureus* В-918 та MRS Agar для *L. plantarum* 691.

Всі вимірювання проводили не менше двох разів для кожної культури. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  похибка середньої величини ( $M \pm m$ ) lg КУО/г.

#### 2.12.4. Визначення здатності до біоплівкоутворення

Здатність ДТ та ММ впливати на властивість досліджуваних мікроорганізмів утворювати біоплівку визначали на полістиролових планшетах за допомогою методу, який базується на фарбуванні структур біоплівки генціанвіолетом (Хімлаборреактив, Україна) з подальшою десорбцією барвника в органічні розчинники. Для цього у 96-лунковий планшет вносили інокулят і культивували його в термостаті протягом 24, 48 та 72 годин при 37 °С. Після закінчення кожного терміну інкубації вміст лунок видаляли і тричі промивали фізіологічним розчином для видалення неадгезованих клітин. Далі лунки з інкубованим матеріалом фарбували протягом 15 хвилин 0,1 %-м водним розчином генціанвіолету. Для десорбції барвника у лунки додавали 200 мкл 96 %-го розчину етилового спирту на 10-15 хвилин. Після чого вміст лунок переносили у чистий планшет і вимірювали оптичну густина за довжиною хвилі 540 нм за допомогою Synergy HT plate reader.

Здатність штаму утворювати біоплівку оцінювали згідно з методом Stepanović et.al. [177].

#### 2.12.5. Визначення антибіотикочутливості

Для визначення чутливості штамів *E. coli* В-906 та *S. aureus* В-918 до антимікробних препаратів застосовували диско-дифузійний метод через 24, 48 та 72 години культивування. Експеримент проводили на чашках Петрі з твердим

середовищем Мюллера-Хінтона. На поверхню середовища наносили по 0,2 мл суспензії культури. Далі, на поверхню середовища розкладали диски, що містили антибіотики (Фармактив, Україна): Ампіцилін (Амп) 10 мкг, Левоміцетин (Лев) 30 мкг, Меропенем (Мер) 10 мкг, Норфлуксацин (Нор) 10 мкг, Цефтріаксон (Цфа) 30 мкг. Інкубація тривала 24 години у термостаті за температури 37 °С. Після закінчення терміну інкубування вимірювали діаметри зон затримки росту мікроорганізмів (мм).

Експеримент проводили не менше двох разів для кожної культури. Інтерпретацію результатів проводили згідно з Наказом МОЗ України від 05.04.2007 № 167 [178].

#### **2.12.6. Визначення кількості молочної кислоти**

Культуру *L. plantarum* 691 висівали на тверде середовище MRS агар на 24-у та 48-у години культивування в MRS-бульйоні у присутності різних концентрацій ТНЧ. Через 24 години з колоній, що виростили на чашках, робили суспензію із концентрацією клітин  $3 \cdot 10^8$  (1,0 згідно зі стандартом МакФарланда). Контроль за концентрацією здійснювали за допомогою Densi-La-Meter II.

У 9 мл ультрапастеризованого молока вносили 1 мл робочої суспензії, інкубували 20 годин при 37 °С і титрували 0,1М NaOH у присутності фенолфталеїну до появи стійкого світло-рожевого забарвлення.

Враховуючи, що 1 мл 0,1М NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти, розраховували кількість молочної кислоти, що утворилася у продукті. Після обчислення кількості молочної кислоти, визначали кислотність продукту у градусах Тернера (°Т), з урахуванням, що 1 мл 0,1М NaOH, який використовувався для титрування 100 мл продукту, відповідає 1 °Т [176].

### 2.12.7. Бактеріологічний аналіз пристінкової мікробіоти товстої кишки щурів

Фрагмент товстої кишки (1 см) щурів гомогенізували в 0,9 мл 0,5 %-го СФР. З отриманого гомогенату готували робочі десятикратні розведення ( $10^{-2}$ - $10^{-5}$ ). Кількісний та якісний склад мікробіоти визначали посівом робочих розведень на диференційно-діагностичні середовища з селективними властивостями: середовище Ендо для виділення бактерій групи кишкової палички, здатних метаболізувати лактозу (лактозопозитивні) і нездатних (лактозонегативних); цитратний агар Симонса для виділення умовно-патогенних ентеробактерій, які здатні метаболізувати цитрат; маніто-сольовий агар для виділення бактерій роду *Staphylococcus*, які метаболізують маніт (*Staphylococcus aureus*); залізовмісний сульфітний агар для клостридій; Bifidobacterium Agar для біфідобактерій; MRS агар для лактобактерій.

Культивування проводили при температурі 37 °С, обрахунок колоній здійснювали через 24-48 год. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними та тинкторіальними властивостями.

Після ідентифікації проводили кількісний облік мікроорганізмів, які росли у вигляді окремих колоній на диференційно-діагностичних середовищах з врахуванням робочого розведення і коефіцієнту посівної дози.

Результати представляли у вигляді логарифма КУО в 1 см кишки (lg КУО/см).

### 2.12.8. Визначення транслокації бактерій у кров

Для визначення транслокації бактерій у кров стерильно відбирали 1 мл крові з ворітної вени щурів та готували десятикратні розведення у СФР. Робочі розведення висівали на 5%-й кров'яний агар (HiMedia, Індія), і після 24-

годинного інкубування у термостаті за температури 37 °С підраховували загальну кількість мікроорганізмів.

Кількість мікроорганізмів виражали у вигляді логарифма КУО в 1 мілілітрі крові (lg КУО/мл).

### **2.13.Визначення проникності ендотелію товстої кишки щурів**

Для визначення проникності ендотелію кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки щурів, тварин було анестезовано уретаном (Sigma-Aldrich, США) шляхом інтраперитонеального введення дози 1,1 г/кг маси тіла. Після цього, у яремну вену вводили 0,4 %-й розчин барвника ЕБ у дозі 0,4 мг/100 г маси тіла тварини за 15 хвилин до аутопсії [179]. Ділянку товстої кишки довжиною 7 см видаляли, очищали від слизу та поміщали у формамід. Зразок інкубували на шейкері протягом доби при температурі 50 °С. Оптичну густину надосаду зразка вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 612 нм. Як контроль використовували формамід. Проникність ендотелію слизової оболонки товстої кишки щурів визначали за кількістю фарби в крові. Результат виражено у мікрограмах на грам кишки (мкг/г).

### **2.14.Активність мієлопероксидази слизової оболонки товстої кишки**

Активність МПО (U/г) визначали у слизовій оболонці кишки вимірюванням H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-залежного окиснення о-діанізидин гідрохлориду (ODHC, Sigma-Aldrich, Німеччина). Слизова оболонка товстої кишки дослідних щурів (20-30 мг) гомогенізувалася шляхом механічного перетирання у порцеляновій ступці з використанням рідкого азоту до утворення порошку. До отриманого гомогенату додавали гексадецилтриметиламоній бромід буфер (НТАВ) у співвідношенні 1 мл на 50 мг зразка. Зразок з буфером переносили у мікропробірку і проводили

через 3 цикли: 1 хвилина у рідкому азоті, 10 хвилин на водяній бані (при температурі 37 °С). Після цього пробу сонікували, попередньо зануривши її у лід, впродовж 10 секунд на ультразвуковому дезінтеграторі, а потім центрифугували протягом 15 хвилин з прискоренням 14000 обертів за хвилину при температурі +4 °С.

Оптична щільність зразків вимірювалася за допомогою спектрофотометра Synergy HT (BioTek Instruments, США) при довжині хвилі 450 нм. Для вимірювання вносили у лунки планшета по 200 мкл реакційного буфера ( $5 \times 10^{-4} \%$  розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 6,1 мл, розчин ODHC – 4,1 мл, фосфатний буфер – 4,4 мл) та по 14 мкл супернатанта досліджуваних зразків. Вимірювання проводили через 10-15 хвилин після внесення реагентів у лунки планшета.

### **2.15.Визначення глікопротеїнів слизу за методом Шиф-реакції**

Для визначення гліканової частини глікопротеїнів муцину товстої кишки щурів застосовувалася реакція Шифа. Для цього з товстої кишки тварин, яка була вилучена під час аутопсії, вирізали фрагмент розміром 1 см і поміщали його у пробірки з 3 мл N-ацетил-1-цистеїну (Sandoz, Швейцарія). Кожен зразок піддавався перемішуванню на вортексі протягом 4 хвилин і центрифугуванню протягом 15 хвилин з прискоренням 3000 g. Після цього з пробірок відбирали надосад, залишаючи осад із невеликою кількістю надосадової рідини, загальним об'ємом 1 мл. Далі, вміст пробірок піддавався ресуспендуванню та гомогенізації за допомогою диспергатора T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Німеччина) протягом 20 секунд зі швидкістю 20500 обертів за хвилину.

Визначення гліканової частини глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки проводили на полівінілідендифторидній (ПВДФ) мембрані [180]. Мембрану послідовно занурювали на 2 хвилини у 100 %-й та 80 %-й розчин метанолу, після чого її промивали дистильованою водою, висушували і поміщали

на фільтрувальний папір. Після повного висихання на мембрану наносили поверхневий слиз об'ємом 10 мкл на 10-15 хвилин, щоб мембрана повністю просочилася зразком. Далі ПВДФ-мембрану знову промивали дистильованою водою протягом 2 хвилин, а після цього інкубували у 0,5 %-му розчині КОН протягом 10 хвилин і у 70 %-му розчині етанолу ще протягом 10 хвилин. Знову промивали дистильованою водою протягом 2 хвилин, після чого вона була поміщена у 0,5 %-й розчин перйодатної кислоти на 10 хвилин. Після промивання дистильованою водою, мембрану піддавали дії реактиву Шифа протягом 30 хвилин при постійному струшуванні. Далі ПВДФ-мембрану двічі інкубували у 0,6 %-му розчині метабісульфіту натрію протягом 3 хвилин і промивали дистильованою водою протягом 3 хвилин. Після повного висихання мембрану сканували за допомогою сканера Canon PIXMA MP235. Отримані зображення оброблялися та аналізувалися за допомогою програмного забезпечення для обробки та кількісного аналізу зображень Image Studio™ Lite Ver 5.0 (LI-COR Biosciences, США) для визначення кількості та щільності позитивно забарвлених точок.

## 2.16. Вестерн-блот аналіз

Об'єм екстракту слизової оболонки товстої кишки щурів, що містив 100 мкг протеїнів, змішували у співвідношенні 1:1 з 2x буфером Лемлі для зразків. Змішану пробу нагрівали впродовж 5 хв при температурі 95 °С. Для розділення білків був використаний електрофорез у 10 %-му поліакриламідному гелі з наступним перенесенням на нітроцелюлозну мембрану Hybond-ECL.

Електрофорез білків проводили за напруги 150 В на 50-70 хв. Перенесення білків на нітроцелюлозну мембрану здійснювали за напруги 60 В протягом ночі із додатковим охолодженням. Після цього мембрану промивали буфером TBST (10 мМ тріс-НСl, 150 мМ NaCl, 0,0 5%-го поліоксиетиленсорбітан монолаурат (Твін-20), рН 7,4) 4 рази по 10 хвилин і блокували розчином 1 %-го бичачого

сироваткового альбуміну та 1 %-го знежиреного сухого молока, розчинених у TBST, впродовж мінімум 1 години.

Для аналізу окремих білків у слизовій оболонці товстої кишки щурів були підготовлені робочі розчини первинних антитіл у TBST. (табл. 2.1.). Нітроцелюлозну мембрану інкубували у розчині первинних антитіл за кімнатної температури впродовж 2 год при постійному перемішуванні. Після цього мембрану промивали у буферному розчині TBST тричі по 10 хвилин й інкубували протягом 1 години у розчині вторинних антитіл (Santa-Cruz Biotechnology, США), які були кон'юговані з пероксидазою хрому. Вторинні антитіла були підібрані до імуноглобулінів відповідно до застосовуваних первинних антитіл: мишачі анти-кролячі (1:1000, sc-2357, Santa Cruz Biotechnology, США) або кролячі анти-мишачі (1:2500, sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, США). Після інкубації, мембрану промивали п'ять разів протягом п'ятихвилинних інтервалів у буферному розчині TBST.

**Таблиця 2.1.**

**Загальна характеристика первинних антитіл до білків,  
проаналізованих методом Вестерн-блот**

<b>Білок</b>	<b>Молекулярна маса білка, кДа</b>	<b>Тип первинного антитіла</b>	<b>Каталожний номер, виробник</b>	<b>Робоче розведення антитіл</b>
EGR-1	68	Поліклональне кроля	sc-189, Santa-Cruz Biotechnology, США	1:200
β-актин	43	Моноклональне миші	BM5180, Boster Biological Technology, США	1:200

Для проведення візуалізації Вестерн-блот використовували ECL-реагент, (H<sub>2</sub>O – 9 мл, 1М тріс-НСІ для ECL-реагенту – 10 мл, 68 мМ кумарова кислота –

225 мкл, 1,2 мМ люмінол – 500 мкл). Світіння, отримане внаслідок хеміллюмінесцентної реакції пероксидази хрому із субстратом, фіксували на радіографічній плівці (ОНІКО, Україна). Після інкубації плівки у фіксаторі і проявнику для рентгенівських плівок, її просушували, після чого отримані зображення сканували за допомогою сканера (Canon PIXMA MP235). Для денситометричного аналізу використовували програмне забезпечення ImageJ, Ver. 1.54f (U. S. National Institutes of Health, США). Молекулярну масу білків визначали з використанням маркера молекулярної маси від CHEMICON International Inc. Результати були проаналізовані та нормалізовані проти  $\beta$ -актину [181].

### **2.17. Розрахунок розміру вибірки**

Розмір вибірки було розраховано за допомогою програмного забезпечення G\*Power, версія 3.1.9.7 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Німеччина), яка на основі заданого розміру ефекту та значення альфа вираховує оптимальну для досягнення потужності кількість тварин для кожної гіпотези окремо.

Величина ефекту для середніх значень, отриманих у цих дослідженнях, варіювалася від 0,55 до 0,72 з розміром вибірки від 5 тварин у кожній групі. Таким чином, нам вдалося досягти потужності від 0,7 до 0,94 і альфа 0,05, виявивши відмінності між групами.

### **2.18. Статистична обробка результатів**

Статистичний аналіз результатів досліджень та побудову графіків проводили за допомогою пакету програми Prism v.9.5.1 (GraphPad Software, США).

Для перевірки нормальності розподілу вибірки використовували критерій Шапіро-Уїлка. У разі, якщо вибірки мали нормальний розподіл, для виявлення статистично значущих відмінностей між двома вибірками використовувався непарним t-тестом. Якщо розподіл даних був ненормальним, застосовували тест Манна-Уїтні.

При порівнянні трьох або більше вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз (One-way ANOVA) або Kruskal-Wallis ANOVA, залежно від нормальності розподілу. У разі порівняння двох незалежних змінних використовували двофакторний дисперсійний аналіз (Two-way ANOVA).

Для множинного порівняння використовували тести Даннетта або Тьюкі. Статистична значущість вважалась при значенні ймовірності  $p < 0,05$ .

Результати були представлені у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  стандартної похибки середнього ( $M \pm SEM$ ).

### РОЗДІЛ 3

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКЦІЇ КЛІТИН COLO 205 ТА ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ТОВСТОЇ КИШКИ НА ТВЕРДІ НАНОЧАСТИНКИ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ *IN VITRO*

Лісові пожежі є основним джерелом ТНЧ природного походження, які утворюються внаслідок неповного згорання органічних матеріалів, таких як деревина, гілля, листя тощо.

На першому етапі нашого дослідження ми визначили ступінь токсичності ТНЧ, отриманих від згорання трьох порід деревини: берези, тополі та сосни, а також деревних компонентів: кори берези та гілля сосни.

Для оцінки середнього розміру частинок ТНЧ використовували метод динамічного розсіювання світла. В результаті аналізу було встановлено, що основна кількість ТНЧ мала діаметр приблизно 29,7 нм [168]. Спектр поглинання світла ТНЧ переважно спостерігався в ультрафіолетовому діапазоні (200-350 нм) і мав пік близько 275 нм. Під час збудження частинок при 275 нм спостерігалася флуоресценція з максимальною довжиною хвилі близько 340 нм, що вказує на наявність фенольних похідних. Це високоенергетичне поглинання можна пов'язати з типовими сполуками, такими як гваякол та сирингол, які утворюються під час деградації лігніну – одного з основних компонентів деревини [182]. Раманівською спектроскопією були виявлені характерні смуги вуглецевих наноточок, які можуть утворюватися під час термічного розкладання деревини [168].

### **3.1. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини берези**

Для визначення токсичних властивостей ТНЧ ми дослідили реакцію клітин лінії COLO 205 *in vitro*. Ця лінія використовується в дослідженнях як модель для вивчення механізмів транспорту препаратів через клітинні мембрани.

Спершу ми дослідили здатність клітин COLO 205 до поділу у присутності ТНЧ, отриманих внаслідок згорання деревини берези (ДБ). У результаті дослідження було виявлено, що через 24 години культивування кількість клітин достовірно ( $p < 0,001$ ) зменшувалася у присутності ДБ за всіх трьох досліджуваних концентрацій (рис. 3.1.). Після 72 годин культивування спостерігалось подальше зменшення кількості клітин.

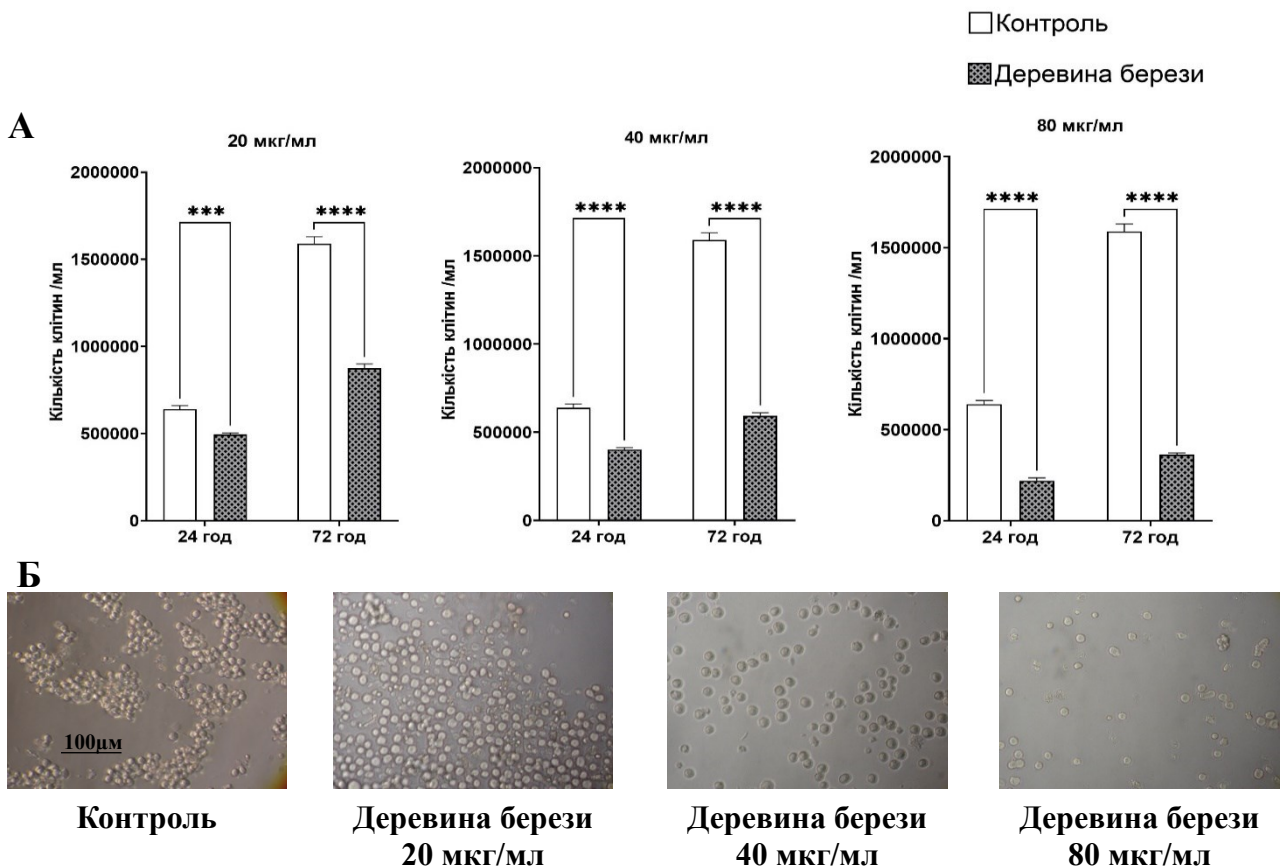


Рис. 3.1. Оцінка впливу твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини берези, на клітини лінії COLO 205 за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ): А – загальна кількість клітин (мертвих і живих) після 24 і 72 годин культивування, клітин/мл; Б – мікрофотографії клітин через 24 години культивування. Результати представлені як  $M \pm SEM$ . \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

При цьому кількість клітин зменшувалася зі збільшенням концентрації ДБ. Після 24 годин культивування за концентрації 20 мкг/мл кількість клітин

COLO 205 становила  $495000 \pm 20938$  клітин/мл, за концентрації 40 мкг/мл кількість зменшилася до  $402500 \pm 25156$  клітин/мл, а за концентрації 80 мкг/мл була найменшою –  $220000 \pm 33750$  клітин/мл. Ця тенденція до зниження кількості клітин в залежності від концентрації посилювалася на 20-25% за 72-годинного культивування.

Далі ми визначали співвідношення живих і мертвих клітин COLO 205 через 24 та 72 год культивування з ДБ у концентраціях 20, 40 та 80 мкг/мл (рис. 3.2.). Перша загибель клітин спостерігалася за концентрації ДБ 40 мкг/мл вже через 24 години культивування і при збільшенні дози до 80 мкг/мл кількість мертвих клітин збільшилася у 3 рази. На 3 добу за цих же концентрацій ДБ ми спостерігали повну загибель клітин.



Рис. 3.2. Відсоткове співвідношення живих і мертвих клітин лінії COLO 205 після 24 (А) та 72 (Б) годин культивування з твердими наночастинками, отриманими від згорання деревини берези, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ).

Наступним кроком ми дослідили дію ДБ на функції епітелію товстої кишки на тканинній моделі за концентрацій 20 і 40 мкг/мл, використовуючи камери Уссінга.

Струм короткого замикання ( $I_{sc}$ ) – це струм, необхідний для нівелювання різниці потенціалів тканини, який є сумою всіх іонних струмів через епітелій. З часом цей показник поступово зменшується через зниження життєздатності клітин та послаблення іонного транспорту через епітелій [183]. Таке зменшення

було характерним для  $I_{sc}$  групи контролю у нашому досліді, значення якого протягом 90 хвилин знизилися з  $41,9 \pm 1,83 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  до  $31,17 \pm 1,24 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (рис. 3.3. А).

ДБ не змінювали  $I_{sc}$ : у порівнянні з контрольними значеннями не спостерігалось достовірних відмінностей за обох концентрацій, а тенденція до зниження була подібна.

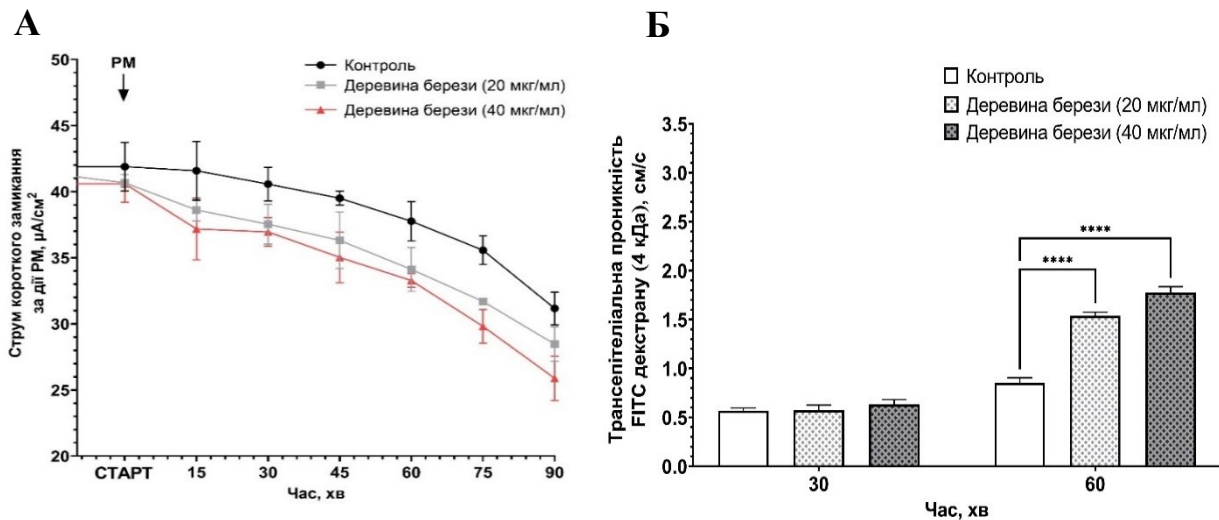


Рис. 3.3. Зміни електрофізіологічних показників епітеліального препарату товстої кишки під впливом твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини берези, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 5$ ) та 40 мкг/мл ( $n = 5$ ): А – зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Б – зміна парацелюлярної проникності FITC-декстрану (4 кДа), см/с. Результати представлені як  $M \pm \text{SEM}$ . \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Другим електрофізіологічним показником, який ми дослідили, була парацелюлярна проникність епітелію товстої кишки. Парацелюлярна проникність вказує на проникність, яка відбувається між епітеліальними клітинами епітелію через міжклітинні контакти, а її збільшення свідчить про пошкодження бар'єрної функції [183]. Під час тривалого запису у камері Уссінга швидкість парацелюлярної проникності епітелію може збільшуватися з часом через активування транспортних систем та збільшення проникності мембран.

Так, значення контролю становило  $0,57 \pm 0,03$  см/с через 30 хвилин після початку запису, а ще через 30 хвилин зросло до  $0,85 \pm 0,05$  см/с (рис. 3.3. Б).

Додавання ДБ збільшило швидкість проникності мукозо-субмукозального препарату на 60-ту хвилину експерименту. При цьому за концентрації 40 мкг/мл значення зросло вдвічі відносно контролю (до  $1,78 \pm 0,06$  см/с;  $p < 0,0001$ ).

Таким чином ДБ проявляють високу токсичність щодо клітин COLO 205 та епітелію товстої кишки. При цьому ефект їхньої дії проявляє концентраційну та часову залежність.

### **3.2. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання кори берези**

Кора берези – багат шаровий зовнішній шар стовбура берези, який захищає його від руйнівних факторів, регулює температуру, забезпечує транспортування речовин. Структура та хімічний склад кори берези у порівнянні із деревиною мають ряд особливостей. Зокрема, кора берези містить велику кількість суберину, бетуліну і бетулінової кислоти, флавоноїдів, танінів та цукрів. Під час промислової обробки кора видаляється і спалюється для виробництва енергії окремо від деревини [184, 185]. Тому ми також дослідили ТНЧ, отримані від згорання кори берези (КБ).

На відміну від деревини, кора берези проявила меншу токсичність відносно клітин COLO 205 (рис. 3.4.). Найбільший вплив КБ проявляв за концентрації 80 мкг/мл. Кількість клітин знизилася на 59 % після 24 годин культивування ( $262500 \pm 11406$  клітин/мл порівняно з контрольною кількістю  $640000 \pm 46400$  клітин/мл,  $p < 0,0001$ ) і на 76 % після 72 годин ( $387500 \pm 49219$  клітин/мл порівняно з контрольною кількістю  $1590000 \pm 91250$  клітин/мл,  $p < 0,0001$ ). Найнижча концентрація КБ, 20 мкг/мл, не мала помітного ефекту протягом перших 24 годин експерименту.

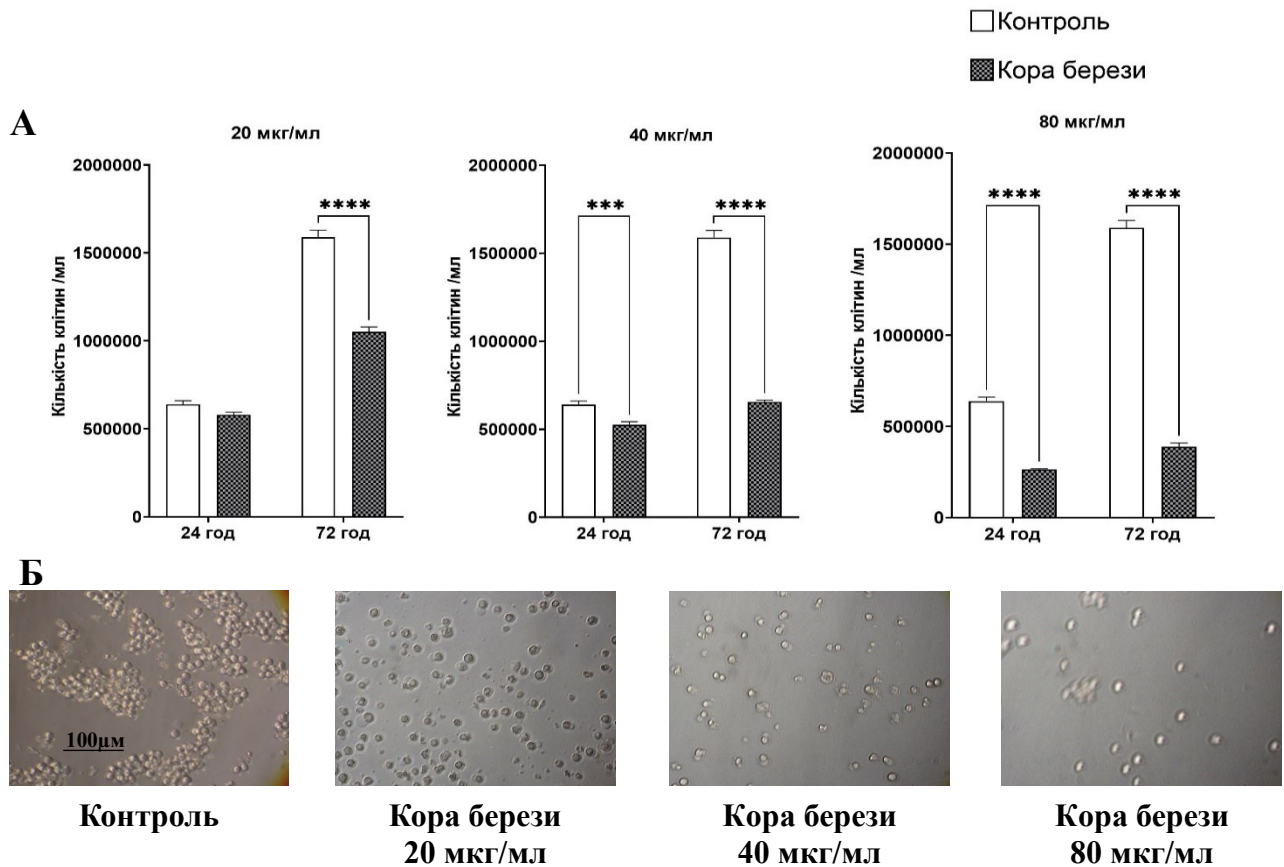


Рис. 3.4. Оцінка впливу твердих наночастинок, отриманих від згорання кори берези, на клітини лінії COLO 205 за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ): А – загальна кількість клітин (мертвих і живих) після 24 і 72 годин культивування, клітин/мл; Б – мікрофотографії клітин через 24 години культивування. Результати представлені як  $M \pm SEM$ . \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Крім того, присутність КБ у культуральному середовищі у низькій (20 мкг/мл) та середній (40 мкг/мл) концентраціях не спричиняла загибелі клітин (рис. 3.5.). Однак висока (80 мкг/мл) концентрація на 3 день експерименту призводила до загибелі всіх клітин. Це може вказувати на те, що клітини мали певний ступінь стійкості до низьких доз КБ.

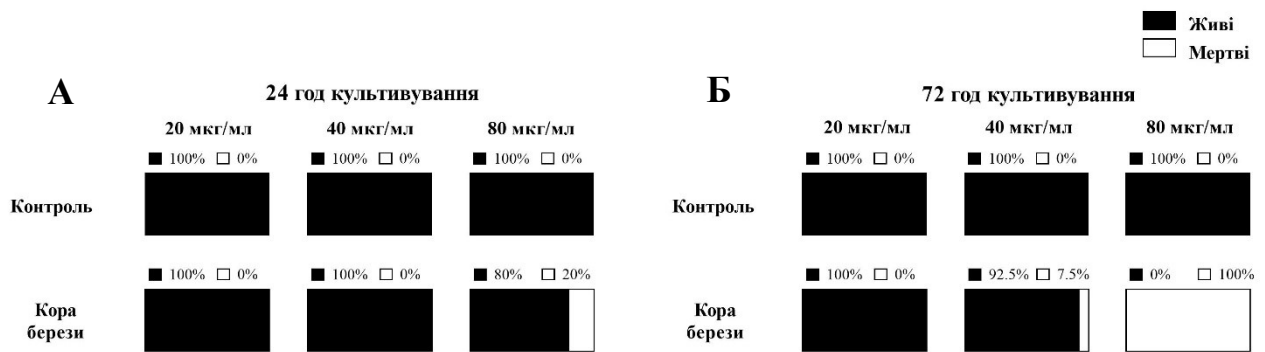


Рис. 3.5. Відсоткове співвідношення живих і мертвих клітин лінії COLO 205 після 24 (А) та 72 (Б) годин культивування з твердими наночастинками, отриманими від згорання кори берези, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ).

За концентрації 20 мкг/мл жодних змін у показнику  $I_{sc}$  та парацелюлярної проникності не виявлено.

КБ у концентрації 40 мкг/мл змінювали електрофізіологічні показники тканинного препарату (рис. 3.6. А). Після 60 хвилин запису показник  $I_{sc}$  у присутності КБ знизився на  $9,23 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (з  $40,20 \pm 1,61 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  до  $25,65 \pm 1,62 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), тоді як в контрольних умовах за той самий проміжок часу він знизився всього на  $6,60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (з  $41,90 \pm 1,83 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  до  $31,17 \pm 1,24 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Проте ці відмінності не були статистично вірогідними.

За тієї ж концентрації (40 мкг/мл) КБ парацелюлярна проникність збільшувалася вже через 30 хвилин з  $0,57 \pm 0,03 \text{ cm}/\text{s}$  до  $0,96 \pm 0,03 \text{ cm}/\text{s}$  ( $p < 0,001$ ; рис. 3.6. Б). Це вказує на те, що КБ при даній концентрації здатні збільшувати проникність епітелію товстої кишки, що може призводити до збільшення проникання рідини, електролітів та інших речовин.

Отримані дані свідчать про дозозалежний ефект впливу КБ.

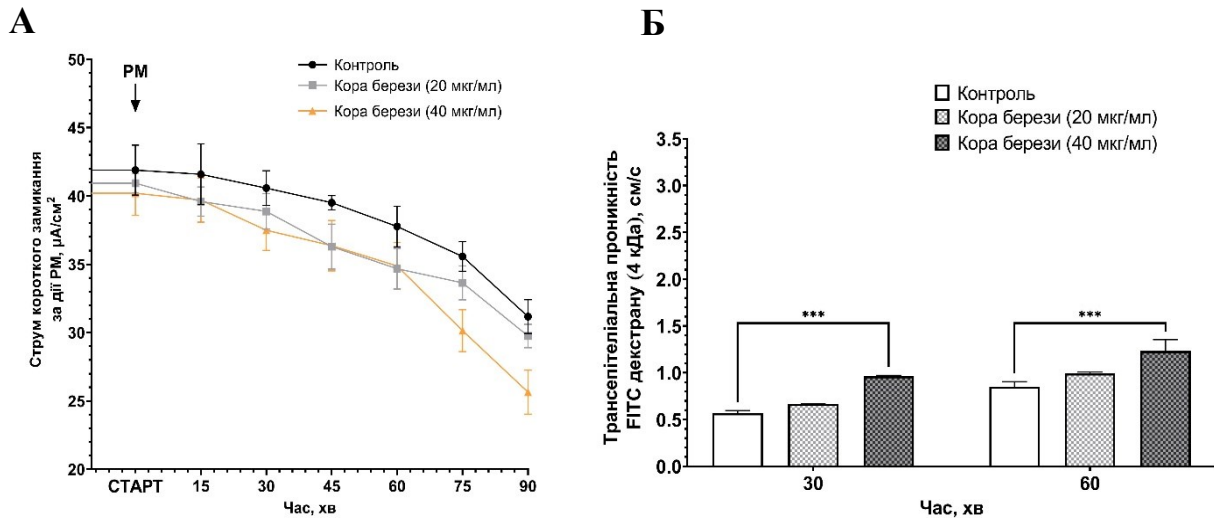


Рис. 3.6. Зміни електрофізіологічних показників епітеліального препарату товстої кишки під впливом твердих наночастинок, отриманих від згорання кори берези, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 5$ ) та 40 мкг/мл ( $n = 5$ ): А – зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Б – зміна парацелюлярної проникності FITC-декстрану (4 кДа), см/с. Результати представлені як  $M \pm \text{SEM}$ . \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Загалом, отримані результати вказують, що КБ мають слабші характеристики токсичності порівняно з ДБ. Проте за високих концентрацій вони також можуть впливати на виживаність клітин COLO 205 та збільшувати проникність епітелію товстої кишки.

### 3.3. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі

Тополя – багаторічне дерево, яке характеризується швидким ростом, має добре розгалужену кореневу систему та здатність виробляти значну кількість біомаси. Завдяки своїй високій стійкості до різних несприятливих умов тополі мають властивість накопичувати метали через свою кореневу систему та листя і далі зберігати їх у своїй деревині та листі завдяки процесу транслокації [186,

187]. Через здатність поглинати вуглекислий газ та очищати повітря від металів та інших забруднювачів, тополі часто використовують для озеленення міських зон [188]. Враховуючи накопичувальні властивості тополі, ми дослідили ступінь токсичності ТНЧ, які утворюються внаслідок згорання деревини тополі (ДТ).

ДТ проявили високу пригнічувальну дію на динаміку росту культури клітин (рис. 3.7.). Вже через 24 години експерименту найнижча концентрація ДТ, яка становила 20 мкг/мл, спричинила значне зниження кількості клітин у 1,5 раза порівняно з контрольною групою, становлячи  $462000 \pm 25667$  клітин/мл ( $p < 0,0001$ ). Після цього розмноження клітин значно уповільнювалося, і через 72 години експерименту кількість клітин залишалася на рівні показників на 24 годину, що було нижче показників у контрольній групі у 3,2 раза.

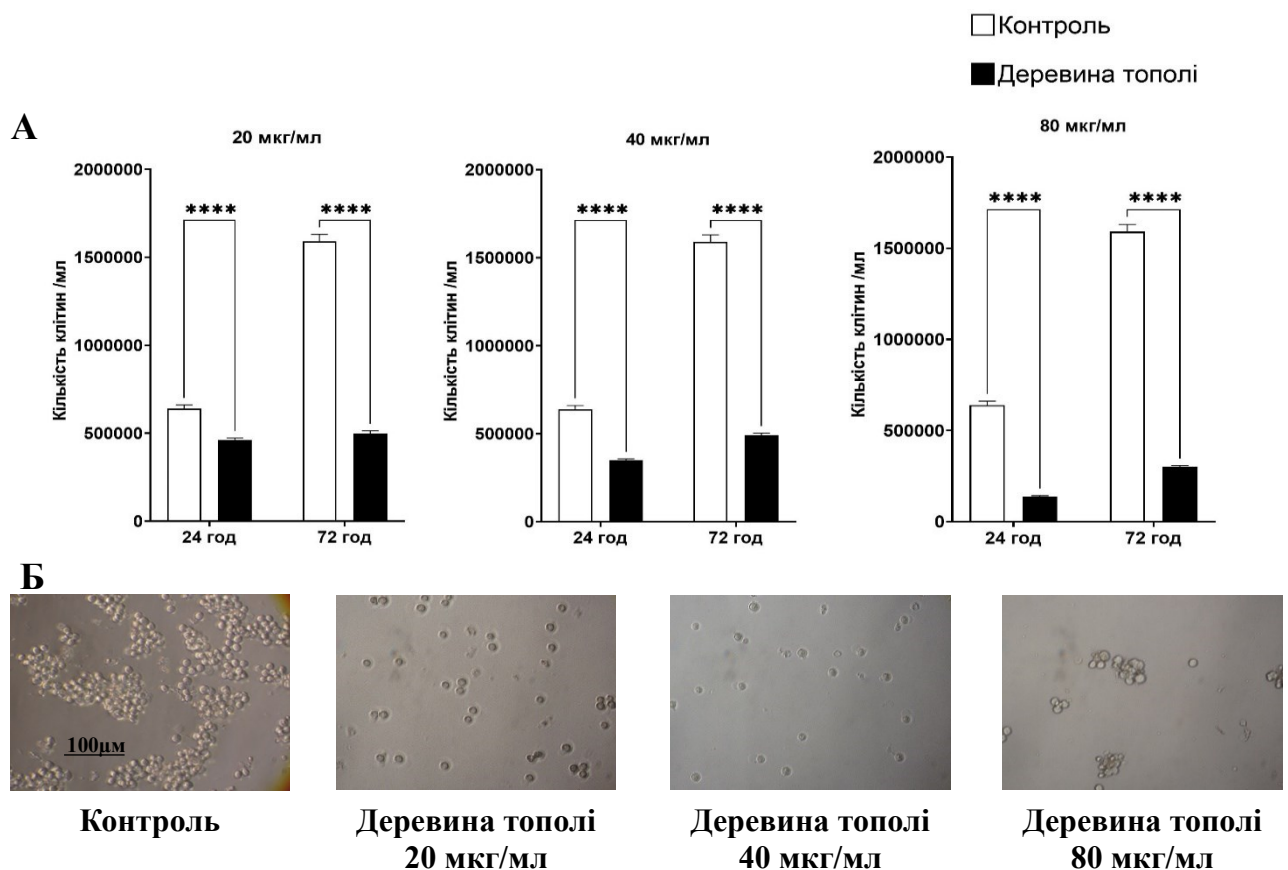


Рис. 3.7. Оцінка впливу твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі, на клітини лінії COLO 205 за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ): А – загальна кількість клітин (мертвих і живих) після 24 і 72 годин культивування, клітин/мл; Б – мікрофотографії клітин

через 24 години культивування. Результати представлені як  $M \pm SEM$ .  
 \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Збільшення концентрації ДТ призводило до посилення їх токсичного впливу, і цей ефект досягав свого піка, знижуючи кількість клітин на 80 % у порівнянні з контрольною групою за концентрації 80 мкг/мл як через 24 години, так і через 72 години.

Причиною відсутності приросту клітин стало те, що на третю добу експерименту всі клітини загинули за всіх концентрацій ДТ. Навіть після перших 24 годин культивування у присутності ДТ вижило менше третини клітин COLO 205 (рис. 3.8.).

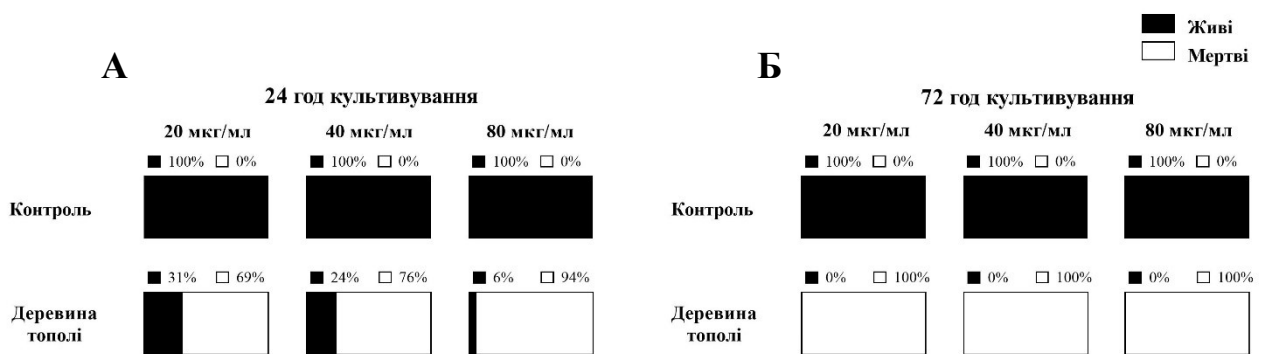


Рис. 3.8. Відсоткове співвідношення живих і мертвих клітин лінії COLO 205 після 24 (А) та 72 (Б) годин культивування з твердими наночастинками, отриманими від згорання деревини тополі, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ).

Так само виразно токсична дія ДТ проявлялася і на епітеліальному препараті товстої кишки щурів (рис. 3.9. А). При концентрації 20 мкг/мл показник  $I_{sc}$  знижувався на 5-10 % від контрольних значень і мав тенденцію до подальшого зниження з часом. Але за концентрації 40 мкг/мл вже через 15 хвилин після додавання ДТ у камеру Уссінга спостерігався різкий спад  $I_{sc}$ , після чого показник продовжував стрімко знижуватися. Протягом експерименту  $I_{sc}$  знизився на  $20,82 \mu A/cm^2$ , що вдвічі більше ніж в контрольній групі ( $p < 0,001$ ).

Зниження  $I_{sc}$  супроводжувалося суттєвим зростанням швидкості парацелюлярної проникності епітелію. Через 60 хвилин після додавання ДТ, незалежно від концентрації, показник зростав втричі порівняно з контролем ( $2,73 \pm 0,02$  см/с за концентрації 20 мкг/мл,  $p < 0,0001$ ;  $0,85 \pm 0,05$  см/с за концентрації 40 мкг/мл,  $p < 0,0001$ ).

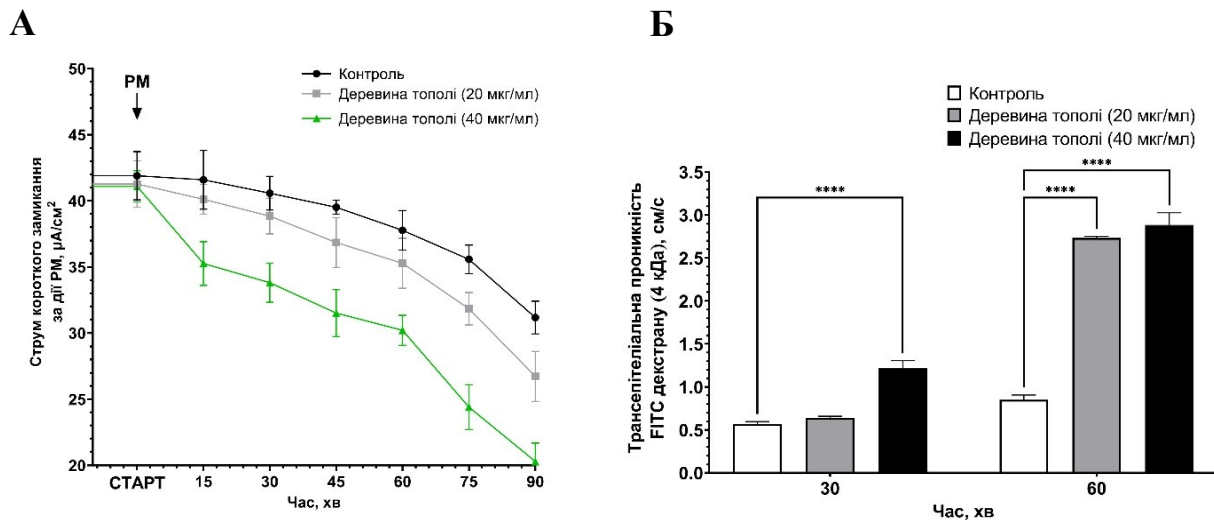


Рис. 3.9. Зміни електрофізіологічних показників епітеліального препарату товстої кишки під впливом твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 5$ ) та 40 мкг/мл ( $n = 5$ ): А – зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu A/cm^2$ ; Б – зміна парацелюлярної проникності FITC-декстрану (4 кДа), см/с. Результати представлені як  $M \pm SEM$ . \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Таким чином, ДТ демонструють високу токсичну дію, яка спостерігається вже за найнижчої концентрації (20 мкг/мл) і посилюється з часом.

### 3.4. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини сосни

У лісах України сосна є панівним видом і становить третину всіх дерев [189]. Однією з особливостей деревини сосни є наявність масляних смол та смоляних кислот у її складі, які під час горіння можуть виділятися у вигляді густого чорного диму або димових частинок [190]. Враховуючи зростаючу кількість

лісових пожеж в Україні, визначення токсичних властивостей ТНЧ, отриманих внаслідок горіння деревини сосни (ДС), має високу актуальність.

Проведені дослідження показали, що ДС мають схожий з ДБ вплив на здатність клітин до поділу (рис. 3.10.). В обох випадках спостерігався дозозалежний ефект, що посилювався протягом 72 годин, хоча кількісний показник клітин під впливом ДС був вищим за показник при дії ДБ.

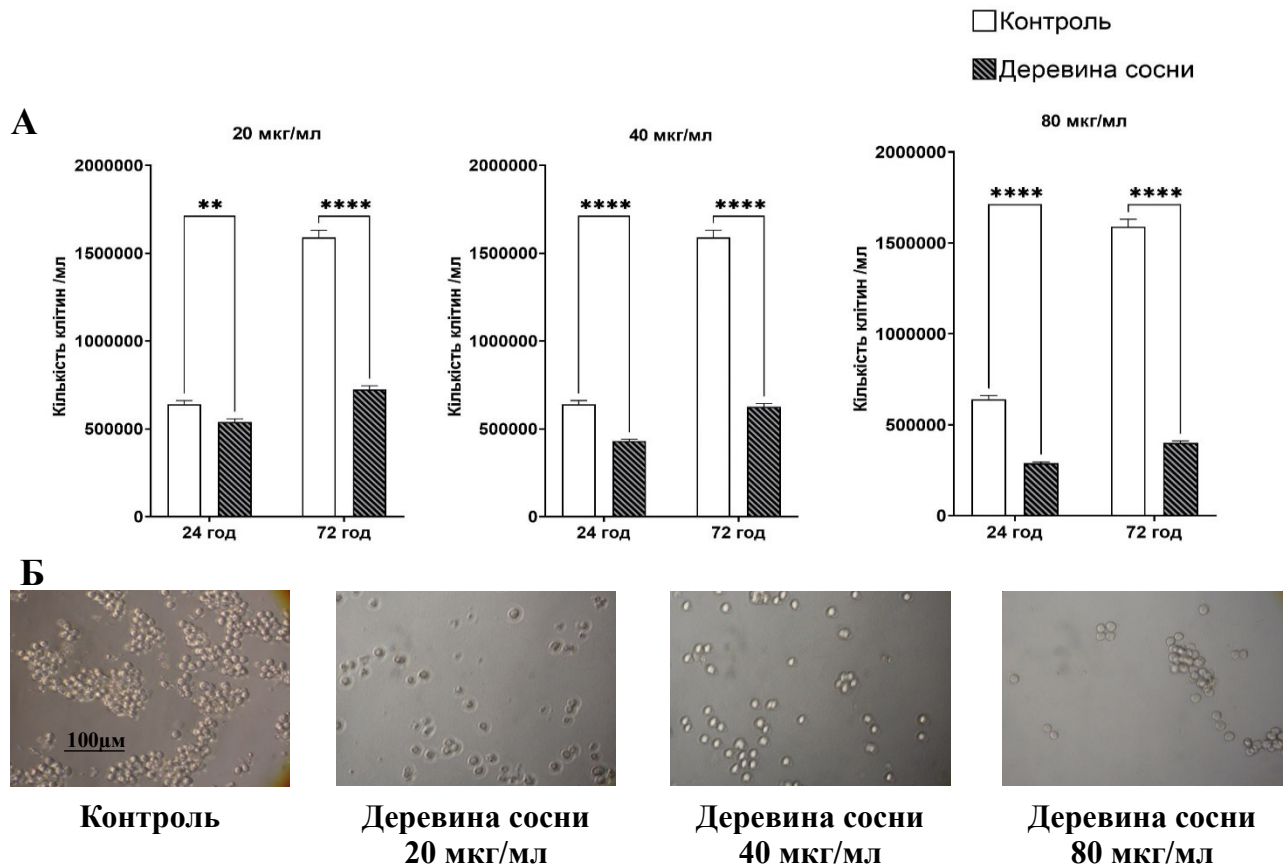


Рис. 3.10. Оцінка впливу твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини сосни, на клітини лінії COLO 205 за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ): А – загальна кількість клітин (мертвих і живих) після 24 і 72 годин культивування, клітин/мл; Б – мікрофотографії клітин через 24 години культивування. Результати представлені як  $M \pm SEM$ . \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Крім того, виживаність клітин у присутності ДС (рис. 3.11.) теж була вища ніж у присутності ДБ (рис. 3.2.). Протягом усього експерименту жодна

концентрація не призвела до 100 %-ї загибелі клітин. А за концентрації 20 мкг/мл рівень смертності становив усього 12 % навіть на 3 добу експерименту.



Рис. 3.11. Відсоткове співвідношення живих і мертвих клітин лінії COLO 205 після 24 (А) та 72 (Б) годин культивування з твердими наночастинками, отриманими від згорання деревини сосни, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ).

Показник  $I_{sc}$  для ДС мав несхожі з жодними іншими ТНЧ значення (рис. 3.12. А). За концентрації 20 мкг/мл значення виходили на 30-хвилинне плато на рівні  $38,49 \pm 1,74 - 39,26 \pm 1,07 \mu A/cm^2$ , після чого наступні 45 хвилин швидко знижувалися до  $27,56 \pm 0,93 \mu A/cm^2$ . При збільшенні концентрації ДС до 40 мкг/мл сила струму знижувалася поступово до 60-ї хвилини експерименту, проте до 90-ї хвилини впала на  $8,57 \mu A/cm^2$  (з  $32,15 \pm 1,29$  до  $23,58 \pm 1,32$  відповідно).

Ще однією унікальною характеристикою ДС була їх здатність достовірно збільшувати парацелюлярну проникність епітеліального препарату товстої кишки щурів за найнижчої концентрації вже через 30 хвилин після додавання ДС у камеру Уссінга (рис. 3.12. Б).

Враховуючи отримані результати, ступінь токсичності ДС є неоднозначним. Припускаємо, що їхній вплив на живі організми може виявлятися по-різному залежно від типу клітин та біологічних процесів, які вони залучають.

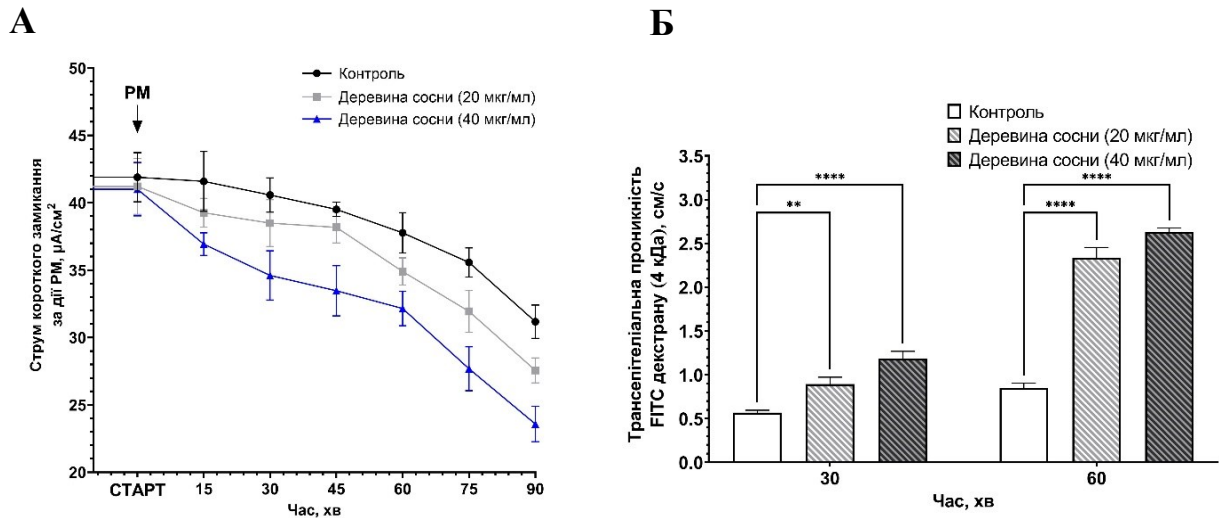


Рис. 3.12. Зміни електрофізіологічних показників епітеліального препарату товстої кишки під впливом твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини сосни, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 5$ ) та 40 мкг/мл ( $n = 5$ ): А – зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Б – зміна парацелюлярної проникності FITC-декстрану (4 кДа),  $\text{cm}/\text{s}$ . Результати представлені як  $M \pm \text{SEM}$ . \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

### 3.5. Визначення ступеня токсичності твердих наночастинок, отриманих від згорання гілля сосни

Гілля сосни має подібні до деревини властивості, проте соснові голки мають також воскові поверхні, які допомагають накопичуватися на них різним забруднювачам, через що їх часто використовують як біоіндикатори стійких органічних забруднювачів [191]. З метою перевірки можливої різниці в токсичності ТНЧ, отриманих від згорання гілля сосни (ГС) та деревини сосни, ми дослідили цей компонент окремо.

Протягом першої доби експерименту зниження кількості клітин було достовірним лише за концентрацій 40 і 80 мкг/мл (до  $413000 \pm 25813$  клітин/мл і  $288000 \pm 32575$  клітин/мл відповідно,  $p < 0,0001$ ). На третю добу експерименту (через 72 год) зменшення було виявлено і за концентрації 20 мкг/мл ( $961250 \pm$

60078 клітин/мл;  $p < 0,0001$ ). Ми встановили, що ГС мали найслабший ефект на клітини лінії COLO 205 порівняно з іншими досліджуваними ТНЧ (рис. 3.13.), проте вони викликають дозозалежний ефект, який стає більш виразним зі збільшенням часу експозиції ТНЧ на досліджуваний біологічний об'єкт.

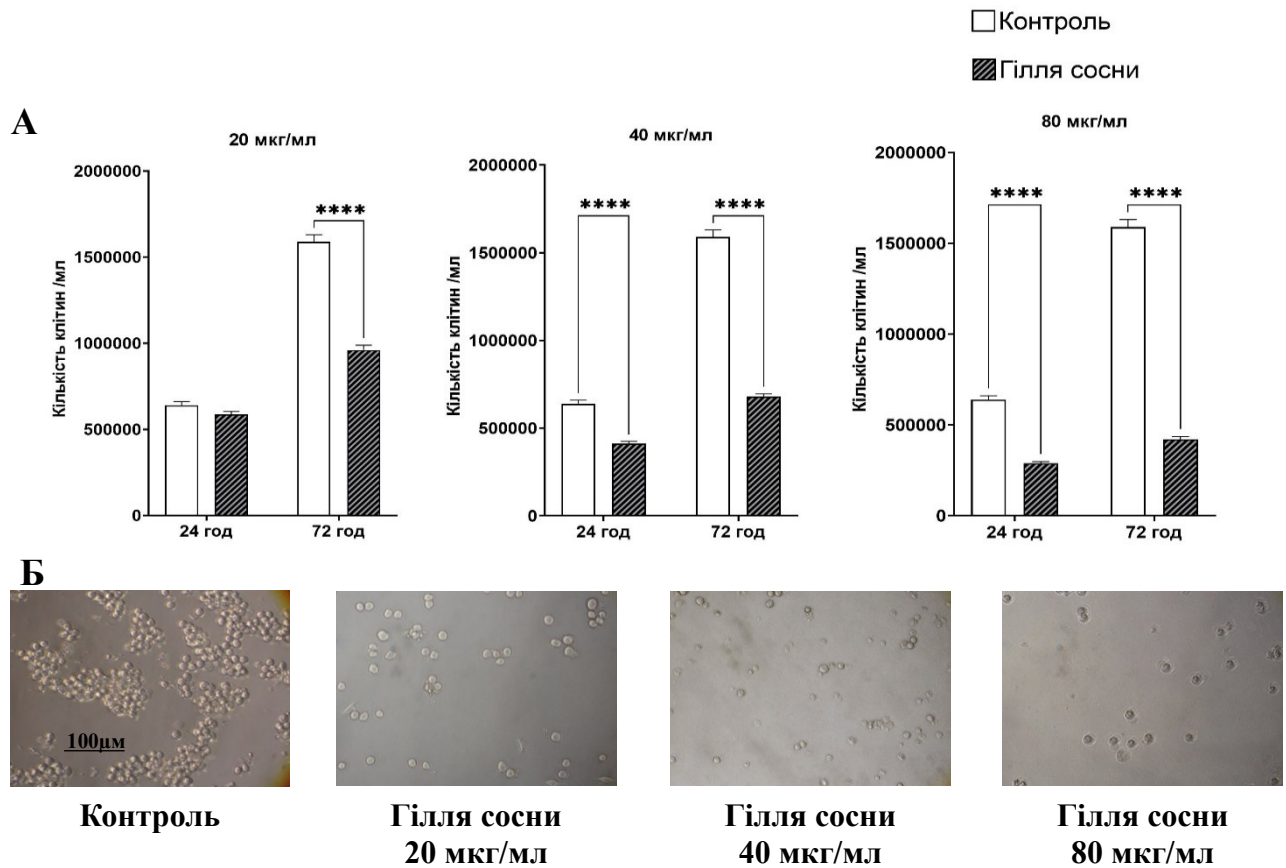


Рис. 3.13. Оцінка впливу твердих наночастинок, отриманих від згорання гілля сосни, на клітини лінії COLO 205 за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ): А – загальна кількість клітин (мертвих і живих) після 24 і 72 годин культивування, клітин/мл; Б – мікрофотографії клітин через 24 години культивування. Результати представлені як  $M \pm SEM$ . \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Особливістю результатів дослідження ГС є нелінійна залежність між їхньою концентрацією та кількістю живих клітин лінії COLO 205 на третій день експерименту (рис. 3.14.). Відзначено, що для концентрацій 20 і 40 мкг/мл кількість живих клітин на третю добу збільшилася порівняно з першою добою

експерименту. Однак, ця особливість не спостерігалася при концентрації 80 мкг/мл, де кількість живих клітин на третій день була максимальною (100 %), що свідчить про високу цитотоксичність ГС при високій концентрації на клітині лінії COLO 205.

Така нелінійна реакція клітин на різні концентрації ГС може вказувати на наявність певного адаптаційного механізму клітин, що дозволяє їм пережити та відновитися під дією меншої концентрації ГС. Наприклад, це може вказувати на тимчасовий чи перехідний стан клітинної лінії COLO 205 під впливом низьких концентрацій речовини, або на механізми активування захисних процесів клітин. Тоді як вищі концентрації можуть викликати сильнішу клітинну стресову відповідь та провокувати прогресію каскаду подій, що призводять до апоптозу.

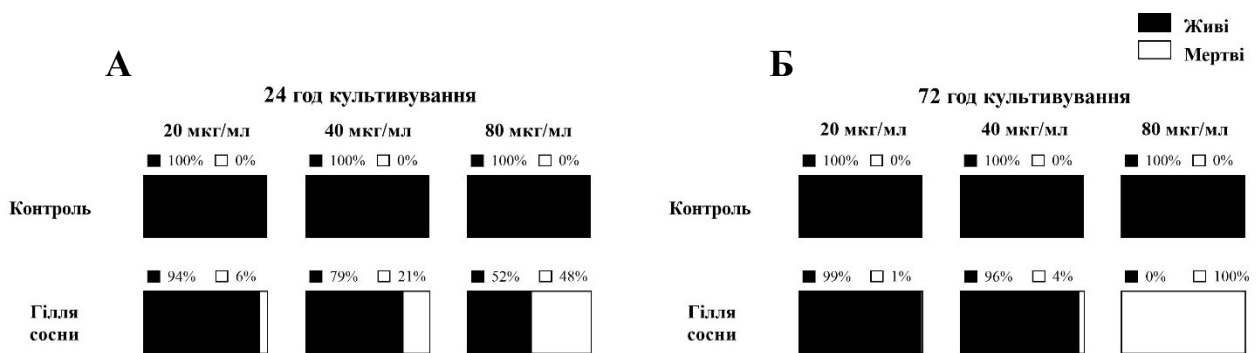


Рис. 3.14. Відсоткове співвідношення живих і мертвих клітин лінії COLO 205 після 24 (А) та 72 (Б) годин культивування з твердими наночастинками, отриманими від згорання гілля сосни, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 72$ ), 40 мкг/мл ( $n = 72$ ), 80 мкг/мл ( $n = 72$ ).

ГС мали суттєвий вплив на  $I_{sc}$  у камері Уссінга, знижуючи його значною мірою (рис. 3.15. А). При обох концентраціях (20 мкг/мл та 40 мкг/мл) вплив ГС був схожий і приводив до приблизно однакового загального зниження струму за весь експериментальний період ( $16,55 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  і  $17,73 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  відповідно). Однак, зауважимо, що для концентрації 20 мкг/мл ГС був зафіксований найнижчий серед усіх досліджуваних ТНЧ показник струму –  $23,21 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

ГС та ДТ виявили схожий вплив на проникність мукозо-субмукозального препарату товстої кишки, характеризуючись вираженим дозозалежним ефектом, який посилювався залежно від тривалості дослідження. Але ГС демонстрували слабший ефект у порівнянні з ДТ. На 60-ту хвилину експерименту проникність збільшилася на 0,97 см/с і 0,78 см/с для концентрацій 20 мкг/мл і 40 мкг/мл відповідно.

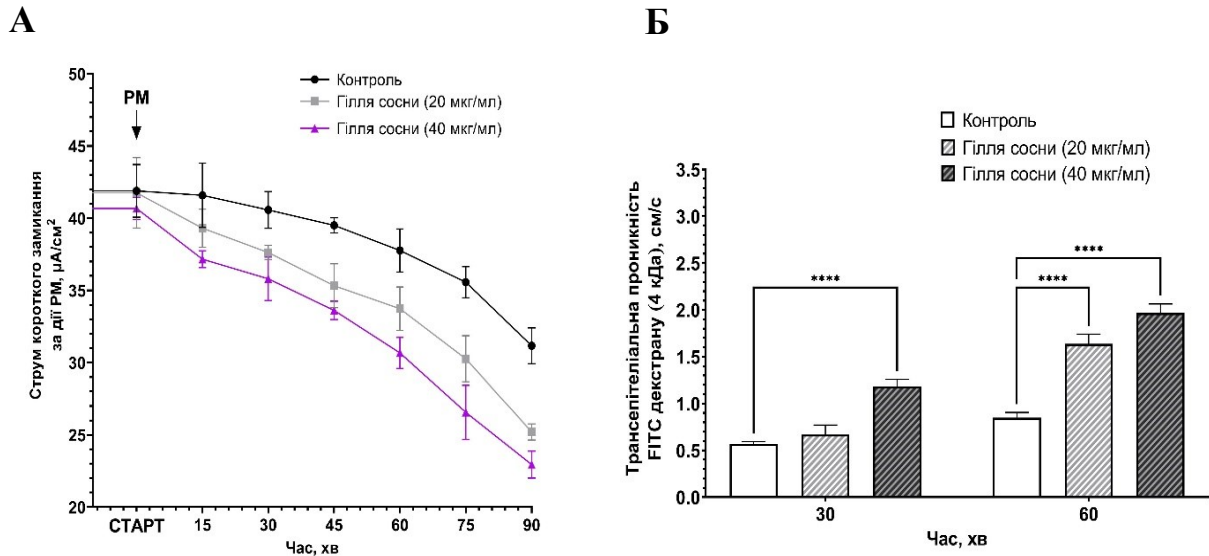


Рис. 3.15. Зміни електрофізіологічних показників епітеліального препарату товстої кишки під впливом твердих наночастинок, отриманих від згорання гілля сосни, за концентрацій 20 мкг/мл ( $n = 5$ ) та 40 мкг/мл ( $n = 5$ ): А – зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Б – зміна парацелюлярної проникності FITC-декстрану (4 кДа), см/с. Результати представлені як  $M \pm \text{SEM}$ . \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Таким чином, ми показали, що ГС мають відмінний вплив на клітини лінії COLO 205 та проникність мукозо-субмукозального препарату товстої кишки. Однак, їх вплив є менш вираженим порівняно з іншими досліджуваними ТНЧ.

## Висновки до розділу

1. Вперше визначено ступінь токсичності ТНЧ, отриманих з 5 різних джерел: деревини та кори берези, деревини тополі, деревини та гілля сосни, використовуючи дві моделі: *in vitro* дослідження з клітинами лінії COLO 205 (за здатністю до поділу і виживаністю клітин) та *ex vivo* дослідження з епітеліальним препаратом товстої кишки (за показниками струму короткого замикання та парацелюлярної проникності кишкового бар'єра). Усі досліджувані ТНЧ виявляли токсичну дію на клітини та епітеліальний препарат товстої кишки, цей вплив був дозозалежним і посилювався з часом.

2. Через 72 години культивування клітин COLO 205 з досліджуваними ТНЧ у концентрації 80 мкг/мл спостерігався дозозалежний ефект на здатність клітин до поділу. Найменш токсичними виявилися ДС та ГС. ДТ виявили найбільш токсичну дію.

3. Після культивування з досліджуваними ТНЧ співвідношення живих і мертвих клітин змінювалося індивідуально для кожного виду ТНЧ. На 24-ту годину культивування за концентрації 80 мкг/мл найменшу кількість мертвих клітин було виявлено за додавання КБ, а найбільшу – за додавання ДТ. Зі збільшенням культивування до 72 годин усі досліджувані ТНЧ, окрім ДС, викликали 100 %-у загибель клітин. При дослідженні доза-ефекту, найбільш токсичним виявилися ДТ, найменш токсичними – КБ та ГС.

4. Здатність досліджуваних ТНЧ за концентрації 40 мкг/мл зменшувати силу струму короткого замикання і посилювати витік іонів з часом можна упорядкувати таким чином (від менш до більш токсичних): КБ < ДБ < ДС < ГС < ДТ.

5. Найбільший вплив на збільшення парацелюлярної проникності (маркер FITC-декстран, 4 кДа) мукозо-субмукозального препарату товстої кишки щурів спостерігався за дії ДС: їх ефект за концентрації 20 мкг/мл був достовірним вже через 30 хвилин після початку запису. ДБ, ДТ та ГС за концентрації 20 мкг/мл

набували достовірних змін лише через 60 хвилин. КБ виявилися найменш дієвими порівняно з іншими. Найбільшу швидкість проникності на 60-ту хвилину запису було встановлено для ДТ.

## РОЗДІЛ 4

### ХАРАКТЕРИСТИКА БАР'ЄРНОЇ ФУНКЦІЇ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ КОРОТКО- І ДОВГОТРИВАЛОЇ ЕКСПОЗИЦІЇ ТВЕРДИХ НАНОЧАСТИНОК ПРИРОДНОГО ТА АНТРОПОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ

В залежності від свого походження та складу, ТНЧ можуть проявляти різні фізико-хімічні властивості. На попередньому етапі ми показали, що серед ТНЧ, що мають природного попередника, саме отримані від згорання деревини тополі (ДТ) виявляють найбільш виражені токсичні властивості та здатні впливати на життєздатність клітин і збільшувати епітеліальну проникність мукоза-субмукозального препарату товстої кишки при безпосередньому контакті з ними. Тому у подальших дослідженнях впливу ТНЧ природного походження *in vivo* ми використовували ДТ.

Окрім природних попередників джерелом ТНЧ може виступати діяльність людини: промислові процеси, транспортні вихлопи, спалювання відходів тощо [192]. Серед десятків ТНЧ, які походять від людської діяльності, за останні роки особливо важливим стає питання утворення ТНЧ внаслідок утилізації медичних масок [193, 194]. З моменту спалаху COVID-19 оцінювана кількість викинутих одноразових медичних масок по всьому світу становить 2,6 мільйона тон на день [195]. Головним способом утилізації масок є високотемпературне спалювання, яке призводить до викидів ТНЧ в атмосферу [196–198]. Склад медичних масок містить поліпропілен, поліестер, метали (особливо алюміній), латекс та спандекс. Однак, головна особливість масок полягає в їхній здатності захоплювати навколишні ТЧ [199, 200]. Ми припустили, що дана властивість може відобразитися на характеристиках ТНЧ, отриманих від спалення медичних масок (ММ), а також на їхню взаємодію з організмом. Тому ми використовували ММ як джерело ТНЧ антропогенного походження для подальших досліджень на тваринній моделі.

#### **4.1. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на бар'єрну функцію товстої кишки щурів за різних шляхів одноразового введення**

З літературних джерел відомо, що ТНЧ можуть потрапити в організм, дифундуючи у кров з альвеол [140]. Проте доведено також, що вони здатні потрапляти у ШКТ: (1) через ковтання повітря, яке вдихається; (2) із забрудненою їжею чи водою; (3) або шляхом мукоциліарного кліренсу [143]. Ці відомості дозволяють припустити, що стаціонарні концентрації ТНЧ у ШКТ можуть бути подібними до тих, що зустрічаються у легенях. Тому наступним завданням дослідження було порівняти вплив ТНЧ природного та антропогенного походження на зміни бар'єрної функції та розвиток запального процесу у кишечнику за різних шляхів одноразового введення: внутрішньовенного чи перорального.

##### **4.1.1. Зміни бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів за внутрішньовенного введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження**

Потрапляючи в кров, ТНЧ можуть розподілятися по всьому організму через кровотік та досягати різних органів та тканин, у тому числі кишечника. Після досягнення капілярів товстої кишки, вони мають можливість взаємодіяти з ендотеліальними клітинами, які вистилають внутрішню поверхню кровоносних судин. Така взаємодія може викликати зміни у структурі та функції ендотелію [140, 141].

Ми перевірили, чи здатні ТНЧ порушувати цілісність ендотелію кровоносних судин, оцінивши ступінь проникнення барвника ЕБ через ендотелій судин у слизову оболонку товстої кишки щурів.

Вже через 3 години після внутрішньовенного введення ТНЧ спостерігалось порушення цілісності ендотелію, яке було підтверджено збільшенням кількості барвника ЕБ в слизовій оболонці товстої кишки (рис. 4.1). Порівняно з контрольною групою, кількість барвника зростала у 2,1 рази за дії ДТ ( $4,3 \pm 0,17$ ;  $p < 0,01$ ) і у 1,9 рази за дії ММ ( $3,9 \pm 0,44$ ;  $p < 0,05$ ), що вказує на здатність обох типів ТНЧ впливати на ендотелій судин. ДТ при цьому спричиняв більш значне пошкодження ендотелію, що підтверджується вищим показником проникності.

Візуально резектовані фрагменти товстої кишки, які були піддані дії ТНЧ, мали ознаки почервоніння та дрібно-крапкових капілярних крововиливів (рис. 4.1. Б).

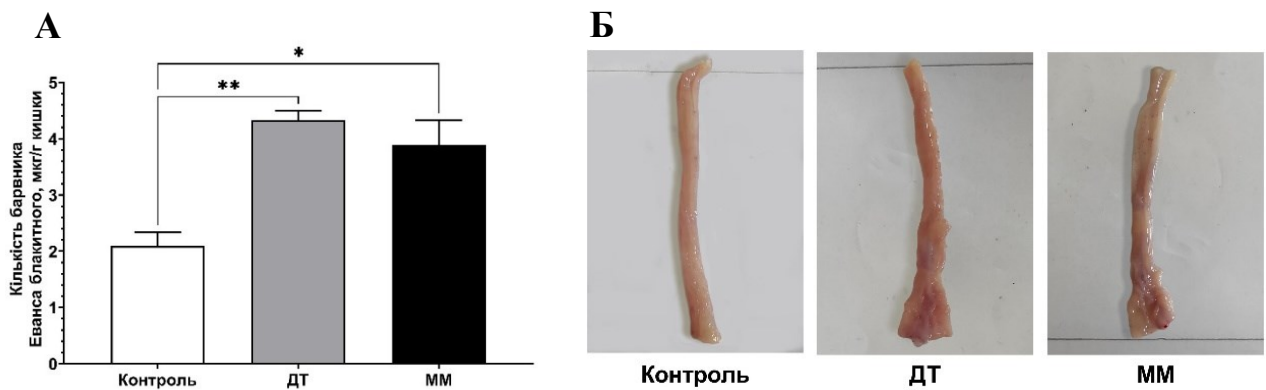


Рис. 4.1. Показники проникності ендотелію судин товстої кишки щурів через 3 години після внутрішньовенного введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 6$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 6$ ), у дозі 500 мкг/100 г маси тіла тварини: А – кількість барвника Еванса блакитного у слизовій оболонці товстої кишки, мкг/г кишки; Б – репрезентативні знімки товстої кишки. Контроль ( $n = 6$ ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

Про порушення цілісності ендотелію також свідчила наявність домішок крові у сечі, яку візуально виявили у більшості дослідних щурів, яким внутрішньовенно вводили ТНЧ. У 5 з 6 щурів, яким вводили ДТ, та у 3 з 6 щурів, яким вводили ММ, кров'яні домішки були виявлені у сечі вже через годину після

введення ТНЧ. У контрольній групі цей симптом був відсутній. На основі цих спостережень ми припускаємо, що внутрішньовенне введення ТНЧ може спричиняти пошкодження фенестрованих капілярів клубочка нефронів.

Внутрішньовенне введення ТНЧ збільшувало рівень активності МПО, посилюючи тим самим активацію імунної відповіді у слизовій оболонці товстої кишки щурів, що є ключовою ознакою запалення (рис. 4.2. А) [201].

Після внутрішньовенного введення ДТ активність МПО у товстій кишці щурів збільшилась на 43 % в порівнянні з контрольною групою (з  $12,18 \pm 1,25$  од/г кишки до  $17,44 \pm 1,16$  од/г кишки;  $p < 0,01$ ). При введенні ММ показник зростав лише на 26 % (до  $15,33 \pm 0,52$  од/г).

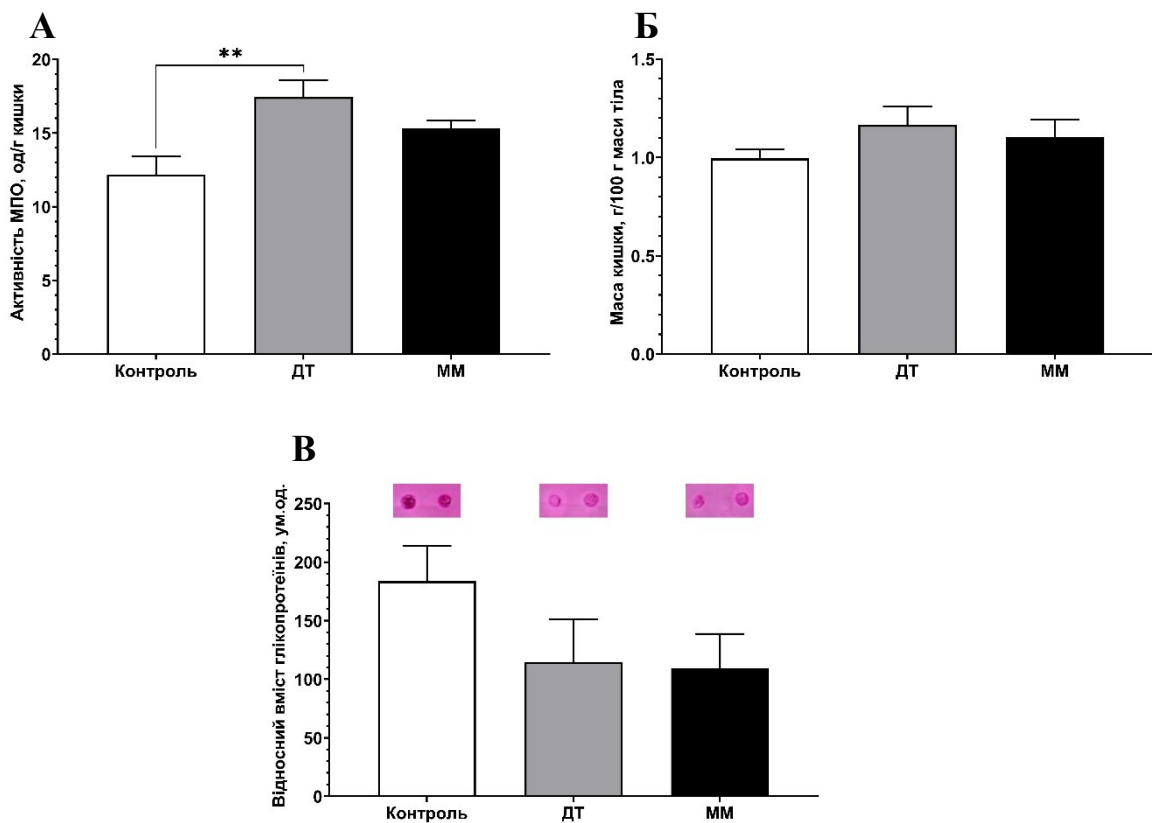


Рис. 4.2. Маркери розвитку запального процесу у товстій кишці щурів після внутрішньовенного введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 6$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 6$ ), у дозі 500 мкг/100 г маси тіла тварини: А – зміна активності мієлопероксидази (МПО), од/г кишки; Б – зміна маси товстої кишки, г/100 г маси тіла; В – рівень глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки, у.о. Контроль ( $n = 6$ ).  $M \pm SEM$ . \*\* -  $p < 0,01$

Підвищений рівень МПО вказує на розвиток запалення в кишці, яке зазвичай супроводжується збільшенням маси кишки (рис. 4.2. Б). Таке збільшення може бути зумовлене тканинним набряком, інфільтрацією імунних клітин, а також акумуляцією ексудату, що виникає під час запалення. У нашому дослідженні після гострого внутрішньовенного введення ТНЧ зміни маси кишки ще не були достатньо вираженими, але спостерігалася тенденція до зростання.

Дослідження змін глікопротеїнів слизу є важливим аспектом у вивченні бар'єрної функції кишечника, оскільки вуглеводний склад поверхневого слизу впливає на його якість та кількість, що своєю чергою визначає ефективність захисних механізмів. Через 3 години після внутрішньовенного введення ДТ і ММ було проведено аналіз зразків слизу кишечника за допомогою Шиф-реакції, яка дозволяє детектувати гліканову частину глікопротеїнів [180].

За результатами дослідження було встановлено, що ДТ та ММ не спричиняли змін кількості глікопротеїнів слизу кишечника через 3 годин після їх одноразового введення (рис. 4.2. В).

Таким чином, внутрішньовенне введення ТНЧ спричиняє ушкодження судинної стінки, тим самим активуючи процес запалення у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Однак, враховуючи незначні (недостовірні) зміни в кількості глікопротеїнів поверхневого слизу та відсутність змін у масі кишки, можна припустити, що за цього способу введення ТНЧ не мають прямого впливу на бар'єрну функцію слизової оболонки кишечника.

#### **4.1.2. Зміни бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів після перорального введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження**

Ендотеліальний бар'єр не зазнав вірогідних ушкоджень через 3 години після перорального введення ТНЧ обох типів (рис. 4.3). Проте у щурів, яким вводили

ММ, проникність була вище ніж у щурів, яким вводили ДТ ( $3,53 \pm 0,19$  мкг/г кишки  $> 2,83 \pm 0,08$  мкг/г кишки).

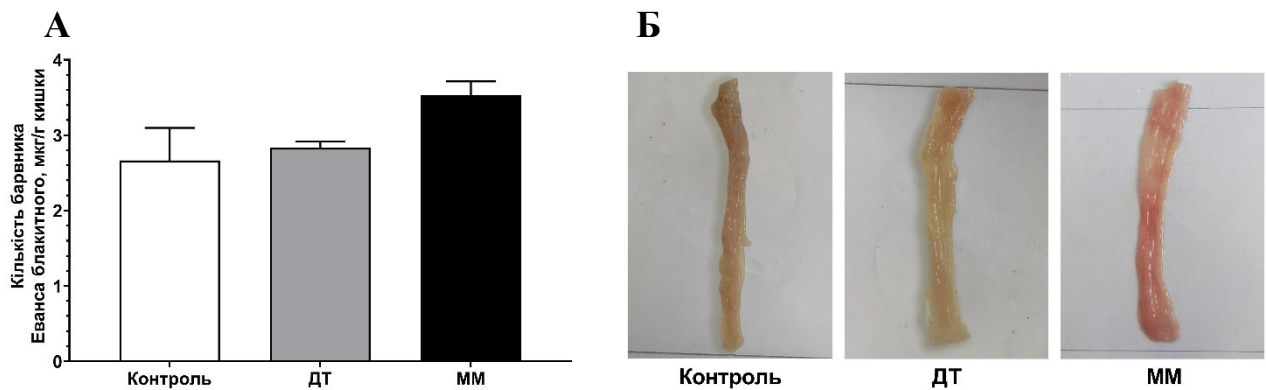


Рис. 4.3. Показники проникності ендотелію судин товстої кишки щурів через 3 години після перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 5$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 5$ ), у дозі  $180$  мкг/100 г маси тіла тварини: А – кількість барвника Еванса блакитного у слизовій оболонці товстої кишки, мкг/г кишки; Б – репрезентативні знімки товстої кишки. Контроль ( $n = 5$ ).  $M \pm SEM$ .

На фоні збільшеної проникності ендотелію після перорального введення ММ відбувалося збільшення рівня активності МПО до  $16,81 \pm 0,41$  од/г кишки, що було статистично значущим ( $p < 0,05$ ). З іншого боку, введення ДТ показувало тенденцію до зростання активності МПО, проте достовірної зміни не спостерігалось (рис. 4.4. А).

Також варто зазначити, що вірогідного збільшення маси кишки не було зафіксовано в обох групах, але відповідний тренд залишався, і показник для ММ був вищий за ДТ (рис. 4.4. Б).

Головною відмінністю при пероральному введенні було зменшення глікопротеїнів слизу кишки. Обидва ДТ і ММ призвели до зниження їх вмісту: у 1,8 раза ( $101,2 \pm 4,89$  у.о.;  $p < 0,05$ ) для ДТ та 2 рази ( $94,36 \pm 4,66$  у.о.;  $p < 0,05$ ) для ММ порівняно з контрольною групою, значення якої становили  $187,1 \pm 26,74$  у.о (рис. 4.4. В).

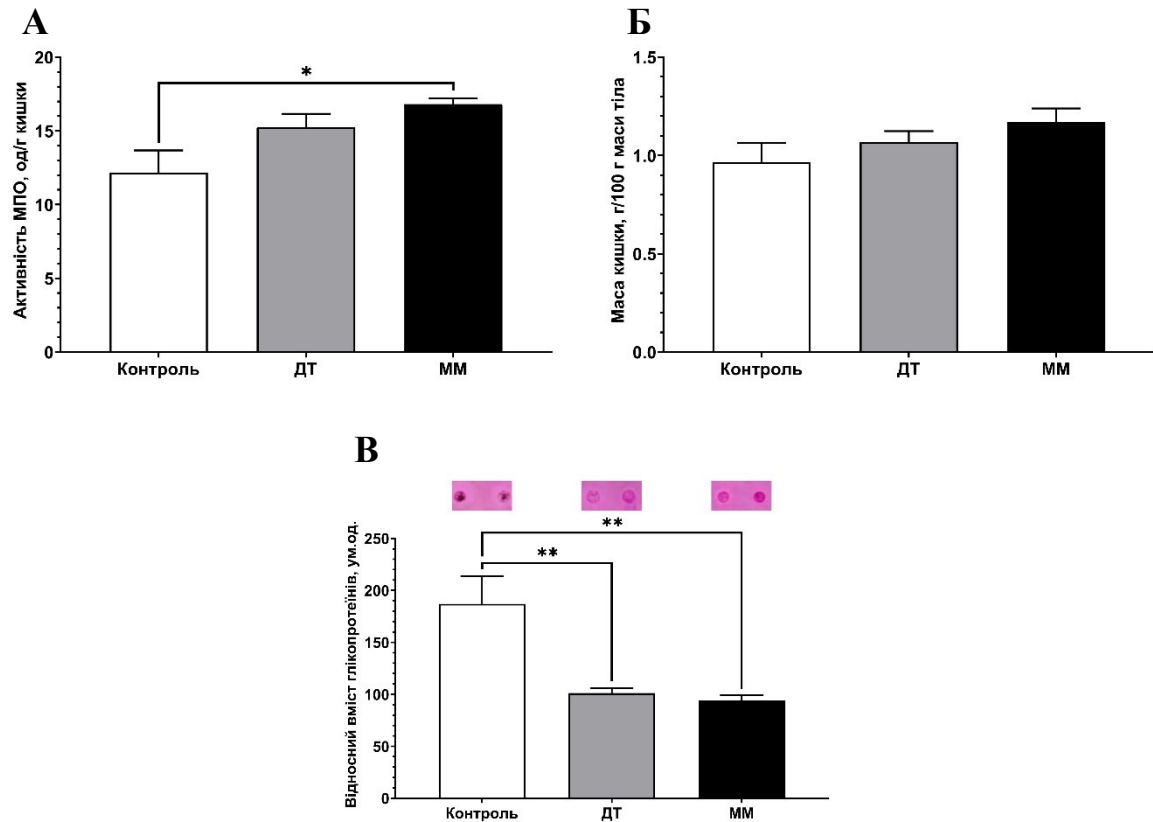


Рис. 4.4. Маркери розвитку запального процесу у товстій кишці щурів після перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 10$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 10$ ), у дозі 180 мкг/100 г маси тіла тварини: А – зміна активності мієлопероксидази (МПО), од/г кишки; Б – зміна маси товстої кишки, г/100 г маси тіла; В – рівень глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки, у.о. Контроль ( $n = 10$ ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

Оскільки одним із показників підвищення проникності епітелію товстої кишки є транслокація бактерій із просвіту кишківника у системний кровотік [202], ми визначали загальну кількість мікроорганізмів у зразку крові з ворітної вени щурів після перорального введення ТНЧ. Встановлено, що після 3-годинного впливу як ДТ, так і ММ кількість мікроорганізмів у крові щурів зросла з  $3,6 \pm 0,18 \lg \text{ КУО/мл}$  крові до  $4,4 \pm 0,58 \lg \text{ КУО/мл}$  крові, що свідчить про порушення цілісності кишківника (рис. 4.5.).

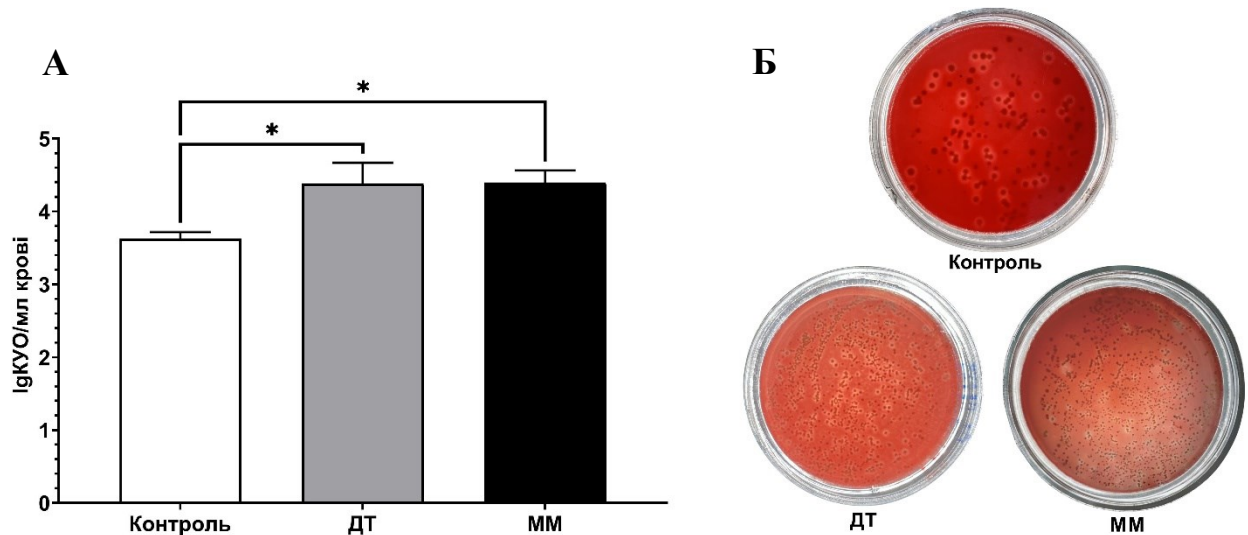


Рис. 4.5. Транслокація мікроорганізмів у кров ворітної вени через 3 години після перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 5$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 5$ ), у дозі 180 мкг/100 г маси тіла тварини: А – кількість мікроорганізмів у крові, lg КУО/мл; Б – репрезентативні знімки росту мікроорганізмів на кров'яному агарі. Контроль ( $n = 5$ ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$

Зміна складу слизу та суттєве збільшення мікробної транслокації у крові свідчать про порушення мукозального шару кишечника, що підтверджує порушення цілісності кишкового бар'єра після перорального введення ТНЧ. При цьому, у тварин, яким вводили ММ, маркери проникності були вище порівняно з тваринами, яким вводили ДТ.

Таким чином ми продемонстрували, що дія ТНЧ на бар'єрну функцію кишечника залежить від шляху їх потрапляння до органу, при цьому різні типи ТНЧ мають відмінності у впливі на рівень проникності бар'єра та запальної реакції в організмі.

## **4.2. Характеристика прозапальних змін у товстій кишці щурів після 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження**

Прозапальні зміни у товстій кишці щурів за довготривалої дії ТНЧ досліджували, застосовуючи пероральний шлях введення, оскільки при внутрішньовенному введенні було виявлено ряд недоліків. По-перше, внутрішньовенне введення не дає можливості контролювати дозу ТНЧ, які діють на кишечник. Наші результати показують, що за такого шляху введення першочерговим таргетом виступають судини. По-друге, з кров'ю ТНЧ можуть транспортуватися по всьому організму, вражаючи не тільки кишечник, а й інші органи, що може вносити неточності при дослідженні запальних процесів саме у кишечнику.

### **4.2.1. Вплив 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження на клінічні показники стану щурів**

Розвиток запального процесу часто супроводжується різними ускладненнями функціонування травної системи, такими як зміна моторики, виникнення закрепів, порушення процесів всмоктування води у товстій кишці. Для перевірки гіпотези, що ТНЧ спричиняють порушення клінічних показників стану тварин, було досліджено зміни загальної маси тіла щурів та оцінено відсоткові зміни вмісту води у фекаліях тварин через 7 діб після введення ДТ і ММ.

За 7 діб експерименту контрольна група тварин набрала  $22,9 \pm 2,11$  % від початкової маси тіла (рис. 4.6. А). У групи тварин, яка отримували ММ, цей приріст був меншим і становив  $14,7 \pm 1,96$  %. Натомість, тварини, які отримували ДТ, за цей період втратили  $10,18 \pm 9,99$  % маси ( $p < 0,001$ ).

Вміст води у фекаліях щурів, що отримували ТНЧ, був достовірно вищим у порівнянні з контрольною групою і становив  $62,28 \pm 1,44$  % для ДТ ( $p < 0,01$ ) і  $61,00 \pm 1,32$  % для ММ ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.6. Б).

Крім того, починаючи з 3 дня введення ТНЧ, у щурів спостерігалися прояви діареї: у 19 з 32 тварин з групи ДТ та у 14 з 32 тварин групи ММ. У контрольній групі діарея розвивалася лише у 7 з 32 тварин.

Важливо відмітити, що за весь час дослідження у групі, яка отримувала ДТ, загинуло 3 з 32 щурів. У групі, яка отримувала ММ, та групі контролю загинувих тварин не було.

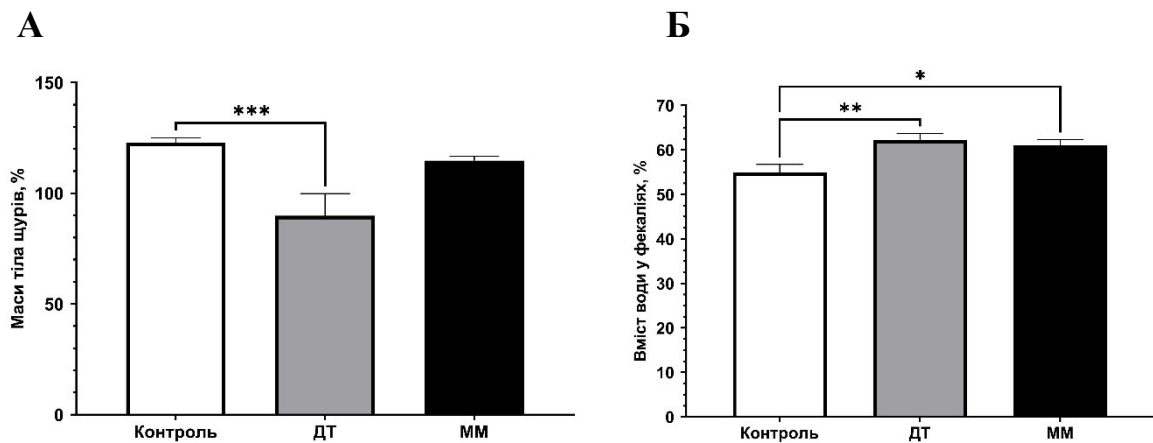


Рис. 4.6. Зміни фізіологічних показників у щурів після 7 діб перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 29$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 32$ ), у дозі  $180 \text{ мкг}/100 \text{ г}$  маси тіла тварини: А – різниця маси тіла, %; Б – частка води у фекаліях, %. Контроль ( $n = 32$ ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2. Зміни слизового бар'єра товстої кишки щурів після 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження

На попередньому етапі ми продемонстрували, що ТНЧ змінюють склад слизу після їх гострого введення *per os*. Тому ми перевірили, чи посилиться цей ефект при довготривалій дії частинок (рис. 4.7.). Було виявлено значне

зменшення відносного вмісту глікопротеїнів у слизі товстої кишки за дії ДТ ( $82,81 \pm 10,25$  у.о) і ММ ( $90,41 \pm 6,32$  у.о). Ці зменшення були статистично значущими ( $p < 0,001$ ) і вдвічі меншими за контрольний показник ( $185,00 \pm 19,28$  у.о), проте сильніший ефект спостерігався у групі, що отримувала ДТ.

Порівнюючи результати дослідження довготривалої дії ТНЧ з результатами короткотривалої дії, ми звернули увагу, що кількість глікопротеїнів слизу, встановлена після 3-годинного введення, через 7 днів залишалася стабільною у щурів, яким вводили ММ. Натомість ДТ продемонстрували більш інгібуючий вплив: рівень глікопротеїнів слизу протягом 7-денного періоду знизився ще на 18 % і становив  $82,81 \pm 10,25$  у.о.

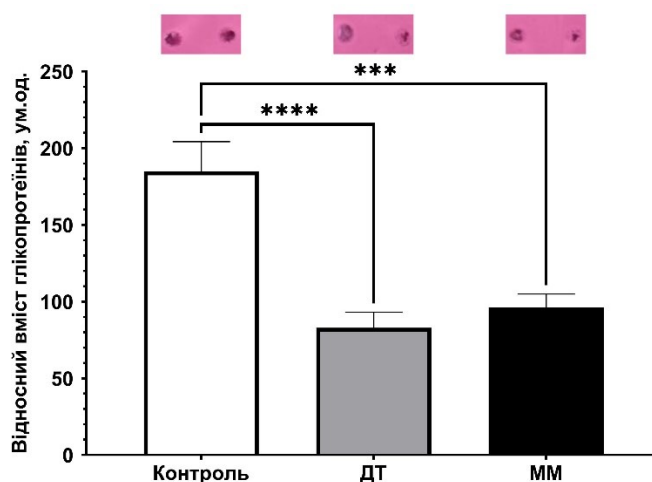


Рис. 4.7. Рівень глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 10$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 10$ ), у дозі  $180$  мкг/100 г маси тіла тварини, у.о. Контроль ( $n = 10$ ).  $M \pm SEM$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Подібна деградація слизового шару часто споріднена зі змінами якісного і кількісного складу кишкового мікробіоценозу [80]. Ми дослідили зміни

пристінкової мікробіоти товстої кишки щурів через 7 днів перорального введення ТНЧ (табл. 4.1.).

Нами встановлено, що пероральне введення ТНЧ протягом 7 діб призводить до порушення складу і різноманітності кишкової мікробіоти щурів. Зміни, спричинені ДТ і ММ, були подібними.

Під час дослідження виявлено тенденцію до зниження кількості лактозопозитивних *Escherichia coli*, водночас спостерігалася поява лактозонегативних штамів *E. coli*, які не висівалися у контрольній групі. Також було помічене збільшення кількості умовно-патогенних ентеробактерій і патогенного *Staphylococcus aureus*. Останній називають причиною розвитку різних кишкових розладів, таких як ентерит, діарея, а також ЗЗК [203]. Крім того, введення ТНЧ зумовлювало появу представників роду *Clostridium* – анаеробних спороутворюючих бактерій, які асоціюються із розвитком інфекційного процесу у кишечнику хворих на ВК і ХК [204].

Таблиця 4.1.

Зміни пристінкової мікробіоти товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження (lg КУО/г кишки). М±SEM; \* -  $p < 0,05$

Група мікроорганізмів	Контроль (n = 5)	ДТ (n = 5)	ММ (n = 5)
<i>Escherichia coli</i> (лактозопозитивні)	4,48±0,78	3,54±0,43	3,48±0,24
<i>Escherichia coli</i> (лактозонегативні)	0,00	1,94±0,94*	1,92±0,56*
Умовно-патогенні ентеробактерії	2,17±0,55	2,60±0,68	2,44±0,51
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,08±0,06	3,49±0,32	4,03±0,14
<i>Clostridium spp.</i>	0,00	1,33±0,27*	1,46±0,07*
<i>Bifidobacterium spp.</i>	8,50±0,42	8,09±0,35	7,37±1,13
<i>Lactobacillus spp.</i>	8,50±0,38	7,77±0,65	7,74±0,58

Анаеробно-цукролітична мікробіота, представлена родами *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*, не зазнала достовірних змін.

Збільшення кількості патогенних бактерій і зміна балансу мікробіоти може впливати на процес обміну метаболітами та захисні властивості кишечника, порушуючи слизовий бар'єр кишечника. А отже, отримані дані свідчать про здатність ТНЧ впливати не тільки на сам слиз, а й на мікробний гомеостаз товстої кишки.

Зміни в кишковій мікробіоті можуть призводити до активації нейтрофілів і вироблення вільних радикалів кисню, які можуть пошкоджувати слизову оболонку та прилеглі тканини [205, 206]. Зменшення захисних функцій слизової оболонки створює умови для збільшення транспорту токсинів та запальних медіаторів з кишечника у кровообіг. Усі ці механізми можуть взаємодіяти між собою та підсилювати один одного, спричиняючи збільшення проникності судин кишечника.

Ми підтвердили цю гіпотезу, дослідивши проникність ендотелію судин товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення ТНЧ (рис. 4.8.). У щурів, що отримували ДТ, кількість барвника ЕБ у товстій кишці збільшувалася на 44 % відносно контролю ( $4,97 \pm 0,33$  мкг/г кишки і  $3,45 \pm 0,28$  мкг/г кишки відповідно;  $p < 0,01$ ). У щурів, яким вводили ММ, кількість барвника виросла на 49 % ( $5,15 \pm 0,30$  мкг/г кишки;  $p < 0,01$ ). Важливо зазначити, що із пролонгуванням дії проникність судин стала більшою для обох типів ТНЧ.

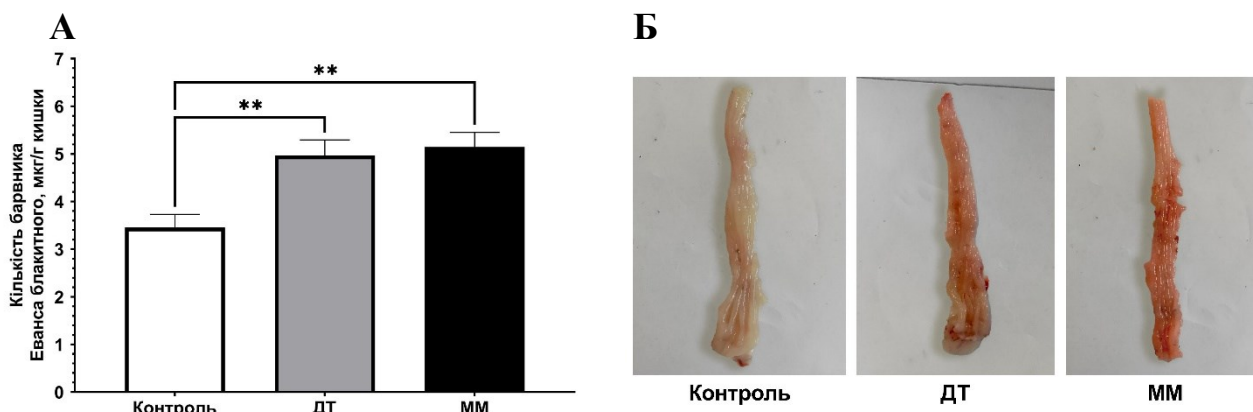


Рис. 4.8. Показники проникності ендотелію судин товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від

згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 10$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 10$ ), у дозі 180 мкг/100 г маси тіла тварини, мкг/г кишки. Контроль ( $n = 10$ ).  $M \pm SEM$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

Відомо, що функція кишкового бар'єра залежить від сукупних захисних властивостей слизового шару, кишкової мікробіоти, епітелію та імунних клітин [12, 14, 16]. Порухення цих компонентів дає змогу патогенним мікроорганізмам руйнувати і долати кишковий бар'єр. У результаті цього спостерігається зростання кількості бактерій у кровотоку [202].

Кількість мікроорганізмів у крові ворітної вени щурів у контрольній групі становила  $0,52 \pm 0,22$  lg КУО/мл крові (рис. 4.9.). Але після 7-добового введення ТНЧ транслокація значно зростала. У групи щурів, які отримували ММ, показник збільшився у 4,2 раза і становив  $2,23 \pm 0,15$  lg КУО/мл крові ( $p < 0,001$ ), а у групи, яка отримувала ДТ, значення було у 4,7 раз вищим, досягаючи  $2,45 \pm 0,28$  lg КУО/мл ( $p < 0,001$ ).

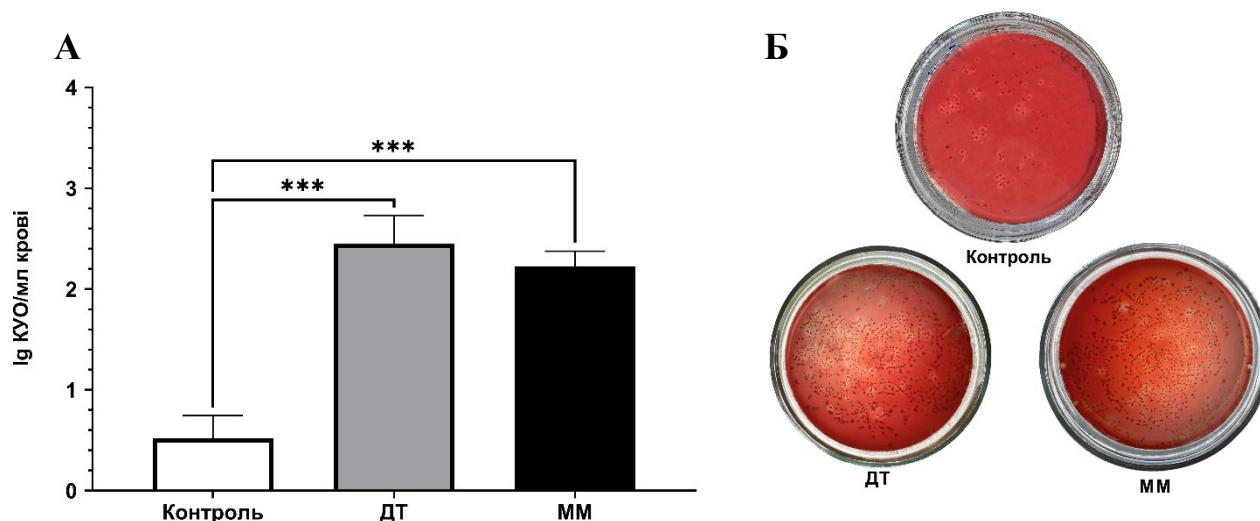


Рис. 4.9. Транслокація мікроорганізмів (lg КУО/мл) у крові ворітної вени щурів після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 5$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 5$ ), у дозі 180 мкг/100 г маси тіла тварини: А – кількість мікроорганізмів у крові, lg КУО/мл; Б – репрезентативні знімки росту мікроорганізмів на кров'яному агарі. Контроль ( $n = 5$ ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$  \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Отже, ми показали, що довготривала експозиція ТНЧ з деревини тополі та медичних масок у кишечнику деградує слизову оболонку, тим самим спричиняючи кількісні та якісні зміни складу мікробіоти і збільшуючи кількість патогенних мікроорганізмів, а також сприяє порушенню цілісності ендотелію судин та інвазії бактерій крізь мукозу у кровотік.

#### **4.2.3. Порушення електрофізіологічних показників епітелію товстої кишки щурів після 7-добового введення твердих наночастинок природного та антропогенного походження**

Електрофізіологічні показники епітелію дозволяють оцінити електричну активність тканин, а також досліджувати механізми, що забезпечують транспорт іонів, таких як  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , через клітинні мембрани [207]. Транспорт іонів є ключовим процесом для підтримання нормальної функції кишечника і його порушення є одним з ключових маркерів порушення епітеліального бар'єра кишечника [171].

Ми дослідили процеси електрогенного транспорту іонів в епітелії товстої кишки щурів після 7-добового впливу ТНЧ шляхом визначення змін  $I_{sc}$ , а також визначили парацелюлярну проникність епітелію, використовуючи 4-кДа FITC-декстран.

Як вже зазначалося раніше (див. п. 3.1.), за нормального стану тканини у камері Уссінга  $I_{sc}$  поступово знижується з часом. У контрольній групі початкове значення становило  $71,82 \pm 3,43 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$  і за 45 хвилин знизилося до  $62,57 \pm 1,41 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (рис. 4.10. А). У тварин, які піддавалися довготривалій дії ТНЧ, було виявлено статистично значуще ( $p < 0,05$ ) зниження  $I_{sc}$  на 20 % порівняно з контрольною групою на старті запису, і це зниження залишалось достовірним протягом усього експерименту.

Порівнюючи дію ДТ і ММ можна констатувати, що ММ знижував  $I_{sc}$  сильніше. До кінця запису показник знизився на  $13,29 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $p < 0,01$ ) у щурів, що отримували ММ, у той час, як зниження на  $11,79 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  у щурів, що отримували ДТ, не було достовірним.

У щурів, яким вводили ММ, також спостерігалася менш інтенсивна відповідь на додавання  $50 \mu\text{M}$  карбахоліну у порівнянні з групою ДТ:  $96,60 \pm 9,34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  та  $184,89 \pm 44,12 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  відповідно ( $p < 0,05$ ). При додаванні карбахоліну за дії ДТ також спостерігалася тенденція до зниження  $I_{sc}$  (рис. 4.10. Б). Карбахолін-стимульований транспорт іонів опосередкований переважно секрецією іонів  $\text{Cl}^-$  через апікальні трансмембранні канали CFTR, що лежить в основі механізму всмоктування води через епітелій [208]. Таким чином, порушення карбахолін-стимульованої секреції через епітелій товстої кишки щурів після 7-добового введення ТНЧ свідчить про понижену секрецію іонів  $\text{Cl}^-$ .

У ході дослідження також було продемонстровано, що трансепітеліальна проникність 4-кДа FITC-декстрану через епітелій товстої кишки щурів після довготривалої дії ТНЧ була більшою ніж у щурів групи контролю (рис. 4.10. В). Через 45 хвилин за дії ДТ швидкість проникності становила  $20,67 \pm 0,88 \text{ cm/s}$ , що було статистично значущим у порівнянні з контролем ( $13,67 \pm 0,88 \text{ cm/s}$ ,  $p < 0,01$ ). За дії ММ це значення становило  $16,50 \pm 2,16 \text{ cm/s}$ , що теж було вище за контроль, проте ця різниця не була достовірною.

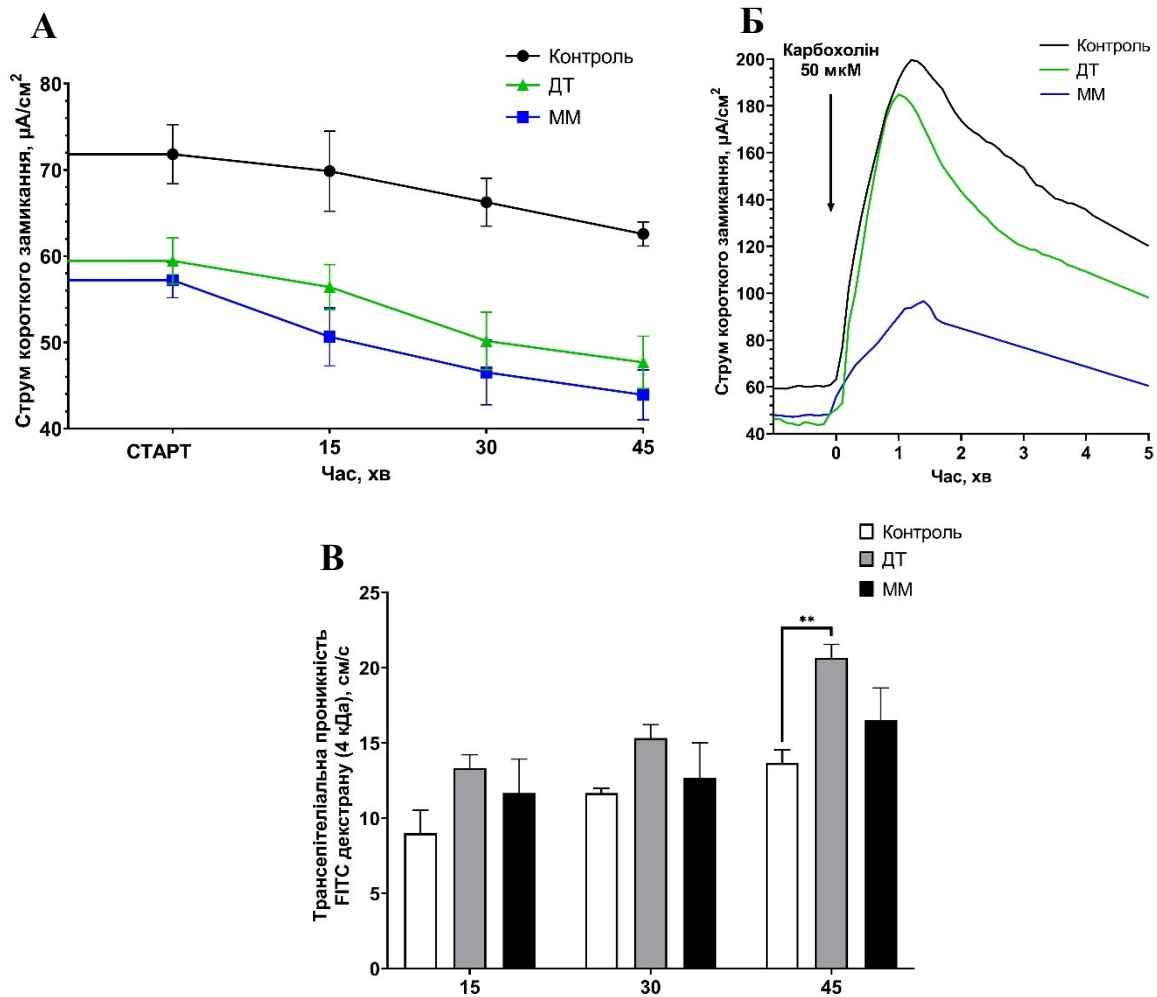


Рис. 4.10. Зміна електрофізіологічних показників епітелію товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 4$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 6$ ), у дозі 180  $\mu\text{кг}/100$  г маси тіла тварини: А – зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{А}/\text{см}^2$ ; Б – дія карбахоліну (50  $\mu\text{М}$ ) на показники струму короткого замикання,  $\mu\text{А}/\text{см}^2$ ; В – зміна трансепітеліальної проникності FITC-декстрану (4 кДа),  $\text{см}/\text{с}$ . Контроль ( $n = 6$ ).  $M \pm \text{SEM}$ . \*\* -  $p < 0,01$ .

Таким чином, у результаті дослідження ми показали, що після 7-денного введення ТНЧ у щурів порушувався електрогенний іонний транспорт та збільшувалася парацелюлярна проникність, що може свідчити про порушення функціонування міжклітинних контактів, а отже – про порушення епітеліального бар'єра кишечника.

#### 4.2.4. Роль твердих наночастинок природного та антропогенного походження у розвитку прозапальних процесів у товстій кишці щурів

7-добове введення ТНЧ мало негативний вплив на рівень активності МПО у товстій кишці щурів (рис. 4.11. А). Достовірне ( $p < 0,01$ ) збільшення активності МПО спостерігалось у тварин груп, яким вводили ДТ або ММ. При чому обидва типи ТНЧ рівнозначно збільшували рівень активності МПО на 20 % відносно контролю (з  $12,00 \pm 0,16$  од/г кришки до  $14,43 \pm 0,35$  од/г кришки для ДТ і  $14,50 \pm 0,35$  од/г кришки для ММ).

Пропорційно до зростання рівня активності МПО збільшувалася маса товстої кишки (рис. 4.11. Б). У групи, яка отримувала ДТ, приріст маси органу відносно контролю становив  $0,24$  од/г кишки, а у групи, яка отримувала ММ, –  $0,21$  од/г кишки. Відповідно, можна говорити про подібну силу впливу обох типів ТНЧ на утворення набряку у товстій кишці щурів після їх довготривалого введення.

Ще одним маркером розвитку запального процесу в організмі є зміна розмірів таких імунних органів, як селезінка та цекум. Селезінка, як найбільший з периферичних лімфоїдних органів, виконує широкий спектр імунологічних функцій [209]. На відміну від інших лімфоїдних органів, селезінка не має аферентної лімфатичної системи, і тому всі антигени та клітини досягають селезінки через кров. Деякі дослідження показують, що селезінка також відіграє важливу роль в імунній відповіді слизової оболонки кишечника [210, 211]. У нашому дослідженні достовірне ( $p < 0,05$ ) збільшення селезінки спостерігалось лише в щурів, яким вводили ДТ (рис. 4.11. В). У щурів, яким вводили ММ, розмір селезінки залишався на рівні контрольних значень ( $0,57 \pm 0,03$  г/100 г маси тіла і  $0,55 \pm 0,03$  г/100 г маси тіла відповідно).

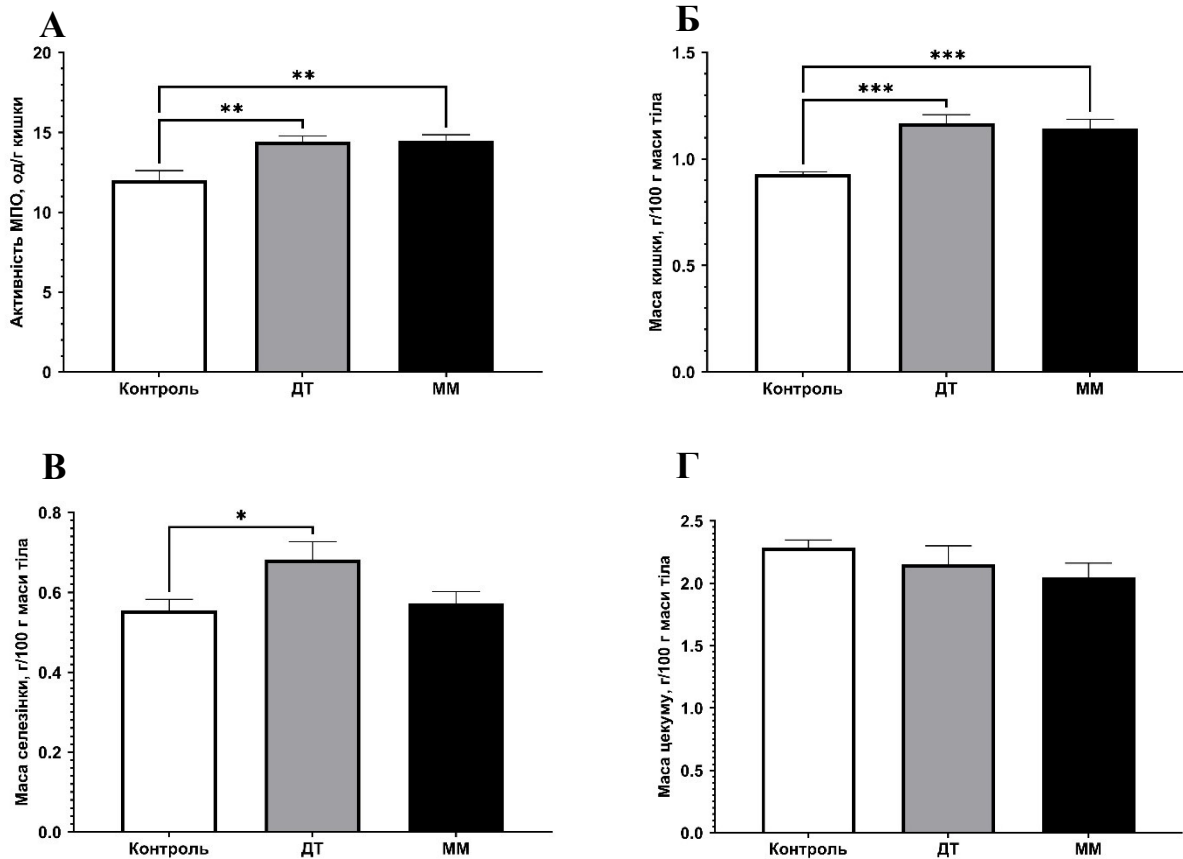


Рис. 4.11. Маркери розвитку запального процесу у товстій кишці щурів після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 14$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 16$ ), у дозі 180 мкг/100 г маси тіла тварини: А – зміна активності мієлопероксидази (МПО), од/г кишки; Б – зміна маси товстої кишки, г/100 г маси тіла; В – зміна маси селезінки, г/100 г маси тіла; Г – зміна маси цекуму, г/100 г маси тіла. Контроль ( $n = 16$ ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Імунна функція цекума, або сліпої кишки, пов'язана з наявністю апендикса. Апендикс містить лімфоїдні фолікули, що здатні виробляти антитіла як реакцію на чужорідні агенти, які можуть потрапляти в організм через систему травлення [212]. Певний тренд до зменшення розмірів цекуму простежувався у нашому дослідженні (рис. 4.11. Г), проте ці зміни не були достовірними.

Одним із факторів, що сприяють розвитку запальних процесів, останні дослідження називають оксидативний стрес – дисбаланс між утвореними в

тканині вільними радикалами і антиоксидантами, з переважанням перших. У кишечнику оксидативний стрес може бути одним із факторів, що сприяють розвитку запальних процесів, збільшуючи рівень прозапальних цитокінів [34]. З початком розвитку оксидативного стресу збільшується активація редокс-чутливих транскрипційних факторів, одним з яких є EGR-1 (early growth response 1, білок ранньої відповіді 1). EGR-1 може швидко активуватися при запальних реакціях, його рівень збільшується, внаслідок чого він може впливати на генетичну експресію, сприяючи виробленню прозапальних молекул та підсилюючи запальний процес [213].

Визначення рівня експресії редокс-чутливого транскрипційного фактора EGR-1 у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення ТНЧ показало тенденцію до його суттєвого підвищення порівняно з контролем (рис. 4.12.). У слизовій оболонці щурів, яким вводили ММ, рівень EGR-1 був у 1,5 раза вищим за контрольні значення, а у щурів, яким вводили ДТ, – у 1,9 раза. Проте отримані значення не були статистично вірогідними.

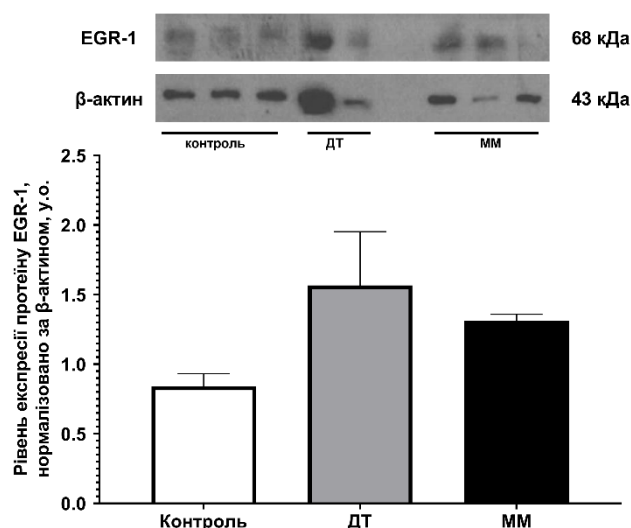


Рис. 4.12. Рівень транскрипційного фактору Egr-1 у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 2$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 3$ ), у дозі 180 мкг/100 г маси тіла тварини. Контроль ( $n = 3$ ). Вестерн-блот аналіз.  $M \pm SEM$ .

Отже, пероральне введення ТНЧ протягом 7 діб викликало виражену імунну відповідь у товстій кишці щурів, збільшуючи рівні активності МПО та експресії EGR-1, а також масу селезінки і товстої кишки. Більш виражені зміни спостерігалися після введення ДТ.

### **4.3. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на перебіг запальних процесів у кишечнику щурів за йодоацетамід-індукованого коліту**

Отримані нами результати досліджень продемонстрували, що довготривала експозиція ТНЧ у кишечнику здорових щурів спричиняє пошкодження кишкового бар'єра та індукує прозапальні процеси. За даними досліджень, подібні зміни асоційовані із розвитком ЗЗК. На основі цих висновків ми висунули гіпотезу, що ТНЧ здатні посилювати схильність до розвитку коліту.

#### **4.3.1. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на зміни проникності слизової оболонки товстої кишки за йодоацетамід-індукованого коліту**

Ми підтвердили, що за ЙА-індукованого коліту зміст поверхневого слизу товстої кишки, мікробна транслокація та цілісність ендотелію судин товстої кишки щурів були порушені (рис. 4.13. А). Кількість глікопротеїнів слизу у контрольної групи з модельованим колітом достовірно ( $p < 0,0001$ ) зменшилася відносно контрольної групи здорових щурів.

Також, достовірне ( $p < 0,05$ ) зниження кількості гліканів спостерігалось у щурів контрольної групи з модельованим колітом (контроль+коліт) та групи з колітом, якій вводили ММ (ММ+коліт): різниця між цими групами становила

30,86 у.о. ( $49,79 \pm 5,25$  у.о. для ММ+коліт і  $80,67 \pm 6,20$  у.о. для контролю+коліт). Щури з групи, якій вводили ДТ з модельованим колітом (ДТ+коліт) не мали статистично значущих відмінностей порівняно із контролем+коліт.

Цікаво, що рівні транслокації бактерій у кров ворітної вени щурів з модельованим колітом під впливом ДТ і ММ не відрізнялися від групи контролю+коліт, чий показник зріс у 5,7 разів відносно контролю (рис. 4.13. Б).

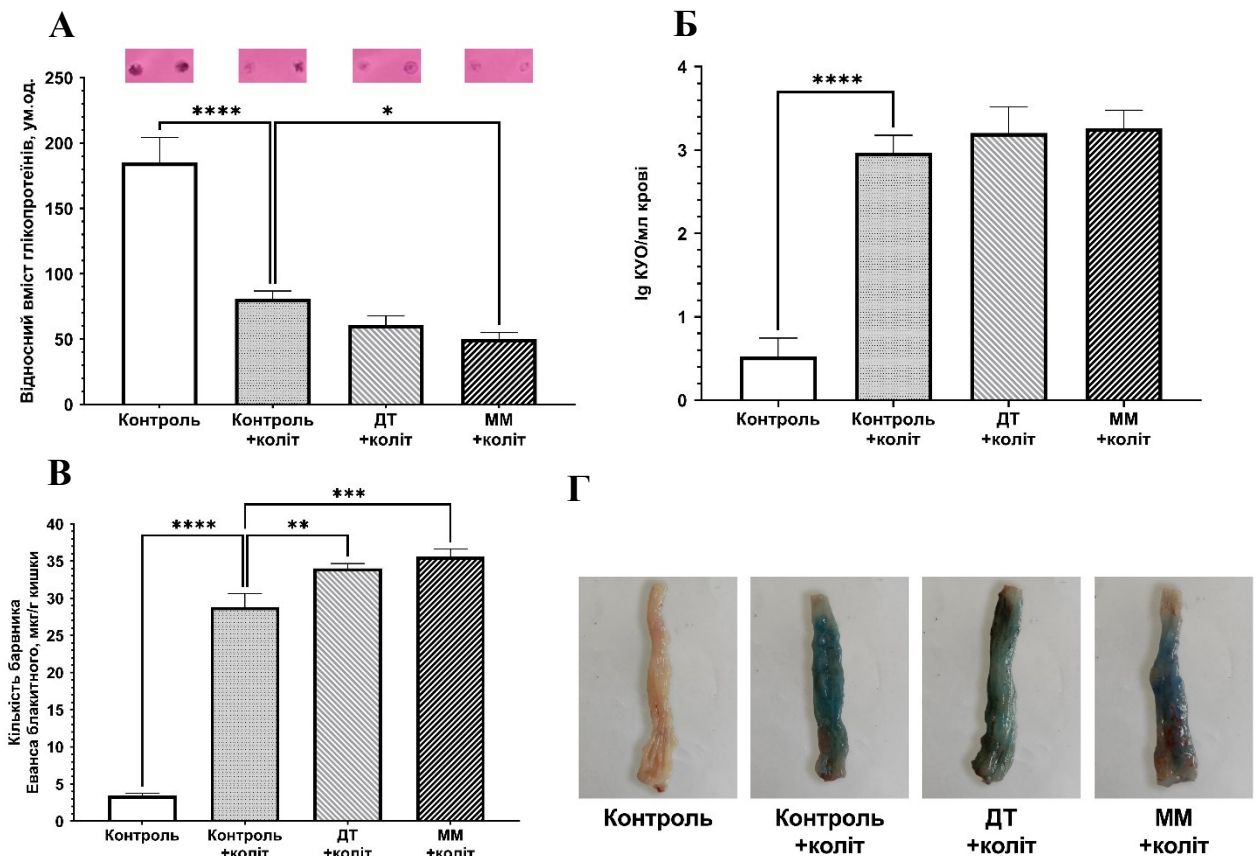


Рис. 4.13. Зміни бар'єрної функції кишечника щурів з йодоацетамід-індукованим колітом після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 10$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 10$ ), у дозі  $180 \text{ мкг}/100 \text{ г}$  маси тіла тварини: А – глікопротеїнів поверхневого слизу, у.о.; Б – кількість мікроорганізмів у крові ворітної вени, Ig КУО/мл; В – кількість барвника Еванса блакитного у слизовій оболонці товстої кишки, мкг/г кишки; Г – репрезентативні знімки товстої кишки. Контроль ( $n = 10$ ), контроль+коліт ( $n = 10$ ).  $M \pm SEM$ . \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Відомо, що пошкодження ендотелію та підвищення ендотеліальної проникності товстої кишки передують дисфункції епітеліального бар'єра за розвитку ВК [214]. Цей факт було підтверджено і в ході нашого дослідження десятикратною відмінністю кількості барвника ЕБ між контрольними групами ( $p < 0,0001$ ). На додаток, введення як ДТ, так і ММ ще більше посилювало проникність судин, порівняно з групою контролю+коліт (рис. 4.13. В). Для обох типів ТНЧ результат був статистично вірогідним ( $p < 0,01$  для ДТ і  $p < 0,001$  для ММ), проте для ММ+коліт значення було вищим.

#### **4.3.2. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на іонний транспорт та трансепітеліальну проникність товстої кишки щурів за йодоацетамід-індукованого коліту**

Існує велика кількість доказів порушення нормального функціонування іонного транспорту у хворих на ЗЗК. Зокрема, відомо про зниження активності  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФази [215] та  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ -обмінника [216] і порушення регуляції епітеліальних  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  каналів [217–219]. При чому низьке всмоктування натрію разом із підвищеною екскрецією калію сприяють виникненню діареї, пов'язаної із ЗЗК [220].

У нашому експерименті у щурів з модельованим колітом усіх груп стартове значення  $I_{sc}$  було достовірно ( $p < 0,01$ ) нижче контролю (рис. 4.14. А). Для контрольної групи впродовж 45 хвилин це значення знижувалося на  $9,25 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (до  $62,57 \pm 1,40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). У тварин контрольної групи з модельованим колітом зниження на  $11,05 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  було поступовим як і в контролю. Такий самий ефект спостерігався у групи ДТ+коліт. Проте у тварин з модельованим колітом, яким вводили ММ, зниження було стрімким: за 45 хвилин  $I_{sc}$  знизився на  $17,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , що свідчить про більший вплив ММ на транспорт іонів.

За умов ЙА-викликаного коліту не виникало різкого карбахолін-викликаного стрибка  $I_{sc}$  (рис. 4.14. Б). Для групи контролю+коліт максимальне значення досягало  $79,18 \pm 3,95 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , що у 2,5 раза нижче за пікове значення у

групі контролю ( $p < 0,05$ ). Крім того, відповідь на дію карбахоліну у груп із модельованим колітом починалася раніше (на 48 секунд проти 72 секунд для контролю).

Пікові значення у груп ДТ+коліт і ММ+коліт були ще більш інгібовані і становили  $52,47 \pm 29,68$  і  $51,52 \pm 9,20$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  відповідно. Проте, якщо за дії ДТ значення  $I_{sc}$  поверталось до початкового за 36 секунд, то за дії ММ повернення до початкових значень не відбувалося до кінця запису.

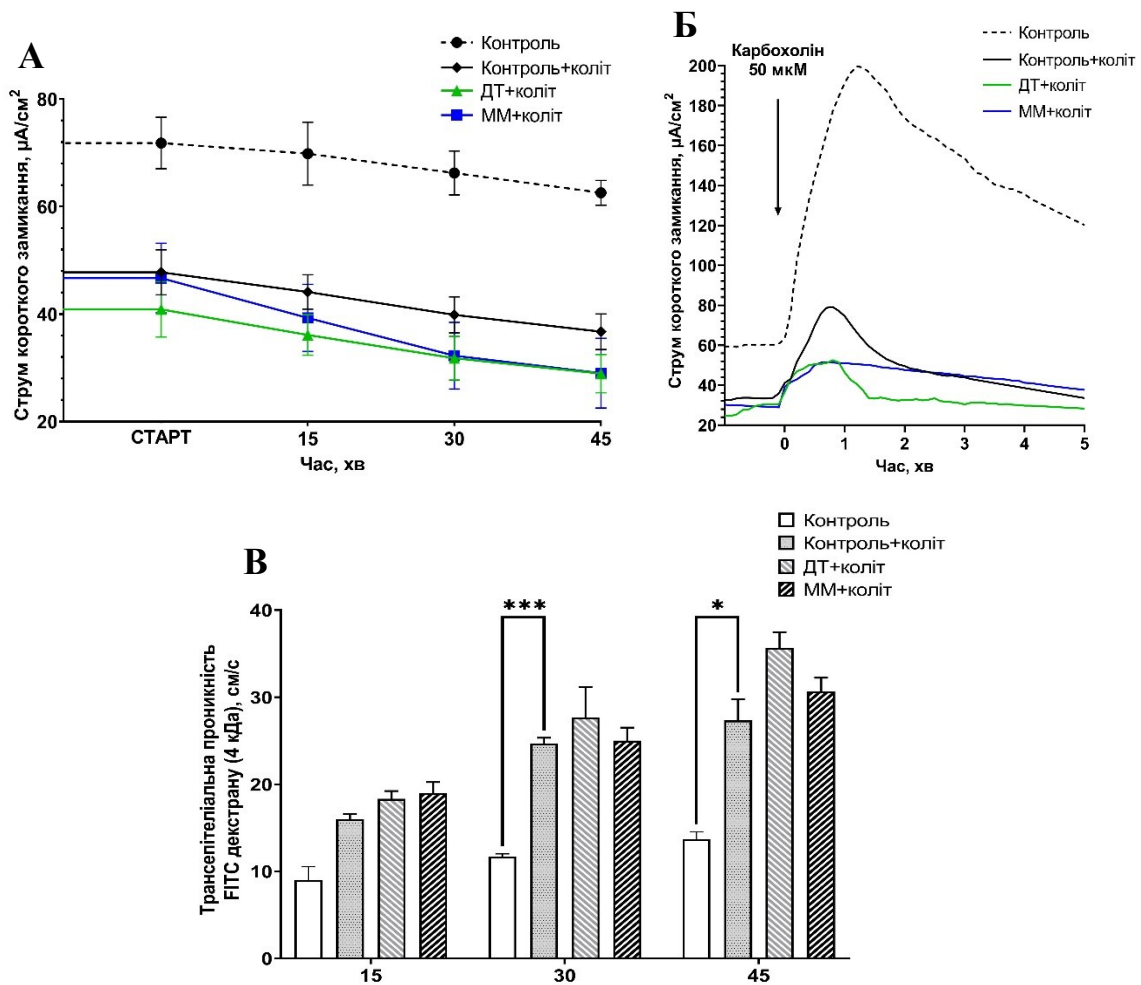


Рис. 4.14. Зміна електрофізіологічних показників епітелію товстої кишки щурів з йодоацетамід-індукованим колітом після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 5$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 6$ ), у дозі  $180 \text{ мкг}/100 \text{ г}$  маси тіла тварини: А – зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Б – дія карбахоліну ( $50 \text{ мкМ}$ ) на показники струму короткого замикання,

$\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; В – зміна трансепітеліальної проникності FITC-декстрану (4 кДа), см/с. Контроль (n = 6), контроль+коліт (n = 6).  $M \pm \text{SEM}$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Модельований коліт також зумовлював збільшення швидкості проникнення FITC-декстрану (рис. 4.14. В). Вже через 30 хвилин цей показник групи контроль+коліт був вдвічі вищим за показник контролю ( $p < 0,001$ ), і така пропорція залишалася до кінця запису. У груп з ЙА-індукованим колітом, яким вводили ТНЧ, відмічали прискорення проникності відносно групи контроль+коліт. Особливо вираженим цей ефект був для групи ДТ+коліт. Через 45 хвилин показник парацелюлярної проникності у цієї групи був на 30 % вищим за відповідне значення групи контролю з модельованим колітом. Проте ці зміни не набули статистичної вірогідності.

### **4.3.3. Ефект твердих наночастинок природного та антропогенного походження на прозапальні зміни за умови йодоацетамід-індукованого коліту**

Імунна відповідь відіграє ключову роль у патогенезі запальних захворювань кишечника. ЗЗК характеризуються імунологічним дисбалансом слизової оболонки кишечника, головним чином пов'язаним з клітинами адаптивної імунної системи, які реагують на власні антигени, що призводить до неконтрольованого виходу прозапальних цитокінів. Це сприяє активації запальних шляхів та виникненню хронічних запальних станів.

ЙА-викликаний коліт спричиняв достовірні збільшення рівня активації МПО ( $p < 0,0001$ ), маси кишки ( $p < 0,0001$ ) та селезінки ( $p < 0,05$ ) у порівнянні із контрольною групою щурів. 7-добове введення ТНЧ поглиблювало негативні дії коліту. Рівень МПО однаково збільшувався як у тварин, що отримували ДТ, так і

тварин, що отримували ММ (до  $22,11 \pm 0,31$  і  $22,32 \pm 0,25$  од/г кишки відповідно; рис. 4.15. А).

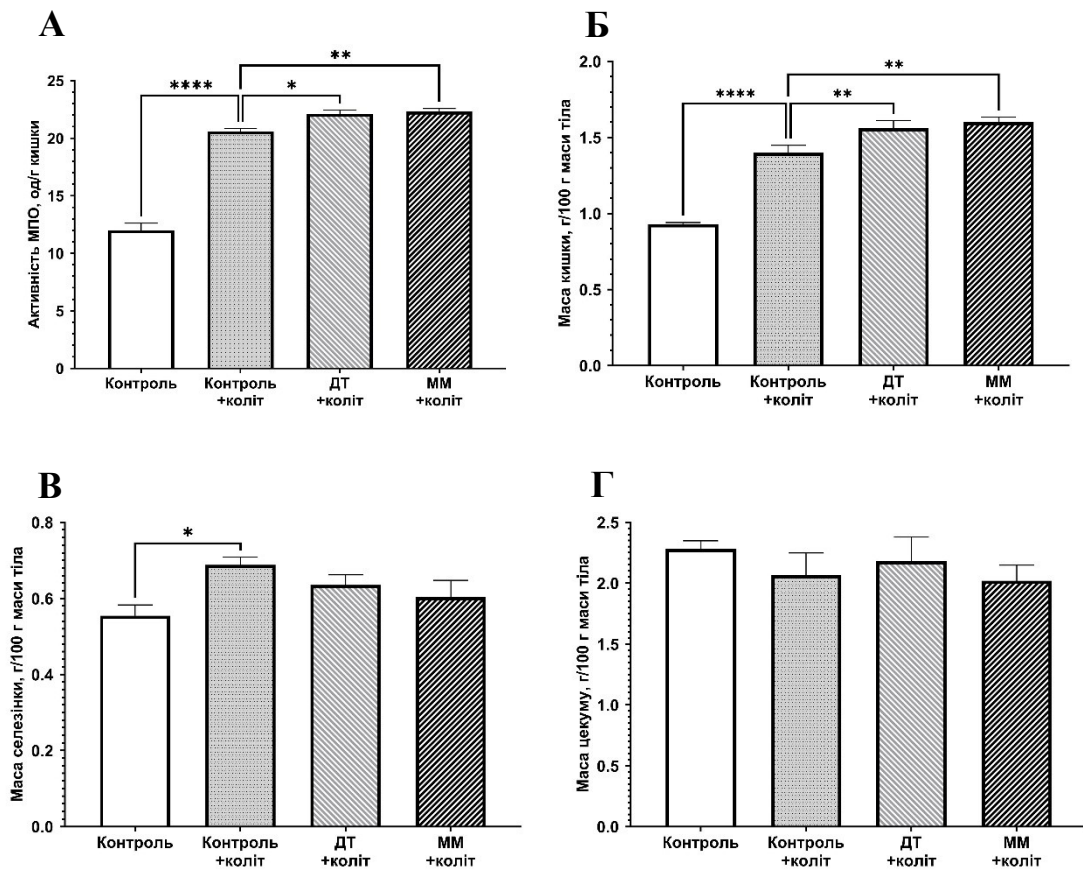


Рис. 4.15. Маркери розвитку запального процесу у товстій кишці щурів з йодоацетамід-індукованим колітом після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 15$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 16$ ), у дозі  $180 \text{ мкг}/100 \text{ г}$  маси тіла тварини: А – зміна активності мієлопероксидази (МПО), од/г кишки; Б – зміна маси товстої кишки, г/100 г маси тіла; В – зміна маси селезінки, г/100 г маси тіла; Г – зміна маси цекуму, г/100 г маси тіла. Контроль ( $n = 16$ ), контроль+коліт ( $n = 16$ ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

Крім того, дія ТНЧ на фоні модельованого коліту посилювала набряк у товстій кишці, збільшуючи її масу (рис. 4.15. Б). І знову сила впливу обох типів ТНЧ була подібна: маса товстої кишки збільшувалася до  $1,56 \pm 0,05 \text{ г}/100 \text{ г}$  маси

тіла для ДТ і до  $1,60 \pm 0,03$  для ММ. Збільшення було статистично значущим для обох типів ТНЧ ( $p < 0,01$  відносно групи контроль+коліт).

Але у щурів із модельованим колітом на фоні 7-добового введення ТНЧ не змінювалася маса імунних органів: селезінки та цекуму. Хоча варто зазначити наявність тенденції до зниження маси селезінки у цих двох груп.

Активація редокс-чутливих транскрипційних факторів відіграє важливу роль у патогенезі ЗЗК. Раніше, проведені дослідження продемонстрували підвищення рівня протеїну EGR-1 та його переміщення в ядро клітин слизової оболонки товстої кишки під час розвитку ЙА-індукованого виразкового коліту у щурів [221]. У нашому дослідженні також спостерігалось збільшення рівня експресії EGR-1 у слизовій оболонці щурів з ЙА-індукованим колітом, яке посилювалося 7-добовим введенням ТНЧ (рис. 4.16.). Найбільш вираженим це збільшення було в слизовій оболонці щурів з модельованим колітом, яким вводили ДТ. Рівень експресії EGR-1 у цій групі становив  $3,34 \pm 0,76$  у.о., що у 1,2 раза більше за значення для групи контроль+коліт.

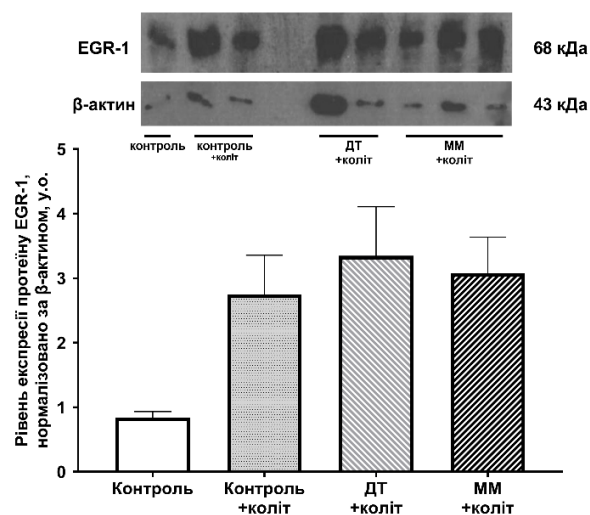


Рис. 4.16. Рівень транскрипційного фактора Egr-1 у слизовій оболонці товстої кишки щурів з йодоацетамід-індукованим колітом після 7-добового перорального введення твердих наночастинок, отриманих від згоряння деревини тополі (ДТ,  $n = 2$ ) та медичних масок (ММ,  $n = 3$ ), у дозі  $180 \text{ мкг}/100 \text{ г}$  маси тіла тварини. Контроль ( $n = 1$ ), контроль+коліт ( $n = 2$ ). Вестерн-блот аналіз.  $M \pm SEM$ .

Таким чином, отримані нами результати підтвердили нашу гіпотезу, що 7-добове введення ТНЧ здатне поглиблювати негативні наслідки та перебіг захворювання, сприяючи збільшенню чутливості щурів до розвитку коліту.

### **Висновки до розділу**

1. Тверді наночастинки природного та антропогенного походження проявляють негативний вплив на бар'єрну функцію товстої кишки щурів вже через 3 години після їх введення, і цей ефект посилюється в залежності від тривалості їх експозиції. Механізм дії та сила впливу твердих наночастинок на кишковий бар'єр значною мірою залежать від шляху їх потрапляння до органу та їх складу.

2. Внутрішньовенне введення твердих наночастинок вже за 3 години викликає серйозне ушкодження судинної системи та активує запалення через пошкодження судинних стінок. Проте, збереження стабільності слизового шару та відсутність змін у масі кишки свідчать про те, що при даному способі введення тверді наночастинки не мають прямого впливу на бар'єрну функцію кишечника.

3. Пероральне введення твердих наночастинок через 3 години призводить до зміни складу слизу та значного збільшення мікробної транслокації у кров, що свідчить про порушення мукозального шару кишечника та порушення цілісності кишкового бар'єра. Також встановлено, що рівень активності мієлопероксидази виявилися вищими у тварин, яким вводили тверді наночастинки, отримані від згорання медичних масок.

4. Довготривале пероральне введення твердих наночастинок протягом 7 діб погіршувало загальний фізіологічний стан щурів, призводячи до втрати ваги, збільшення вмісту води у фекаліях і розвитку діареї. Тривале введення твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі, призводило до збільшення випадків загибелі тварин.

5. Довготривала експозиція твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі та медичних масок, у кишечнику щурів спричинює деградацію слизової оболонки, зміни складу мікробіоти зі збільшенням кількості патогенних мікроорганізмів, сприяє порушенню цілісності ендотелію судин та інвазії бактерій крізь мукозу у кровотік. В результаті 7-добового перорального введення твердих наночастинок у щурів спостерігали збільшену іонну секрецію і порушення міжклітинних контактів, що викликало виражену імунну відповідь у товстій кишці щурів, збільшуючи рівні активності МПО та експресії EGR-1, а також збільшивши масу імунних органів. Більш виражені зміни спостерігалися після введення твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі.

6. Введення твердих наночастинок протягом 7 діб посилювало негативні наслідки йодоацетамід-індукованого коліту у щурів, збільшуючи проникність мукозального, ендотеліального та епітеліального бар'єра, порушуючи електрогенний транспорт іонів та посилюючи імунну відповідь організму.

## РОЗДІЛ 5

### ХАРАКТЕРИСТИКА КІЛЬКІСНИХ ТА ЯКІСНИХ ЗМІН ПРЕДСТАВНИКІВ МІКРОБІОТИ КИШЕЧНИКА ПІСЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ У СЕРЕДОВИЩІ ІЗ ТВЕРДИМИ НАНОЧАСТИНКАМИ

При дослідженні *in vivo* ми показали, що, потрапивши у кишечник, РМ можуть уражати не тільки безпосередньо кишкові клітини, але й мікробіоту. Додатково, низка досліджень показала, що ТНЧ здатні змінювати кількісне співвідношення і видову різноманітність кишкової мікробіоти, що, своєю чергою, може призвести до дисбіотичних порушень [24, 158, 222] та запальних захворювань кишечника [11]. Крім того, РМ можуть впливати на метаболічні процеси, що відбуваються в кишечнику. Наприклад, змінювати активність ферментів, коротколанцюгових жирних кислот та інших мікробних метаболітів [24, 222]. Тому наступним завданням нашої роботи було порівняти дію ДТ і ММ на ростові показники і метаболічну активність представників транзитної (*Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*) та облігатної (*Lactobacillus plantarum*) мікробіоти кишечника.

#### **5.1. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники, здатність до утворення біоплівки та продукування молочної кислоти *Lactobacillus plantarum* 691**

Рід *Lactobacillus* відноситься до облігатних представників організму людини. І хоча мікроорганізми цього роду не є панівною групою серед нормобіоти, проте завдяки своїм важливим фізіологічним функціям відносяться до показових при діагностуванні дисбіотичних порушень [223]. Лактобацили виявляються у ротовій порожнині, шлунку, кишечнику, а також на шкірі та у

вагінальному біотопі, забезпечуючи колонізаційну резистентність макроорганізму [224–226], тому зміна їх кількості та метаболічної активності має велике значення.

У наших дослідженнях показано, що ДТ здійснював помірний пригнічувальний вплив на динаміку росту *Lactobacillus plantarum* 691 зі зростанням його концентрації у середовищі (рис. 5.1. А). Концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл не впливали на тривалість lag-фази і протягом перших 24 годин культивування зменшення приросту біомаси не було статистично значущим. Починаючи з 24-ї години реєстрували достовірне ( $p < 0,01$ ) зниження активності росту при 40 мкг/мл ДТ в середовищі, яке зберігалось до кінця експерименту. Концентрація 80 мкг/мл здійснювала виражений вплив на розвиток популяції вже за перші 8 годин культивування: ми відмічали подовження тривалості lag-фази до 9 годин і пригнічення росту порівняно із контролем ( $0,83 \pm 0,04$  у.о. і  $1,55 \pm 0,04$  у.о., відповідно;  $p < 0,01$ ).

Життєздатність клітин після культивування з різними концентраціями ДТ також знижувалась зі зростанням концентрації ТНЧ в середовищі, проте мала бактеріостатичний вплив (рис. 5.1. Б). Крім того, достовірний бактеріостатичний ефект спостерігали лише за концентрації 80 мкг/мл: впродовж 24 годин кількість клітин практично залишалась на рівні посівної концентрації. На 48 годину за цієї концентрації відмічали зростання кількості клітин *L. plantarum* 691, а на 72 годину спостерігали різке відмирання клітин. За тривалого впливу (72 години) нижчих концентрацій ДТ також зменшувалася КЖК *L. plantarum* 691: до  $5,10 \pm 0,17$  lg КУО/мл для концентрації 20 мкг/мл ( $p < 0,05$ ) та  $4,33 \pm 0,35$  lg КУО/мл для концентрації 40 мкг/мл ( $p < 0,01$ ), контроль становив  $6,35 \pm 0,31$  lg КУО/мл.

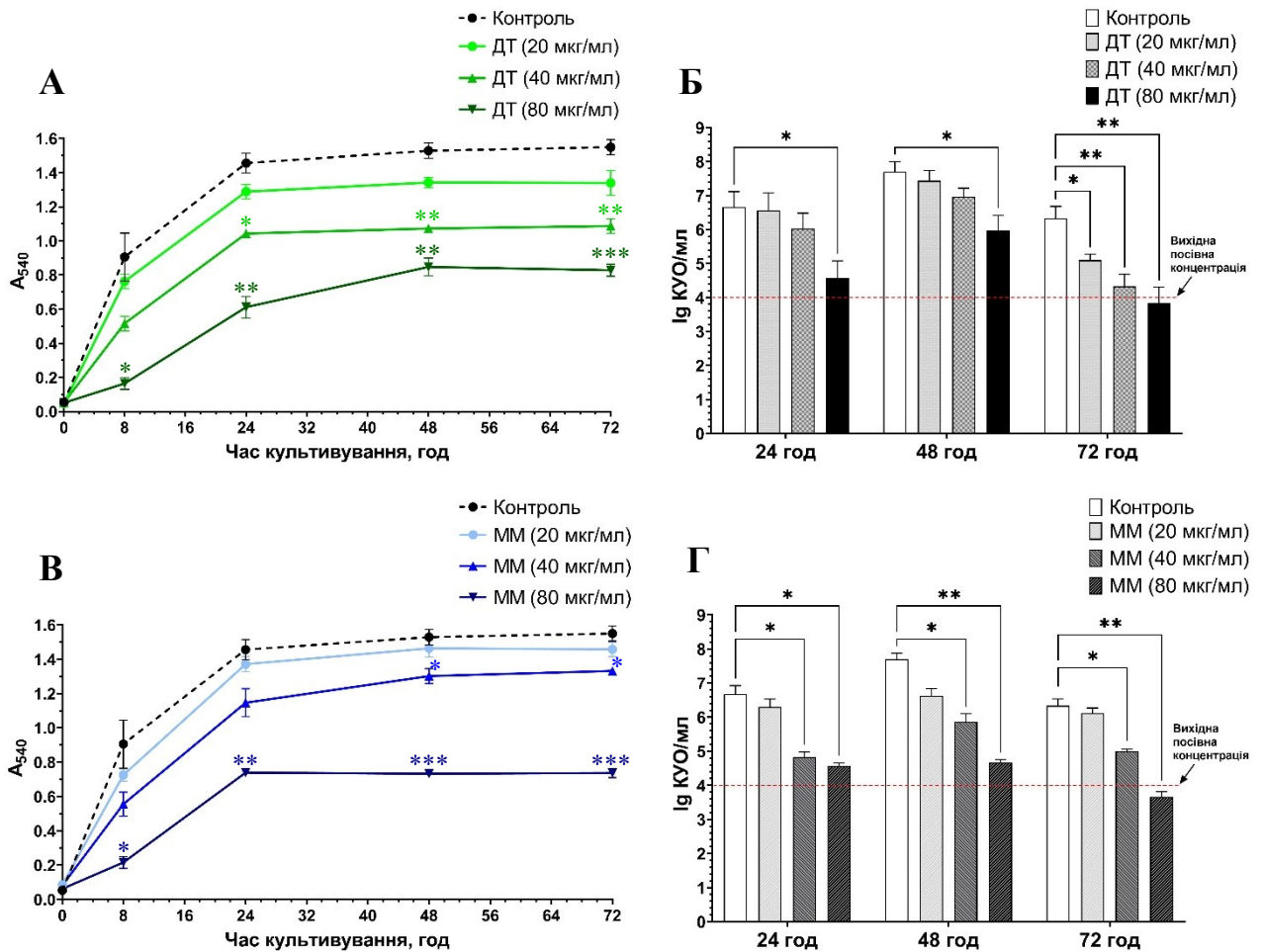


Рис. 5.1. Рости показники *Lactobacillus plantarum* 691 під впливом різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ): А – Інтенсивність росту, у.о.; Б – кількість життєздатних клітин lg КУО/мл; та твердих наночастинок, отриманих від згорання медичних масок (ММ): В – інтенсивність росту, у.о.; Г – кількість життєздатних клітин, lg КУО/мл.  $M \pm SEM$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Подібний ефект спостерігали і при сумісному культивуванні *L. plantarum* 691 у середовищі з різними концентраціями ММ (рис. 5.1. В). Проте слід зазначити, що концентрація 20 мкг/мл ММ не здійснювала достовірного пригнічення інтенсивності росту впродовж всього періоду дослідження (72 години). Концентрації 40 мкг/мл сприяла як подовженню lag-фази, так і зменшенню інтенсивності росту. За концентрації ММ 80 мкг/мл інтенсивність

росту на 24 годину культивування була вдвічі меншою ( $p < 0,01$ ) за контрольні значення і не змінювалася до кінця періоду дослідження.

Достовірний вплив на КЖК, що розмножуються, мали дві концентрації ММ: 40 мкг/мл та 80 мкг/мл (рис. 5.1. Г). Проте і за цих концентрацій більша частина клітин посівної дози залишалась життєздатною. На 72 годину різниця в інтенсивності розмноження між контролем та дослідними концентраціями ММ складала 1,5-2 порядки для 40 мкг/мл і 2-3 порядки – для 80 мкг/мл.

Основним продуктом метаболізму представників роду *Lactobacillus* є молочна кислота, яка виконує ряд важливих функцій у макроорганізмі: знижує рН, пригнічує патогенну мікробіоту, бере участь у процесах окисного фосфорилування тощо [227].

У наших дослідженнях продемонстровано, що обидва типи ТНЧ вкрай негативно впливають на здатність штаму *L. plantarum* 691 продукувати молочну кислоту (рис. 5.2.). З підвищенням концентрації ТНЧ у середовищі досліджуваній штам після 24 годин культивування поступово знижував свою здатність продукувати молочну кислоту. При цьому ДТ навіть за найнижчої концентрації, 20 мкг/мл, достовірно ( $p < 0,01$ ) знижував кислотність молока, за найвищої концентрації 80 мкг/мл кислотність знижувалася більше ніж вдвічі (з  $27,80 \pm 0,47$  °Т до  $11,67 \pm 0,35$  °Т;  $p < 0,0001$ ). Ефект дії ММ був значно меншим, достовірне зниження відмічали лише за концентрації 80 мкг/мл ( $p < 0,001$ ). Після 48 годин культивування з ДТ і ММ за концентрації 80 мкг/мл штам *L. plantarum* 691 практично повністю втрачав здатність продукувати молочну кислоту.

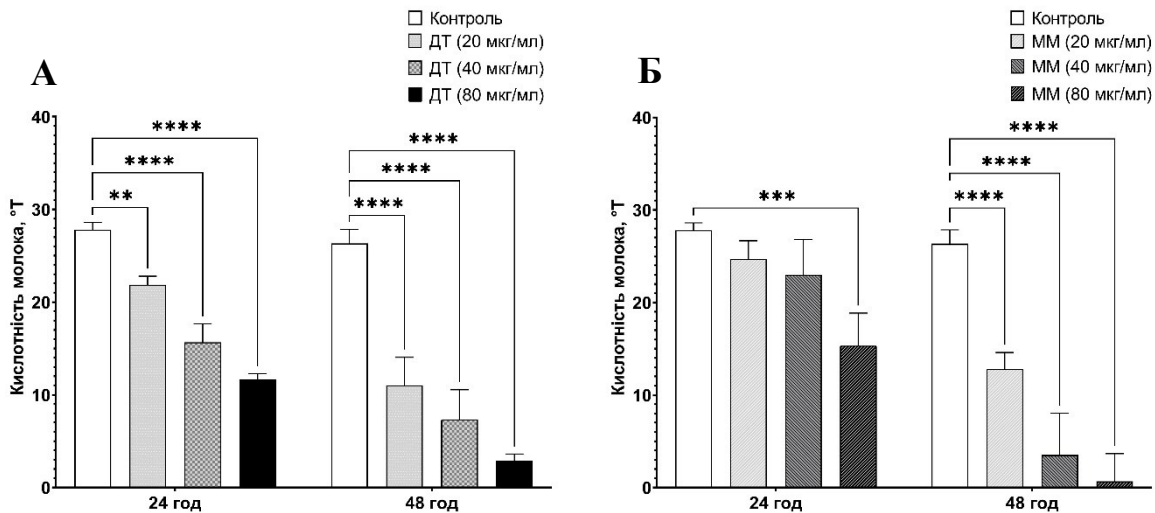


Рис. 5.2. Здатність *Lactobacillus plantarum* 691 синтезувати молочну кислоту (°T) під впливом різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання: А – деревини тополі (ДТ); Б – медичних масок (ММ).  $M \pm SEM$ . \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Переважна більшість популяції *Lactobacillus* в організмі людини знаходиться у стані біоплівки, забезпечуючи колонізаційну резистентність макроорганізму [228]. Як відомо, у біоплівковій формі клітини мікроорганізмів є менш чутливими до впливу факторів довкілля [229], тому для нас було важливим встановити, чи здатні ДТ і ММ впливати на утворення біоплівки штамом *L. plantarum* 691.

Штам *L. plantarum* 691 має високі адгезивні властивості, які проявлялися вже через 24 години культивування. ДТ у концентрації 20 мкг/мл не здійснював впливу на здатність *L. plantarum* 691 формувати біоплівку (рис. 5.3. А), а от при культивуванні впродовж 72 годин з ММ у цій же концентрації здійснювався помірний інгібуючий вплив на формування біоплівки даним штамом (рис. 5.3. Б). З підвищенням концентрації ММ у середовищі до 40 мкг/мл пригнічувальний вплив на формування біоплівки *L. plantarum* 691 посилювався. За концентрації 80 мкг/мл обидва типи ТНЧ достовірно ( $p < 0,05$ ) знижували щільність біоплівки до низької. Такий інгібувальний вплив ТНЧ на формування

біоплівки може мати негативні наслідки порушення гомеостазу всього організму людини.

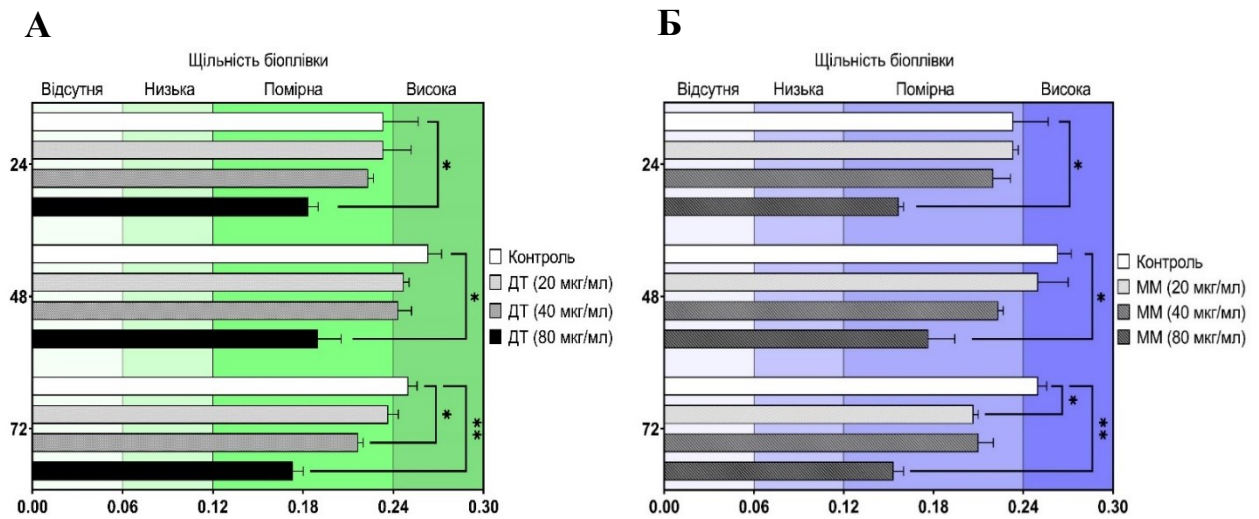


Рис. 5.3. Здатність *Lactobacillus plantarum* 691 формувати біоплівку під впливом різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання: А – деревини тополі (ДТ); Б – медичних масок (ММ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  порівняно з контролем.

Таким чином, ДТ і ММ мають негативний вплив на представника облигатно-цукролітичної мікробіоти *Lactobacillus plantarum* 619, що відображається у зниженні його ростових параметрів, погіршенні здатності до утворення біоплівки та інгібуванні продукції молочної кислоти.

## 5.2. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники та чутливість до антибіотиків

### *Escherichia coli* B-906

Серед усіх представників мікробіоти вважається, що *Escherichia coli* є одним з перших мікроорганізмів, який реагує на зовнішні фактори, що відбивається як у зміні його кількості, так і метаболічній активності. За фізіологічної норми *E. coli* ферментують лактозу та виділяють коротколанцюгові жирні кислоти.

Однак, під впливом зовнішніх факторів *E. coli* можуть переходити на протеолітичний шлях метаболізму (лактозонегативна форма), які часто виступають причиною розвитку кишкових захворювань [230, 231] і зазначають, що вони мають більшу резистентність до лікарських засобів [232]. Більше того, тривалий вплив атмосферного забруднення може спровокувати генетичні мутації, зміни властивостей мембрани та концентрацій екзополісахаридів та амінокислот [233]. Такі зміни здатні перетворити *E. coli* на небезпечну патогенну бактерію.

Ми встановили, що як ДТ, так і ММ впливають на ріст *E. coli* В-906, пригнічуючи його з підвищенням концентрації. При концентрації 80 мкг/мл обидва препарати майже повністю запобігали приросту біомаси. Крім того, було виявлено, що найбільше пригнічування росту культури ДТ виявляв за концентрації 40 мкг/мл (рис. 5.4. А). При цій самій концентрації ММ проявила помірний ефект пригнічення (рис. 5.4. В). Однак ММ продемонструвала більш виразний інгібувальний вплив при концентраціях 20 мкг/мл та 80 мкг/мл, спричиняючи суттєве зменшення росту біомаси *E. coli* В-906.

Визначення кількості життєздатних клітин (КЖК) *E. coli* В-906 показало, що ДТ за концентрації 20 мкг/мл не спричинило достовірних змін протягом усього експерименту (рис. 5.4. Б). Проте, при концентрації 40 мкг/мл ДТ вже через 24 години спостерігалось пригнічення росту, а через 72 години КЖК зменшилася на 2 порядки порівняно з контролем (з  $6,22 \pm 0,94$  lg КУО/мл до  $4,22$  lg КУО/мл відповідно). Найбільш значний ефект для ДТ спостерігався при концентрації 80 мкг/мл: на 24 годину культивування КЖК зменшилася на 6 порядків у порівнянні з контролем (з  $8,36 \pm 0,62$  lg КУО/мл до  $2,00 \pm 0,21$  lg КУО/мл), а на 48 та 72 години за даної концентрації культура не висівалась взагалі.

У той же час ММ достовірно знижували КЖК за всіх концентрацій (рис. 5.4. Г). При висіванні на середовище на 24-72 годину за концентрації 20 та 40 мкг/мл значення знижувались на 1-2 порядки. При концентрації 80 мкг/мл спостерігався навіть більший ефект, і КЖК зменшилася на 3-4 порядки за той

самий період часу. Отримані результати вказують на те, що ММ проявляє більш виражений бактеріостатичний вплив на розвиток *E. coli* В-906.

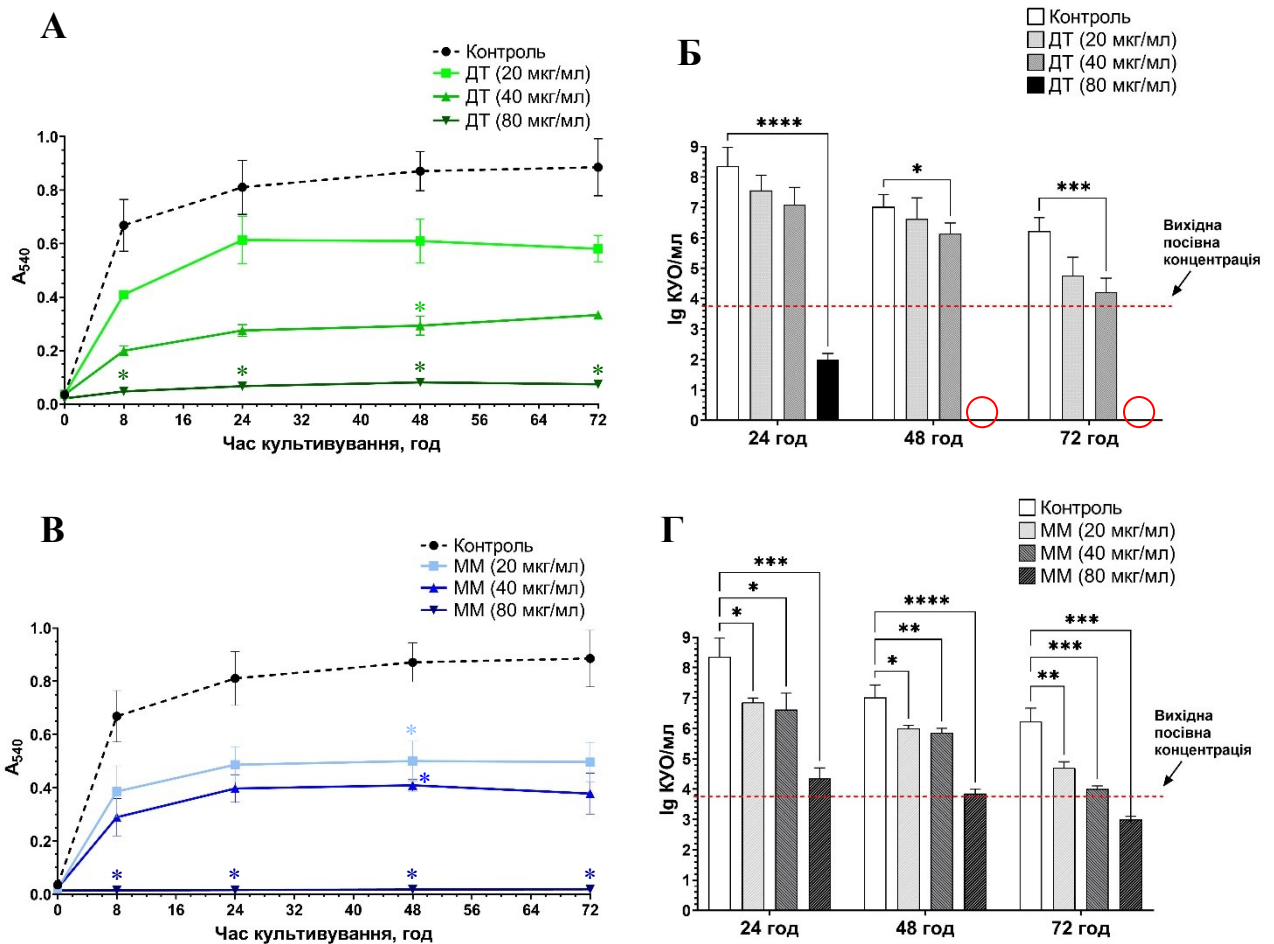


Рис. 5.4. Ростові показники *Escherichia coli* В-906 під впливом різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ): А – інтенсивність росту, у.о.; Б – кількість життєздатних клітин lg КУО/мл; та твердих наночастинок, отриманих від згорання медичних масок (ММ): В – інтенсивність росту, у.о.; Г – кількість життєздатних клітин, lg КУО/мл.  $M \pm SEM$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Зміни метаболічної активності *E. coli* В-906 під впливом різних концентрацій ТНЧ визначали за здатністю ферментувати лактозу у середовищі Ендо. Показали, що за концентрації 20 мкг/мл як ДТ, так і ММ ферментативна активність *E. coli* В-906 залишалась незмінною впродовж 72 годин культивування (рис. 5.5.). За концентрації 40 мкг/мл обох типів ТНЧ на 48 годину експерименту

з'явилися лактозонегативні колонії, їх відсоток становив  $8,24 \pm 0,51$  % для ДТ та  $12,15 \pm 0,37$  % для ММ. При збільшенні концентрації до 80 мкг/мл відсоток колоній *E. coli* В-906, не здатних до ферментації лактози, для ММ збільшився до  $22,20 \pm 0,85$  %. Для ДТ за цієї концентрації ріст був відсутній. На 72 годину експерименту відсоток лактозонегативних штамів продовжував зростати при концентрації ММ 40 мкг/мл до  $19,33 \pm 0,55$  % та 80 мкг/мл до  $27,00 \pm 0,38$  %.

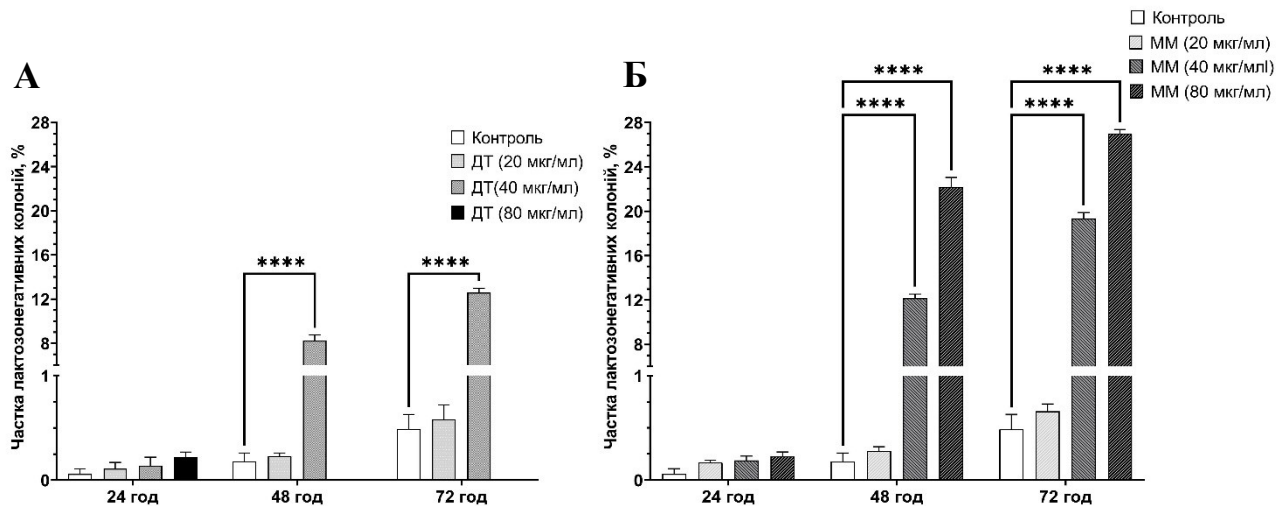


Рис. 5.5. Частка *Escherichia coli* В-906, не здатних до ферментації лактози, культивована у присутності різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання: А - деревини тополі (ДТ); Б – медичних масок (ММ)  $M \pm SEM$ . \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  порівняно з контролем.

Одним із факторів агресивності умовно-патогенних бактерій є їх адгезивні властивості та здатність до утворення біоплівки. Біоплівки відіграють важливу роль у виживанні, адаптації та поширенні бактерій. Вони формуються шляхом вироблення екстраполімерних речовин та факторів адгезії, а цей процес вимагає значних енергетичних затрат від бактеріальних клітин. Однак, утворення біоплівок забезпечує стійкість до стресових умов навколишнього середовища, імунної системи господаря та антибіотиків [234].

Музейний штам *E. coli* В-906 має виражені адгезивні властивості та здатність формувати біоплівку. Але дія ДТ за концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл на 24 годину достовірно ( $p < 0,05$ ) знижувала здатність *E. coli* В-906 до адгезії з

0,13±0,02 до 0,10±0,01 і 0,09±0,03 у.о. відповідно (рис. 5.6. А). Проте вже на 48 годину спостерігався стимулюючий ефект, який зміцнив біоплівку. Концентрація 80 мкг/мл навпаки мала сильний інгібуючий вплив на утворення біоплівки і знижував показник оптичної густини вдвічі відносно контролю ( $p < 0,01$ ). За дії ММ, щільність біоплівки на 24 годину була подібна до контролю на всіх концентраціях, проте на 48 і 72 години щільність біоплівки слабшала (рис. 5.6. Б).

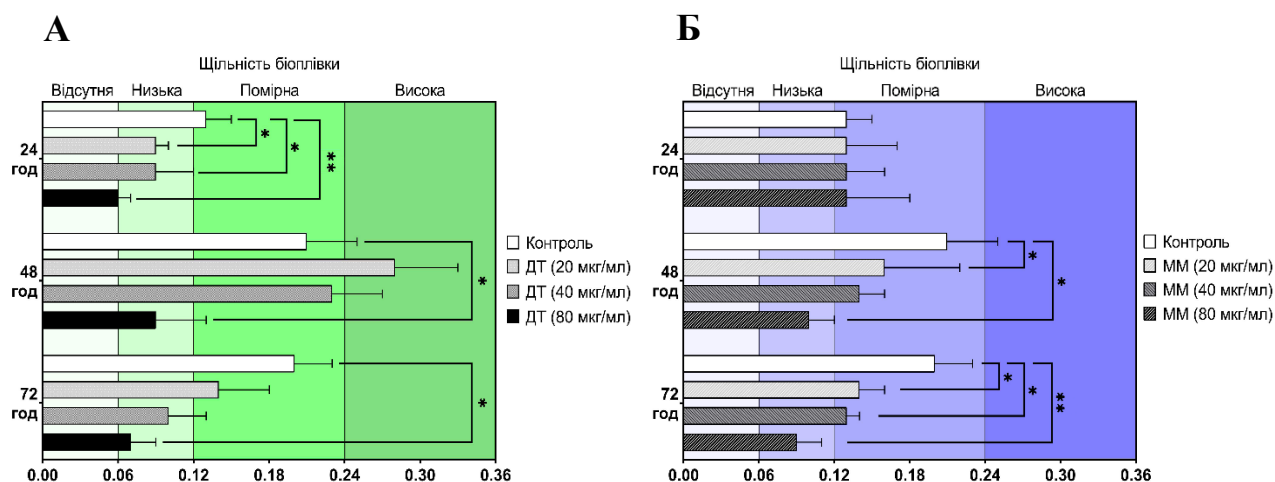


Рис. 5.6. Здатність *Escherichia coli* B-906 формувати біоплівку під впливом різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання: А – деревини тополі (ДТ); Б – медичних масок (ММ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  порівняно з контролем.

Набуття мікроорганізмами резистентності до антибіотиків – глобальна проблема в медицині, оскільки резистентні бактерії ускладнюють лікування інфекційних захворювань, збільшують тривалість лікування та підвищують ризик поширення інфекцій. *E. coli* – це типовий представник бактерій, що можуть стати резистентними до антибіотиків, і така резистентність може передаватись між бактеріями шляхом генетичного обміну, що призводить до поширення резистентності в різних регіонах світу [235].

У ході наших досліджень ми вивчали ріст *E. coli* B-906 у рідкому середовищі, додавши різні концентрації ТНЧ. Під час цих експериментів спостерігався розвиток резистентності цього штаму до деяких антибіотиків (рис. 5.7.).

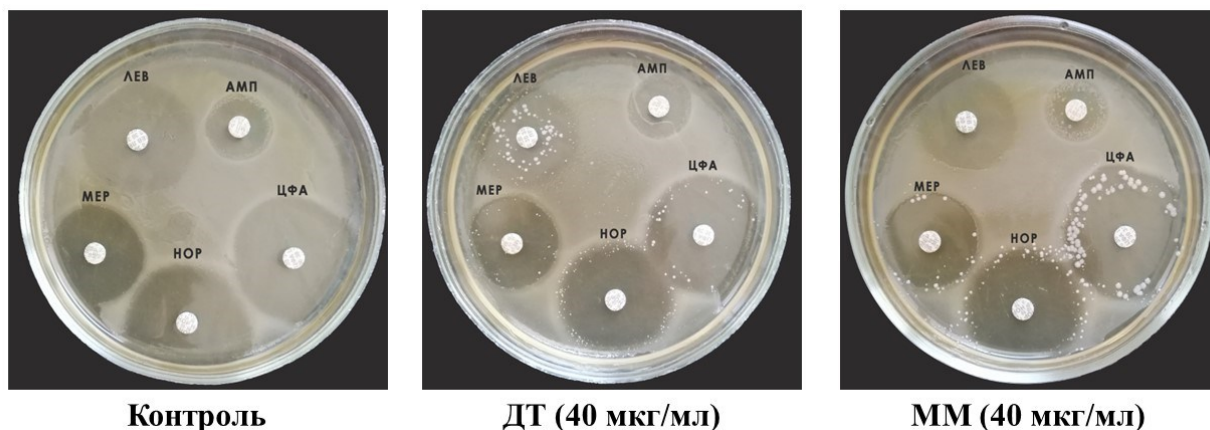


Рис. 5.7. Репрезентативні фотографії визначення чутливості *Escherichia coli* В-906 до антибіотиків (ампіциліну (АМП), левоміцетину (ЛЕВ), меропенему (МЕР), норфлораксацину (НОР) і цефтріаксону (ЦФА)) після 48 годин культивування.

Після культивування *E. coli* В-906 на середовищах з різними концентраціями ДТ (табл. 5.1) штам набував помірної резистентності до ампіциліну після 48 годин культивування у середовищі з 20 мкг/мл та 40 мкг/мл. При цьому чутливість бактерій до цефтріаксону знижувалася лише за концентрації 80 мкг/мл. Чутливість до інших антибіотиків залишалась незмінною.

Таблиця 5.1.

Чутливість *Escherichia coli* В-906 до антибіотичних препаратів після культивування у середовищі з різними концентраціями твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ)

	Контроль		ДТ (20 мкг/мл)		ДТ (40 мкг/мл)		ДТ (80 мкг/мл)	
Час, год	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість
<b>Ампіцилін (10 мкг)</b>								
<b>24</b>	19.33±1.53	Ч	18.33±1.15	Ч	16.75±2.62*	П	17.50±0.50	Ч

48	19.13±0.85	Ч	17.88±1.93	Ч	16.33±0.58*	П	19.00±1.87	Ч
72	19.67±1.53	Ч	16.33±0.58*	П	16.25±2.52*	П	19.00±1.00	Ч
<b>Левоміцетин (30 мкг)</b>								
24	23.00±2.00	Ч	24.25±0.90	Ч	25.83±4.25	Ч	27.00±1.00	Ч
48	22.13±6.20	Ч	24.50±4.93	Ч	24.50±6.35	Ч	24.50±3.70	Ч
72	21.33±0.58	Ч	24.67±0.58	Ч	23.00±1.00	Ч	22.67±0.58	Ч
<b>Меропенем (10 мкг)</b>								
24	32.00±1.00	Ч	30.83±0.29	Ч	33.33±2.52	Ч	30.00±1.00	Ч
48	29.00±2.16	Ч	28.13±0.63	Ч	28.75±1.71	Ч	28.63±0.95	Ч
72	32.33±1.53	Ч	30.00±1.00	Ч	27.67±0.58	П	30.00±1.00	Ч
<b>Норфлуксацин (10 мкг)</b>								
24	31.00±1.00	Ч	31.83±1.76	Ч	34.33±2.52	Ч	28.83±2.75	Ч
48	29.75±2.63	Ч	28.25±1.50	Ч	31.75±4.50	Ч	28.75±1.26	Ч
72	32.33±2.08	Ч	31.33±3.21	Ч	30.00±2.00	Ч	30.33±1.15	Ч
<b>Цефтріаксон (30 мкг)</b>								
24	29.83±1.89	Ч	29.00±1.00	Ч	29.83±3.88	Ч	27.00±1.00	П
48	31.00±1.06	Ч	30.50±0.58	Ч	30.75±0.50	Ч	26.75±2.22*	П
72	31.50±1.80	Ч	31.67±0.58	Ч	31.67±2.52	Ч	25.00±1.00*	П

П – помірностійкий, Ч – чутливий. M±SEM. \* - p < 0,05

ММ мав значний вплив на антибіотикочутливість культури *E. coli* В-906 (табл. 5.2.). При концентраціях 20 мкг/мл та 40 мкг/мл цей штам мав тенденцію до втрати чутливості до більшості антибіотиків, за винятком левоміцетину. Особливо сильний ефект спостерігався для ампіциліну і норфлуксацину, до яких культура на 48 годину культивування набувала стійкої резистентності, а зони інгібування росту достовірно зменшувалися. Цікавою особливістю є те, що при високій концентрації (80 мкг/мл) ТНЧ чутливість даного штаму була вищою, ніж за менших концентрацій (20 мкг/мл і 40 мкг/мл), і резистентність спостерігалася тільки до ампіциліну. Ми припускаємо, що ТНЧ при високій концентрації

проявляв сильну цидну дію, що унеможливило адаптацію *E. coli* В-906 до антибіотиків.

Таким чином, ТНЧ мають безпосередній вплив на *Escherichia coli* В-906, підсилюючи його агресивність, що відображається у появі варіантів, що не ферментують лактозу, підвищенні, в окремих випадках, здатності до біоплівкоутворення та появі резистентних до антибіотиків штамів.

Таблиця 5.2.

Чутливість *Escherichia coli* В-906 до антибіотичних препаратів після культивування у середовищі з різними концентраціями твердих наночастинок, отриманих від згорання медичних масок (ММ)

Час, год	Контроль		ММ (20 мкг/мл)		ММ (40 мкг/мл)		ММ (80 мкг/мл)	
	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість
<b>Ампіцилін (10 мкг)</b>								
24	19.33±1.53	Ч	14.67±2.08	П	14.33±2.08	П	10.00±3.61	С
48	19.13±0.85	Ч	12.25±0.20**	П	11.25±1.71**	С	9.00±3.56*	С
72	19.67±1.53	Ч	8.00±2.00**	С	7.33±1.53**	С	6.67±1.15**	С
<b>Левоміцетин (30 мкг)</b>								
24	23.00±2.00	Ч	22.67±1.53	Ч	22.33±2.52	Ч	24.33±3.21	Ч
48	22.13±6.20	Ч	23.50±1.73	Ч	22.00±8.60	Ч	23.25±2.75	Ч
72	21.33±0.58	Ч	21.33±0.58	Ч	21.00±1.00	Ч	22.00±1.00	Ч
<b>Меропенем (10 мкг)</b>								
24	32.00±1.00	Ч	27.67±0.58*	П	27.17±0.76*	П	30.33±3.06	Ч
48	29.00±2.16	Ч	27.50±2.38	П	26.75±3.77	П	29.00±2.00	Ч
72	32.33±1.53	Ч	26.67±1.53*	П	26.67±0.58*	П	29.33±1.15	Ч
<b>Норфлуксацин (10 мкг)</b>								
24	31.00±1.00	Ч	21.50±0.50**	С	24.33±3.06	П	24.17±3.88	П
48	29.75±2.63	Ч	23.25±2.22*	С	22.00±1.41*	С	26.00±4.55	П
72	32.33±2.08	Ч	23.67±1.53*	С	22.33±3.21*	С	24.33±2.08*	П

Цефтріаксон (30 мкг)								
24	29.83±1.89	Ч	30.17±1.76	Ч	28.67±2.08	П	27.50±3.79	П
48	31.00±3.06	Ч	28.50±1.73	П	28.75±4.27	П	26.50±1.50*	П
72	31.50±1.80	Ч	28.33±1.15	П	27.67±2.08	П	25.67±4.73*	П

С – стійкий, П – помірностійкий, Ч – чутливий.  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  порівняно з контролем

### 5.3. Вплив твердих наночастинок природного та антропогенного походження на ростові показники та чутливість до антибіотиків *Staphylococcus aureus* B-918

*Staphylococcus aureus* є одним з найбільш розповсюджених (поряд з *E.coli*) мікроорганізмів на планеті, який мешкає як у природному середовищі, так і в організмі людини. Серед умовно-патогенної мікробіоти займає провідну позицію за здатністю уражувати практично всі органи та тканини організму людини. Науково доведено, що сприйнятливість до ураження стафілококами, в першу чергу, залежить від стану імунної системи [236]. Існують також повідомлення, що стафілокок належить до мікроорганізмів з вираженою метаболічною мінливістю, яка може відобразитись на його вірулентності [237]. Припускаємо, що потенційним фактором мінливості *S. aureus* можуть бути фактори антропогенного навантаження, зокрема ТНЧ.

Аналізуючи динаміку росту впродовж 72 годин *S. aureus* B-918 у рідкому середовищі з різними концентраціями (20 мкг/мл, 40 мкг/мл та 80 мкг/мл) ДТ, що концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл не впливали на тривалість lag-фази розвитку культури і до 8 години приріст біомаси відбувався однаково (рис. 5.8. А). Починаючи з 24 години реєстрували достовірне ( $p < 0,05$ ) зниження активності росту при 40 мкг/мл ТНЧ в середовищі. Концентрація 80 мкг/мл здійснювала більш виражений вплив на розвиток популяції. Відмічали як подовження

тривалості lag-фази (з 2 до 8 годин), так і пригнічення росту вдвічі ( $p < 0,01$ ), починаючи з 8 годин культивування.

При визначенні впливу ДТ на життєздатність клітин штаму *S. aureus* В-918, виявлено, що всі досліджувані концентрації здійснювали лише бактеріостатичний вплив (рис. 5.8. Б). Так, для концентрацій 20 мкг/мл та 40 мкг/мл впродовж 48 годин культивування кількість клітин стафілококу мала лише тенденцію до зниження життєздатності без достовірної різниці. Після 72 годин культивування з концентрацією ДТ 40 мкг/мл у середовищі із наступним висівом на щільне середовище показали, що кількість висіяних клітин була нижчою на 1 порядок у порівнянні з контролем. При концентрації 80 мкг/мл відмічали достовірне зниження кількості життєздатних клітин на 1-1,5 порядку вже після 24 годин культивування, і ця тенденція зберігалась впродовж 72 годин. Проте, слід зазначити, що КЖК у дослідних групах не знижувалась нижче вихідної посівної концентрації *S. aureus* В-918.

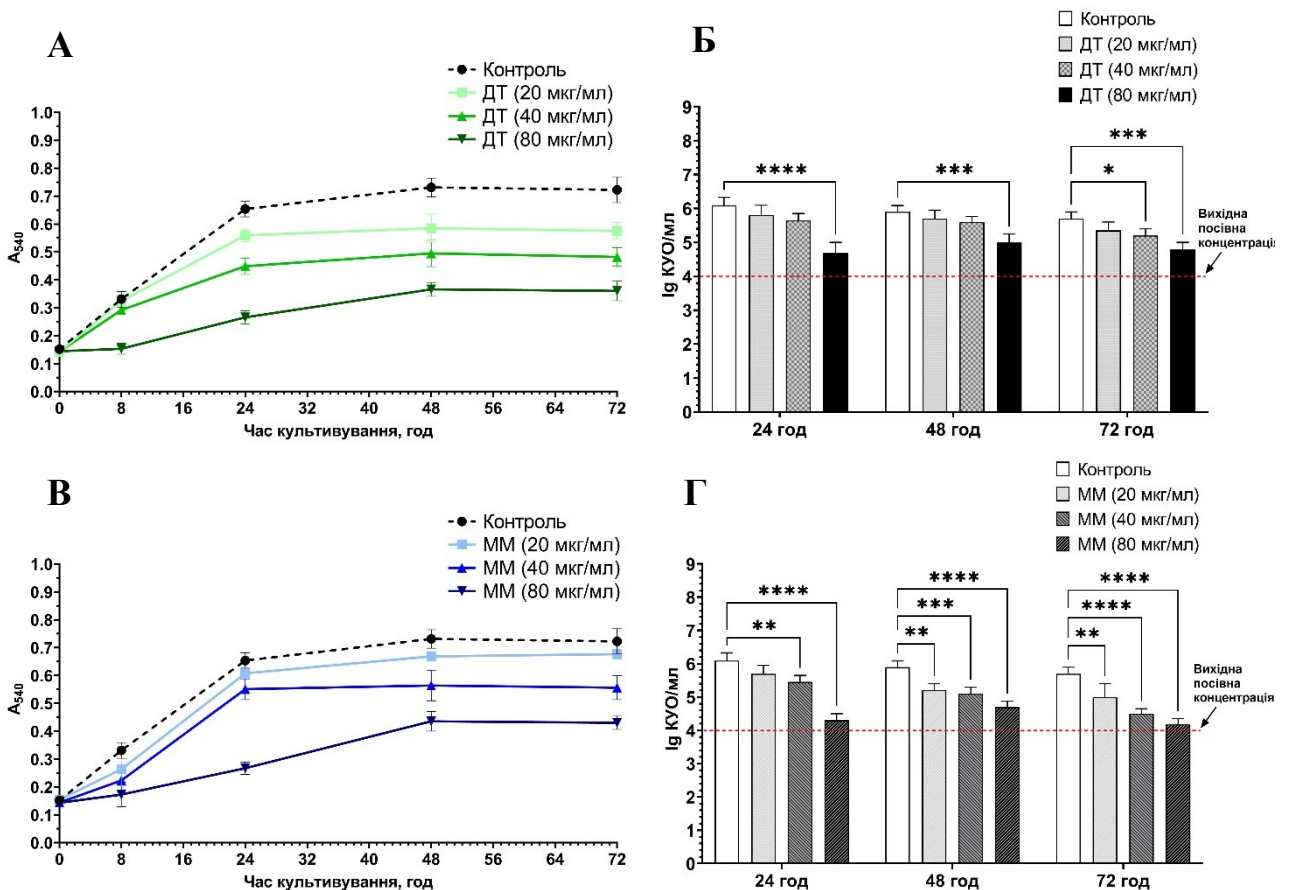


Рис. 5.8. Ростові показники *Staphylococcus aureus* B-918 під впливом різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ): А – Інтенсивність росту, у.о.; Б – кількість життєздатних клітин Іг КУО/мл; та твердих наночастинок, отриманих від згорання медичних масок (ММ): В – інтенсивність росту, у.о.; Г – кількість життєздатних клітин, Іг КУО/мл.  $M \pm SEM$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Подібну тенденцію впливу на ростові показники *S. aureus* B-918 спостерігали і для ММ (рис. 5.8. В). Зокрема, при дослідженні динаміки росту відмічали, що збільшення концентрації ММ у середовищі збільшує тривалість lag-фази росту культури та знижує інтенсивність самого росту. Також слід зазначити, що для концентрації 20 мкг/мл не відмічали достовірної різниці впливу у порівнянні з контролем.

КЖК *S. aureus* B-918 була більш залежною від ММ ніж від ДТ (рис. 5.8. Г). Так, достовірне зниження кількості КУО відмічали вже на 24 годину за концентрації 40 мкг/мл та 80 мкг/мл. А на 48 та 72 години всі концентрації призводили до достовірного зменшення висівання *S. aureus* B-918. Проте, так само як і для ДТ, у даному випадку відмічали бактеріостатичний ефект, за якого КЖК не знижувалась за межі вихідної посівної дози.

Таким чином, обидва типи ТНЧ здійснювали бактеріостатичний вплив на *S. aureus* B-918, і з підвищенням концентрації даний ефект збільшувався.

Здатність до утворення біоплівки представниками роду *Staphylococcus* багатьма науковцями розглядається як провідний фактор їх патогенності. Деякі дослідники виділяють окремі нозологічні форми інфекційного процесу, патогенез якого пов'язаний з формуванням біоплівки [234]. Схильність до біоплівкоутворення стафілококами пов'язана з генетично детермінованою можливістю синтезу полісахаридного міжклітинного адгезину, що сприяє формуванню багат шарових клітинних структур, які пригнічують гуморальні та клітинні фактори імунітету при розвитку інфекційно-запального процесу [238].

Тому, на наступному етапі ми досліджували, як впливають різні концентрації ДТ та ММ на динаміку формування біоплівки штамом *S. aureus* В-918.

Слід зазначити, що досліджуваний штам *S. aureus* В-918 на 24 годину культивування проявляв помірну здатність до утворення біоплівки, на 48-72 годину щільність біоплівки зростала до високої.

За концентрацій ДТ 20 мкг/мл та 40 мкг/мл здатність до біоплівкоутворення зростала впродовж всього періоду дослідження. Концентрація ДТ 80 мкг/мл мала помірний інгібувальний вплив на утворення біоплівки штамом *S. aureus* В-918 (рис. 5.9. А).

ММ мав стимулюючий вплив на утворення біоплівки штамом *S. aureus* В-918 за концентрацій у середовищі 20 мкг/мл та 40 мкг/мл на 48 годину культивування. За концентрації 80 мкг/мл проявлявся виражений інгібуючий вплив біоплівкоутворення впродовж всього періоду дослідження (рис. 5.9. Б).

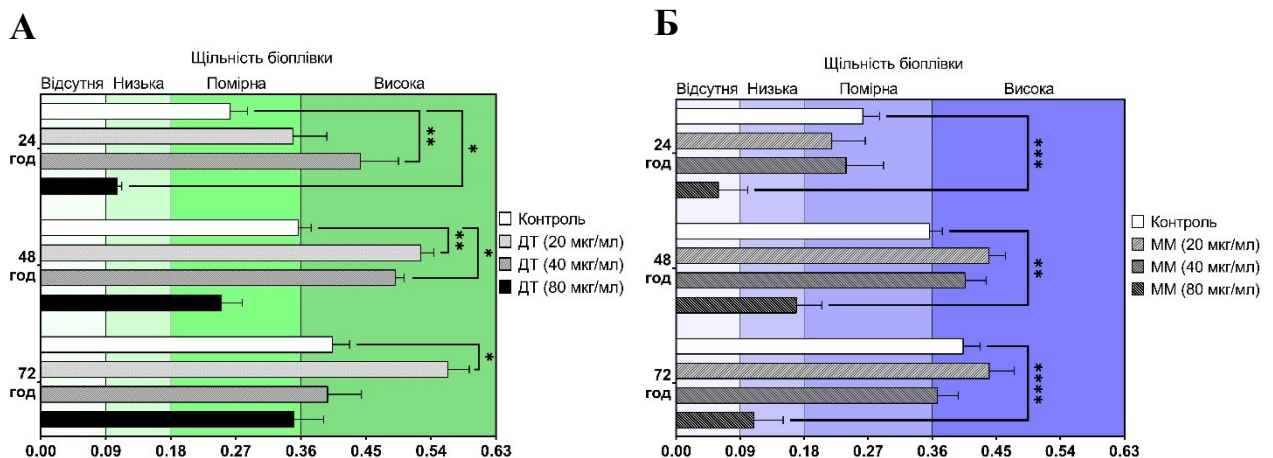


Рис. 5.9. Здатність *Staphylococcus aureus* В-918 формувати біоплівку під впливом різних концентрацій твердих наночастинок, отриманих від згорання: А – деревини тополі (ДТ); Б – медичних масок (ММ).  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  порівняно з контролем.

Відомо, що стимулюючий вплив на процес утворення біоплівки умовно-патогенними культурами може розглядатись як підвищення їх вірулентності.

В останні роки у багатьох країнах світу все більшої глобалізації набуває проблема зростання резистентності *S. aureus* до широкого кола антибіотиків, які використовують у клінічній практиці [239]. Ця проблема стосується й України [240, 241]. При цьому основну проблему представляють метицилін-резистентні штами *S. aureus* (MRSA), стійкі до багатьох антибіотиків, що є причиною високої захворюваності та смертності, а також додаткових фінансових витрат, пов'язаних з лікуванням хворих [239]. Крім того, змушує розширити концепцію глобальності розвитку формування резистентності до антибіотиків той факт, що механізми стійкості бактерій до хімічних речовин та антибіотиків є подібними [242, 243].

У наших дослідженнях при сумісному культивуванні *S. aureus* B-918 в рідкому середовищі з різними концентраціями ТНЧ було продемонстровано факт розвитку резистентності до деяких антибіотиків (рис. 5.10.).

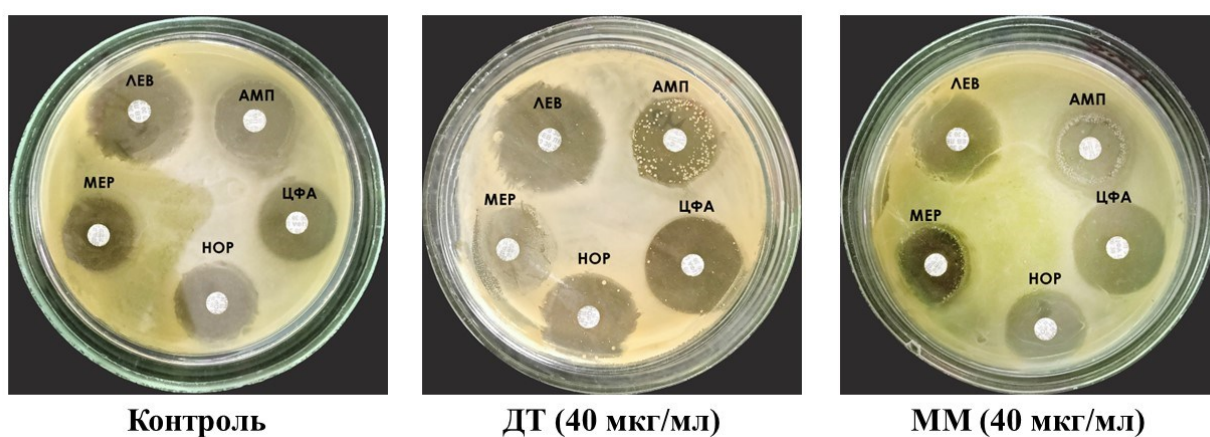


Рис. 5.10. Репрезентативні фотографії визначення чутливості *Staphylococcus aureus* B-918 до антибіотиків (ампіциліну (АМП), левоміцетину (ЛЕВ), меропенему (МЕР), норфлуксацину (НОР) і цефтріаксону (ЦФА)) після 48 годин культивування.

Зокрема, уже через 24 години культивування з ДТ за концентрацій 20 мкг/мл антибіотикочутливість знизилась до ампіциліну та меропенему, а за концентрації ДТ 40 мкг/мл та 80 мкг/мл реєстрували стійкість до даних антибіотиків (табл.5.3.). Через 72 години культивування за всіх досліджуваних концентрацій відмічено формування резистентності до ампіциліну та меропенему. До левоміцетину,

норфлораксацину та цефтріаксону відмічали помірне зниження чутливості після культивування *S. aureus* В-918 з ДТ у концентрації 80 мкг/мл.

Таблиця 5.3.

Чутливість *Staphylococcus aureus* В-918 до антибіотичних препаратів після культивування у середовищі з різними концентраціями твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі (ДТ)

Час, год	Контроль		ДТ (20 мкг/мл)		ДТ (40 мкг/мл)		ДТ (80 мкг/мл)	
	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість
<b>Ампіцилін (10 мкг)</b>								
24	27,75±3,77	Ч	25,17±3,38	П	18,00±0,82***	С	10,00±0,82****	С
48	31,00±1,00	Ч	23,33±2,89	П	13,67±2,89*	С	10,67±3,06*	С
72	29,67±2,08	Ч	20,00±1,73*	С	16,33±4,04*	С	8,67±3,79**	С
<b>Левоміцетин (30 мкг)</b>								
24	24,25±1,71	Ч	26,00±1,41	Ч	2,003±1,41	Ч	16,50±5,51**	П
48	26,00±1,00	Ч	27,00±3,61	Ч	27,33±2,52	Ч	16,67±1,53**	П
72	27,33±3,51	Ч	28,67±3,21	Ч	24,67±2,08	Ч	17,67±0,58**	П
<b>Меропенем (10 мкг)</b>								
24	29,75±1,26	Ч	27,33±0,47	П	18,67±1,70***	С	9,25±1,71****	С
48	31,67±2,08	Ч	23,67±3,51	П	20,67±0,58*	С	14,00±3,00**	С
72	34,33±2,52	Ч	21,67±4,04*	С	20,00±1,73**	С	15,33±3,06**	С
<b>Норфлораксацин (10 мкг)</b>								
24	22,75±3,20	Ч	20,00±2,45	Ч	21,67±2,87	Ч	16,17±5,24**	П
48	24,00±2,00	Ч	24,67±5,13	Ч	21,00±1,00	Ч	16,67±1,15*	П
72	26,00±3,00	Ч	25,67±1,53	Ч	24,67±2,08	Ч	16,33±2,52*	П
<b>Цефтріаксон (30 мкг)</b>								

24	27,75±2,63	Ч	22,67±1,89	Ч	24,00±2,16	Ч	18,50±6,81****	П
48	26,67±1,53	Ч	26,67±5,77	Ч	27,00±4,58	Ч	21,67±2,52	П
72	27,67±1,53	Ч	29,33±3,51	Ч	28,00±3,00	Ч	21,33±2,08	П

С – стійкий, П – помірностійкий, Ч – чутливий.  $M \pm SEM$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  порівняно з контролем

Формування резистентності також реєстрували для *S. aureus* В-918 після культивування на середовищі з ММ. Резистентність формувалась до ампіциліну (за концентрацій 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 80 мкг/мл) та меропенему (за концентрації 80 мкг/мл). Зниження чутливості відмічали до меропенему за концентрацій 20 мкг/мл та 40 мкг/мл. До всіх інших досліджуваних антибіотиків чутливість стафілококу зберігалась (табл 5.4.).

Таблиця 5.4.

Чутливість *Staphylococcus aureus* В-918 до антибіотичних препаратів після культивування у середовищі з різними концентраціями твердих наночастинок, отриманих від згорання медичних масок (ММ)

Час, год	Контроль		ММ (20 мкг/мл)		ММ (40 мкг/мл)		ММ (80 мкг/мл)	
	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість	Зона затримки росту, мм	Чутливість
<b>Ампіцилін (10 мкг)</b>								
24	27,75±3,77	Ч	15,67±4,03 ****	С	15,00±3,56 ****	С	16,33±5,01****	С
48	31,00±1,00	Ч	17,33±2,31*	С	15,00±3,00*	С	13,67±4,73	С
72	29,67±2,08	Ч	20,00±2,00*	С	11,67±4,93*	С	18,00±1,00*	С
<b>Левоміцетин (30 мкг)</b>								
24	24,25±1,71	Ч	26,33±0,47	Ч	25,00±0,05	Ч	25,67±4,5	Ч
48	26,00±1,00	Ч	28,33±2,08	Ч	28,33±2,89	Ч	27,00±3,00	Ч
72	27,33±3,51	Ч	29,00±1,00	Ч	27,00±3,00	Ч	25,67±0,58	Ч

Меропенем (10 мкг)								
24	29,75±1,26	Ч	22,25±2,94*	П	23,00±0,05**	П	19,67±3,30**	С
48	31,67±2,08	Ч	23,00±1,73*	П	22,33±2,08*	П	21,00±1,73**	С
72	34,33±2,52	Ч	22,33±1,53*	П	23,00±3,00*	П	21,33±4,93	С
Норфлуксацин (10 мкг)								
24	22,75±3,20	Ч	21,33±0,94	Ч	22,67±2,05	Ч	23,33±1,89	Ч
48	24,00±2,00	Ч	24,67±2,52	Ч	24,33±3,06	Ч	25,33±5,03	Ч
72	26,00±3,00	Ч	27,00±2,65	Ч	27,00±1,00	Ч	25,67±3,06	Ч
Цефтріаксон (30 мкг)								
24	27,75±2,63	Ч	24,67±0,47	Ч	25,67±1,25	Ч	24,67±1,70	Ч
48	26,67±1,53	Ч	27,67±2,52	Ч	28,33±2,87	Ч	25,67±1,53	Ч
72	27,67±1,53	Ч	25,33±2,52	Ч	26,00±1,00	Ч	27,33±3,06	Ч

С – стійкий, П – помірностійкий, Ч – чутливий.

M±SEM. \* -  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  порівняно з контролем

Таким чином, у наших дослідженнях продемонстровано, що дія ТНЧ може бути причиною підвищення агресивних властивостей *Staphylococcus aureus*, у тому числі сприяти появі резистентних до антибіотиків штамів.

### Висновки до розділу

1. Під час досліджень було встановлено, що як ДТ, так і ММ впливають на ріст *E. coli* В-906, пригнічуючи його з підвищенням концентрації. Обидва типи ТНЧ проявили бактеріостатичний ефект, бактерицидний ефект виявився тільки за дії ДТ за концентрації 80 мкг/мл. При цьому під впливом ДТ і ММ за концентрації 40 мкг/мл з'являлися колонії *E. coli*, які втрачали здатність до ферментації лактози. ММ проявляли більший вплив на метаболічну активність бактерії.

2. Продемонстрували, що ММ та ДТ впливають на динаміку росту та життєздатність *S. aureus* В-918. І ДТ, і ММ проявляли бактеріостатичний ефект, знижуючи активність росту та кількість життєздатних клітин зі збільшенням

концентрації. При цьому ММ мали більший вплив на зниження життєздатності клітин та тривалість lag-фази порівняно з ДТ.

3. У наших дослідженнях ДТ і ММ впливали на динаміку росту та життєздатність штаму *L. plantarum* 691. ДТ здійснював помірний пригнічувальний вплив на ріст, зменшуючи інтенсивність росту зі зростанням його концентрації. Вплив ММ був меншим, проте також спричиняв зниження інтенсивності росту при високих концентраціях. Обидва типи також здійснювали помірний бактеріостатичний вплив, знижуючи життєздатність бактерій *L. plantarum* 691.

4. ДТ і ММ впливали на здатність мікроорганізмів утворювати біоплівку. ДТ за концентрацій 20 мкг/мл та 40 мкг/мл можуть збільшувати агресивність умовно-патогенних *E. coli* В-906 та *S. aureus* В-918, що проявляється в ущільненні утворюваної ними біоплівки. Натомість ММ при концентраціях 20 мкг/мл та 40 мкг/мл підсилювали утворення біоплівки лише *S. aureus*. Водночас здатність до формування біоплівки представника облигатної мікробіоти *L. plantarum* 691 у присутності ТНЧ пригнічувалася. ММ знижували щільність біоплівки навіть за найменшої концентрації (20 мкг/мл), тоді як ДТ за цієї концентрації не проявили інгібувальних властивостей.

5. Обидва типи ТНЧ впливали на чутливість бактерій *E. coli* В-906 та *S. aureus* В-918 до антибіотиків. За дії ДТ більшого впливу зазнав *S. aureus* В-918, у якого знижувалась чутливість до левоміцетину, норфлораксацину та цефтріаксону і виникала резистентність до ампіциліну та меропенему. У *E. coli* В-906 за дії ДТ знижувалась чутливість до ампіциліну та цефтріаксону. За впливу ММ у штаму *E. coli* В-906 знижувалась чутливість до меропенему та цефтріаксону, з'являлася резистентність до ампіциліну та норфлораксацину. Також дія ММ сприяла виникненню резистентності *S. Aureus* В-918 до ампіциліну та меропенему.

6. І ДТ, і ММ негативно впливали на здатність *L. plantarum* 691 продукувати молочну кислоту. При збільшенні концентрації ТНЧ у середовищі зменшувалася здатність до продукції молочної кислоти, і цей ефект був більш вираженим за впливу ДТ.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Одним із ключових компонентів забруднення повітря є тверді частинки, що різняться в залежності від їхнього розміру, походження та складу. Джерела твердих наночастинок різноманітні: це можуть бути природні події, такі як лісові пожежі та виверження вулканів, чи викиди з промислових підприємств, автотранспорту, сільського господарства та інших сфер діяльності людини [124, 127, 128].

Іншою важливою характеристикою твердих частинок є їх розмір. До ТЧ<sub>10</sub> належать частинки з діаметром менше 10 мікрметрів, тоді як до ТЧ<sub>2.5</sub> входять частинки з діаметром менше 2,5 мікрметра [127, 128]. Тверді наночастинок мають розмір від 1 до 100 нанометрів, що робить їх надзвичайно небезпечними для організму. Завдяки своїй дуже маленькій величині, ТНЧ мають здатність легко проникати у глибокі шари легень, уникаючи захисної дії мукоциліарного кліренсу, де вони можуть спричинити пошкодження клітин та потрапити до кровоносної системи [133]. Останні дослідження дедалі більше зосереджуються на можливому впливі ТЧ на функціональний стан та мікробіоту кишечника. Підтверджено, що ТЧ можуть впливати на розвиток запальних процесів через порушення продукування слизу кишечника [11], пошкодження епітеліального бар'єра [153] та підвищення рівня прозапальних цитокінів [156, 159], та змінювати склад мікробіоти шляхом зміни співвідношення кількості представників *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroides* та інших [153, 161–163]. Проте більшість досліджень стосувалися вивчення дії ТЧ<sub>10</sub> та ТЧ<sub>2.5</sub>, залишаючи дію ТНЧ малодослідженою.

У нашій роботі ми досліджували вплив ТНЧ розміром ~30 нм, синтезованих та підготовлених за методикою для біологічних експериментів в умовах *in vitro*, *ex vivo* та *in vivo*.

Оскільки в залежності від джерела походження частинок можуть варіюватися їхні склад, токсичність та механізм дії, першим завданням нашого

дослідження вважали за необхідне встановити та порівняти ступінь токсичності твердих наночастинок природного походження, отриманих від згорання 3-х різних порід деревини (берези, тополі та сосни), а також 2-х деревних компонентів: кори берези та гілля сосни. Для виконання цього завдання у нашій роботі використовувався комплексний підхід, який враховував різні моделі досліджень та їхню взаємодію з біологічними системами. Спершу було проведено дослідження з культурою клітин лінії COLO 205, що дозволяло встановити вплив наночастинок на життєздатність та реплікацію клітин. Результати дослідження підтвердили токсичну дію всіх досліджуваних ТНЧ на клітини, причому цей ефект був дозозалежним і посилювався зі збільшенням часу культивування. Це свідчить про те, що взаємодія наночастинок з клітинами може викликати каскадні реакції, які призводять до послідовного зниження життєздатності клітин. ДТ проявили найбільшу токсичну дію і на здатність клітин до поділу, і на їх виживаність. Найнижча концентрація ДТ (20 мкг/мл) вже через 24 години культивування спричинила зниження кількості клітин COLO 205 у 1,5 раза порівняно з контролем ( $p < 0,0001$ ) та загибель 69 % з них.

Далі ми дослідили ефект дії ТНЧ на епітеліальний препарат товстої кишки і виявили зміни в параметрах струму короткого замикання та парацелюлярної проникності. Ці показники можуть вказувати на можливу деградацію кишкового бар'єра та порушення його функцій при взаємодії з ТНЧ. Зростання парацелюлярної проникності може вплинути на адекватність адсорбції та транспорту поживних речовин та іонів через епітеліальний бар'єр кишечника [183].

У ході нашого дослідження було встановлено, що ДТ має найбільш виражений вплив на силу струму короткого замикання, знижуючи його у 2 рази порівняно з контролем ( $p < 0,001$ ). Показник парацелюлярної проникності кишкового бар'єра через 60 хвилин запису також був найвищим для ДТ серед усіх ТНЧ та у 3 рази вищим за контроль ( $p < 0,0001$ ). ДБ, ДС та ГС також

продемонстрували значні, проте менш виражені ефекти, а КБ виявив найменший вплив на досліджувані електрофізіологічні параметри порівняно з іншими ТНЧ.

Дослідження на культурі клітин лінії COLO 205 та епітеліальному препараті товстої кишки підтвердили наші початкові припущення щодо можливої токсичності твердих наночастинок в умовах поза організмом. Для того, щоб отримати глибше та більш повне розуміння впливу та механізму дії цих наночастинок на бар'єрну функцію слизової оболонки кишечника в контексті живого організму, ми вважали доцільним продовжити дослідження на тваринній моделі.

Оскільки у попередніх дослідженнях ДТ мали найвищу токсичність, впливаючи на клітини і збільшуючи проникність мукоза-субмукозального препарату товстої кишки, для подальших досліджень ТНЧ природного походження на тваринній моделі ми використовували ДТ.

Крім природних джерел, ТНЧ можуть утворюватися під впливом людської діяльності. Особливо актуальною за останні роки стала проблема утилізації медичних масок [193, 194]. Головний метод утилізації масок – високотемпературне спалювання, що призводить до викидів ТНЧ у повітря [196–198]. Ми припустили, що склад масок, що включає поліпропілен, поліестер, метали (особливо алюміній), латекс і спандекс, та їхня властивість поглинати навколишнє забруднення ТЧ [199, 200] може проявитися у їхній взаємодії з організмом. Тому в якості ТНЧ антропогенного походження у подальших дослідженнях ми використовували ММ.

Одним із ключових аспектів другого етапу нашої роботи стало порівняння двох моделей введення: внутрішньовенного та перорального. Таке рішення було прийнято, оскільки існує кілька варіантів потрапляння ТНЧ до кишечника. По-перше, ТНЧ, вивільнившись з альвеол, можуть транспортуватися із кров'ю, досягаючи капілярів кишечника [140]. Альтернативно, вони можуть бути видалені з бронхіол і альвеолярних просторів шляхом мукоциліарного кліренсу,

після чого транспортовані до ротоглотки та проковтнуті зі слиною, або спожиті безпосередньо з їжею та водою, забрудненими ТНЧ [143].

Потрапивши через кров у товстий кишечник після внутрішньовенного введення у дозі 500 мкг/100 г маси тіла тварини, ДТ та ММ вже через 3 години виявляли свою агресивну дію насамперед внаслідок порушення цілісності ендотелію судин товстого кишечника, що було підтверджено підвищенням концентрації барвника Еванса в слизовій оболонці товстої кишки вдвічі ( $p < 0,01$  для ДТ,  $p < 0,05$  для ММ). Цей процес супроводжувався активізацією імунної відповіді та розвитком запального процесу, маркером якого було підвищення рівня МПО. МПО – рясний гранулярний фермент, який є унікальним для нейтрофілів та моноцитів, і відповідає за каталізацію вироблення активних форм кисню (АФК) [201]. Зміни в регуляції виробництва АФК пов'язані з окислювальним пошкодженням та запаленням і можуть зумовлювати додаткові пошкодження слизової оболонки. Зазвичай, це запалення супроводжується тканинним набряком, інфільтрацію імунних клітин та накопиченням ексудату, що спричиняє збільшення маси кишки [201, 244]. Відзначено, що в нашому дослідженні після внутрішньовенного введення ТНЧ спостерігалася тенденція до зростання маси кишки.

Крім того, вже через годину після внутрішньовенного введення ДТ або ММ у сечі щурів спостерігали появу кров'яних домішок, що, як ми припускаємо, також може свідчити про здатність ТНЧ порушувати цілісність ендотелію фенестрованих капілярів клубочка нефронів.

Однак, аналіз впливу ТНЧ на склад поверхневого слизу товстої кишки після 3 годин дії показав, що жоден з типів ТНЧ не призводив до змін кількості глікопротеїнів. Враховуючи ці результати, можна припустити, що бар'єрна функція слизової оболонки кишечника за цього способу введення ТНЧ не піддавалася прямому впливу.

Навпроти, зниження кількості глікопротеїнів майже вдвічі спостерігали через 3 години після введення ТНЧ обох типів перорально ( $p < 0,05$  для ДТ і

$p < 0,05$  для ММ). Глікопротеїни у слизовому шарі кишечника відіграють ключову роль у підтримці бар'єрної функції органу, оскільки вони формують захисну гліканову матрицю, яка забезпечує захист від зовнішніх агентів та підтримує гомеостаз [33]. Зменшення вмісту глікопротеїнів може вказувати на можливу деградацію цієї захисної матриці та порушення бар'єрної функції. Це припущення підтверджується також достовірним ( $p < 0,05$ ) збільшенням транслокації бактерій з просвіту кишечника у кров ворітної вени щурів після перорального введення ДТ і ММ.

При цьому після перорального введення ММ відбулося збільшення рівня активності МПО у 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), що свідчить про розвиток запального процесу, викликане даним типом ТНЧ. У той же час, введення ДТ вказувало лише на тенденцію до зростання активності МПО, яке не досягло статистичної значущості. Збільшення маса кишки, відповідно, також було більшим для ММ порівняно із ДТ.

На відміну від внутрішньовенного, пероральне введення ДТ і ММ не спостерігалось достовірних ознак ушкоджень ендотеліального бар'єра. Але в групі щурів, яким вводили ММ, кількість барвника ЕБ була вищою порівняно з групою, якій вводили ДТ, що говорить про більшу схильність до пошкодження ендотелію після введення цього типу ТНЧ.

Отже, у даному дослідженні ми вперше продемонстрували, що, залежно від шляху потрапляння ТНЧ до органу, вони проявляють різні механізми впливу на бар'єрну функцію кишечника, спричиняючи пошкодження різних структур. При внутрішньовенному введенні мішенню дії ТНЧ виступає судинна система, у той час, як при пероральному введенні вони взаємодіють безпосередньо зі слизовою оболонкою товстої кишки. І хоча запальний процес був більш вираженим за внутрішньовенного шляху введення, проте пероральне введення дозволяє точніше контролювати дозу ТНЧ, спрямовану на кишечник, та уникнути широкого розповсюдження ТНЧ по всьому організму, що може викликати системні ефекти.

Крім шляху впливу, інтервал часу, протягом якого організм підданий впливу ТНЧ, також може відігравати роль у виникненні та розвитку патологічних змін у біологічних системах [156, 162, 222]. Довгострокова експозиція може спричинити запальні реакції, зміни в мікробіомі та гістопатологічні пошкодження, тоді як короткострокова експозиція може не мати такого ефекту. Тому метою наступного завдання було визначити зміни бар'єрної функції товстої кишки щурів за 7-добової експозиції ДТ і ММ.

Спершу, нами було проведено моніторинг впливу ТНЧ на клінічні показники стану щурів після 7-добового перорального введення. Після 7 днів експерименту тварини, що отримували ММ, мали менший приріст порівняно з контролем У групі, що отримувала ДТ, тварини відзначалися втратою маси тіла ( $p < 0,001$ ). Також вміст води у фекаліях і випадки виникнення діареї у тварин, що отримували ТНЧ протягом 7 діб, був вищим порівняно з контролем, вказуючи на можливі зміни у водно-електролітному балансі та процесах всмоктування води у травній системі. Важливо підкреслити, що дослідження також підтвердило летальність виключно серед тварин, які отримували ДТ.

Слизовий шар та мікробіота кишечника відіграють ключову роль у забезпеченні бар'єрної функції. Слизовий шар, що вкриває кишечник, забезпечує захист від потенційно шкідливих зовнішніх агентів [33]. Нами було встановлено, що введення ДТ протягом 7 днів посилює зменшення відносного вмісту глікопротеїнів у слизі товстої кишки, яке спостерігалось вже після 3-х годин дії ТНЧ. Проте збільшення терміну дії ММ на кількість глікопротеїнів слизу товстої кишки не мало ефекту і показник залишався на тому самому рівні, що і після 3 годин дії даного типу ТНЧ.

Кишкова мікробіота підтримує баланс, допомагає у розщепленні поживних речовин, виробляє корисні речовини та впливає на імунну систему. Наше дослідження показало, що якісний і кількісний склад кишкової мікробіоти суттєво змінюється після 7 днів введення ДТ і ММ. Ми спостерігали тенденцію до збільшення кількості умовно-патогенних бактерій, таких як *Escherichia coli*,

*Staphylococcus aureus*, та появу представників роду *Clostridium*, які часто пов'язують із розвитком кишкового інфекційного процесу у хворих на ЗЗК [204]. Крім того, ми детектували появу лактозопозитивних бактерій *Escherichia coli*. Варто зазначити, що кількість облигатних представників мікробіоти, *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*, достовірно не змінювалась.

Виявлені порушення рівноваги мікробіоти можуть серйозно підірвати процес обміну метаболітів та захисні властивості кишечника, порушуючи цілісність слизового бар'єра. Таким чином, наші дослідження переконливо підтверджують, що ТНЧ мають потенціал впливати не лише на структуру слизу, але й сприяти дестабілізації екосистеми мікроорганізмів у кишечнику.

Дисбаланс мікробіоти може викликати активацію нейтрофілів та вивільнення вільних радикалів кисню, що призводить до пошкодження цитоскелета слизової оболонки та прилеглих тканин [201, 245]. Структурне ослаблення слизового бар'єра створює сприятливі умови для транспорту токсинів та запальних медіаторів із кишечника до кровообігу. Ці процеси взаємодіють між собою, зміцнюючи один одного, і ведуть до значного підвищення проникності судин кишечника. Це припущення ми підтвердили, дослідивши проникність ендотелію судин товстої кишки щурів після 7-добового перорального введення ТНЧ. Зі збільшенням тривалості дії, проникність судин підвищувалася для обох типів твердих часток. Кількість барвника ЕБ у кишці порівняно з контрольною групою збільшилася на 44 % ( $p < 0,01$ ) для тварин, які отримували ДТ, і на 49 % ( $p < 0,01$ ) для тварин, які отримували ММ.

Особливу увагу слід звернути на виявлене збільшення кількості мікроорганізмів у крові ворітної вени після експозиції ТНЧ у 4,3 раза ( $p < 0,001$ ) у групи щурів, яким вводили ММ, і 4,7 раза ( $p < 0,001$ ) у групи, що отримувала ДТ. Отримані результати підкреслюють критичне значення інтегрованої взаємодії різних захисних компонентів, таких як слизовий шар, кишкова мікробіота, епітелій та імунна система у нормальному функціонуванні кишкового бар'єра. Відхилення від цієї рівноваги може створити умови

патогенним мікроорганізмам для проникнення та подолання кишкового бар'єра [202], що було підтверджено нами у ході нашого дослідження.

Транспорт іонів у товстій кишці є ключовим процесом, що забезпечує функціонування цього органу та підтримує гомеостаз в організмі. Одним з основних аспектів є активний транспорт іонів, таких як  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Cl}^-$ , через епітеліальний бар'єр [207]. Цей процес забезпечує належні рівні іонів та підтримання осмотичного балансу. Натрій виводиться з клітин на зовнішню сторону завдяки роботі  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФ-насосів, створюючи градієнт, який сприяє притягання  $\text{Cl}^-$  та води до клітин, підтримуючи оптимальну гідратацію епітелію [215].

Набагато складніший механізм включає парацелюлярний транспорт, який відбувається через з'єднання між клітинами епітелію. Білки TJ, такі як клаудини та оклюдини, регулюють проникність та забезпечують селективність для транспорту речовин [44]. Цей механізм грає важливу роль у підтримці цілісності епітеліального бар'єра та запобігання неконтрольованому потоку рідини та розчинених речовин через нього.

У нашій роботі для дослідження транспорту іонів через епітеліальний бар'єр використовувалася система камер Уссінга. За допомогою цієї системи створюється градієнт іонів між двома камерами, а електроди реєструють потенціал, що дозволяє виміряти  $I_{sc}$  – суму всіх іонних струмів, які протікають через епітелій для усунення різниці потенціалів між його сторонами [183]. Паралельно, ми використовували флуоресцентний маркер FITC-декстран молекулярної маси  $\sim 4$  кДа для вимірювання парацелюлярного потоку через епітелій.

Отримані результати дослідження свідчать про значний вплив довготривалої експозиції ТНЧ показниках базального струму короткого замикання та підвищення парацелюлярної проникності в обох досліджуваних групах. Проте дія ДТ і ММ мала суттєві відмінності. У щурів, які отримували ММ, спостерігалось посилене зниження  $I_{sc}$  і нижчий рівень секреції іонів  $\text{Cl}^-$  у

відповідь на стимулюючий ефект карбахоліну (50 мкМ) у порівнянні з групою, яка отримувала ДТ. При цьому зміни швидкості трансепітеліальної проникності FITC-декстрану (4,0 кДа) у щурів, що отримували ММ, не набуло статистичної значущості, у той час як ДТ стимулював збільшення цього показника у 1,5 раза порівняно із контролем ( $p < 0,01$ ).

Наступним кроком стало дослідження ефекту 7-добового введення ТНЧ, спричиненого на імунну відповідь та розвиток прозапальних процесів у товстій кишці щурів. Наші результати підтвердили, що 7-добове введення ТНЧ спричинило негативний вплив на активність МПО у товстій кишці щурів. Обидва типи ТНЧ призвели до статистично значущого ( $p < 0,01$ ) підвищення рівня активності МПО на 20%, що може вказувати на збільшену запальну реакцію в органі.

Дослідження також показало, що ДТ викликали зміни розмірів селезінки, великого периферичного лімфоїдного органу, який грає важливу роль в імунній системі. Це може свідчити про активну імунну відповідь та певний ступінь запалення, викликаного дією цього типу ТНЧ. Тенденцію до зменшення розмірів цекума, який має імунну функцію та може бути пов'язаний з розвитком запальних процесів у товстій кишці, також спостерігалось в наших дослідженнях.

Додатково, ми вивчили вплив ТНЧ на рівень редокс-чутливого транскрипційного фактора ранньої відповіді EGR-1 у слизовій оболонці товстої кишки. Спостережена тенденція до підвищення рівня EGR-1 може вказувати на зростання оксидативного стресу та активну реакцію на запалення внаслідок дії ТНЧ.

Узагальнюючи, наші дослідження демонструють, що довготривала експозиція ТНЧ викликає не тільки порушення фізіологічного бар'єрного функціонування кишечника, але й активує посилену імунну відповідь та сприяє розвитку запальних процесів у товстій кишці щурів.

Оскільки порушення цілісності та функціонування кишкового бар'єра розглядається як один з основних факторів патогенезу ЗЗК [54, 55, 58, 60], ми

припустили, що вищенаведені зміни, спричинені довготривалим введенням ТНЧ, підвищуватимуть схильність до розвитку коліту. Для підтвердження даного припущення, у щурів, яким вводили ТНЧ протягом 7 діб, на 8-му добу експерименту викликали експериментальний ЙА-індукований коліт. Встановлено, що 7-добове введення ТНЧ посилює набряк товстої кишки, що проявлялось у збільшенні її маси у порівнянні з контрольною групою з модельованим колітом. Додатково, посилювалася прозапальна реакція, що відображалось у підвищенні рівня активності МПО та тенденції до зростання рівня EGR-1. Ці зміни супроводжувалися зниженням кількості гліканової частини глікопротеїнів слизової оболонки товстої кишки та інтенсифікацією проникності ендотелію судин органу. Ми також встановили, що у щурів із ЙА-індукованим колітом, яким вводили ТНЧ протягом 7 діб, електрогенний транспорт іонів та карбахолін-стимульована секреція Cl<sup>-</sup> були сильніше інгібовані, ніж у контрольної групи з колітом. Таким чином, отримані результати підтверджують, що 7-добове введення ТНЧ призводить до підвищення чутливості до розвитку експериментального коліту.

Відомо, що провідну роль у забезпеченні колонізаційної резистентності відіграють представники нормобіоти ШКТ і той вплив, що можуть здійснювати ТНЧ безпосередньо на окремих представників нормобіоти, змінюючи їх метаболічні особливості, може стати основним тригером розвитку багатьох захворювань, у тому числі ЗЗК [88]. У ході дослідження нами вперше була продемонстрована різниця у впливі ТНЧ природного та антропогенного походження на ріст та розвиток штамів трьох представників кишкової мікробіоти: *Escherichia coli* B906, *Staphylococcus aureus* B-918 та *Lactobacillus plantarum* 691.

Так, обидва типи ТНЧ мають інгібуючий вплив на ріст умовно-патогенних бактерій *E. coli* B-906 та *S. aureus* B-918. Однак, ДТ зі зростанням концентрації виявив бактерицидний ефект проти *E. coli* B-906, а ММ мали бактериостатичний вплив на життєздатність обох штамів мікроорганізмів незалежно від

концентрації. Також нами було підтверджено можливість впливу ТНЧ на зміну ферментативної спрямованості *E.coli*, яка проявлялась у появі колоній, не здатних зброджувати лактозу, тобто таких, що мають не цукролітичний, а протеолітичний тип метаболізму. Такі кількісні та якісні наслідки зміни кишкової палички, як представника нормобіоти може мати досить суттєві наслідки, що проявляються у зниженні вмісту КЛЖК, коліцинів, вітамінів (у тому числі групи К), зниженні активності перехресних імунних реакції, що запобігають надмірному заселенню патогенними ентеробактеріями [232, 246, 247].

ТНЧ збільшували агресивний потенціал *E. coli* В-906 та *S. aureus* В-918, підсилюючи утворення біоплівки. ДТ при цьому сприяли утворенню біоплівки обох штамів, а ММ – лише у *S. aureus* В-918. Подібний вплив ТНЧ на підвищену активність біоплівкоутворення також може бути серйозною проблемою. Відомо, що утворення біоплівок умовно-патогенними представниками мікробіоти є найактуальнішою проблемою терапевтичних закладів, яка проявляється у зниженні чутливості біоплівкових угруповань в організмі до антибіотичних препаратів [234, 238].

Крім того, змушує розширити концепцію глобальності розвитку формування резистентності до антибіотиків і той факт, що механізми стійкості бактерій до хімічних речовин та антибіотиків є подібними [242, 248]. І у наших дослідженнях ми демонструємо здатність ТНЧ вже через 48 годин впливати на чутливість *E. coli* В906 та *S. aureus* В-918 до ампіциліну, меропенему та цефтріаксону – найпоширеніших антибіотиків, які використовуються в клінічних дослідженнях та при лікуванні кишкових захворювань. Ці антибіотики належать до класу бета-лактамів. Механізм дії таких антибіотиків полягає у блокуванні синтезу клітинної стінки бактерій шляхом інгібування пеніцилінзв'язуючих білків [249]. Ми припускаємо, що тривала дія РМ призводило до збільшення синтезу бета-лактамаз, що своєю чергою спричиняло інактивацію цих антибіотиків.

Дослідження також показало розвиток резистентності *E. coli* B906 до норфлоксацину, який належить до класу фторхінолонів. Це свідчить про потенцію ТНЧ модифікувати ДНК-гіразу та топоізомеразу, які запобігають порушення синтезу ДНК в бактеріальних клітинах [250].

Також ми виявили небезпечний потенціал ТНЧ у пригніченні ростових параметрів представника облигатно-цукролітичної нормобіоти кишечника *L. plantarum* 691. Крім того, у присутності високих концентрацій ТНЧ, особливо ММ, штам *L. plantarum* 691 втрачав здатність до формування біоплівки. Порушення формування біоплівки представниками роду *Lactobacillus* може мати негативні наслідки порушення гомеостазу всього організму людини і сприяти колонізації патогенними бактеріями [223, 228]. Отримані результати також підтвердили здатність ТНЧ впливати на вироблення молочної кислоти штамом *L. plantarum* 691. З підвищенням концентрації ТНЧ її кількість поступово зменшувалася, а вже через 48 годин культивування продукція молочної кислоти практично повністю припинилася. Молочна кислота, що виробляється цими мікроорганізмами, є важливим елементом в процесах окисного фосфорилування, відіграє ключову роль у регулюванні системи травлення, підтримці оптимальних умов для росту нормобіоти та пригніченні росту патогенних бактерій [227, 228]. Зниження рівня молочної кислоти може створити сприятливе середовище для розмноження шкідливих мікроорганізмів і призвести до дисбалансу мікробіоти, збільшення вразливості організму перед інфекційними агентами та збільшити імовірність виникнення захворювань.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше було комплексно оцінено ефект дії твердих карбонвмісних наночастинок-забруднювачів повітря природного та антропогенного походження в умовах *in vitro*, *ex vivo* та *in vivo* та встановлено їхню здатність порушувати бар'єрну функцію слизової оболонки товстої кишки щурів, стимулювати розвиток прозапальних змін, а також впливати на ростові показники та метаболічну активність представників мікробіоти кишечника.

1. Встановлено, що тверді наночастинок, отримані внаслідок згорання деревини та кори берези, деревини тополі, деревини та гілля сосни, виявляють токсичний вплив на життєдіяльність клітин лінії COLO 205 та погіршують функції епітелію товстої кишки, змінюючи електрогенний транспорт іонів. Ці зміни були стійкими в часі та дозозалежними. Найсильніший ступінь токсичності мають тверді наночастинок, отримані внаслідок згорання деревини тополі. Тверді наночастинок, отримані від згорання деревини берези та сосни, проявляють меншу ефективність впливу, тоді як тверді наночастинок, отримані внаслідок згорання кори берези мали найменшу активність порівняно з іншими.

2. Вперше показано різницю у механізмі дії твердих наночастинок природного та антропогенного походження залежно від шляху їх введення в організм щурів. Гостре введення твердих наночастинок внутрішньовенно вже через 3 години призводить до ушкодження ендотелію судин та активації запалення у слизовій оболонці товстої кишки щурів, проте не призводить до значних змін у стані слизового бар'єру. Пероральне введення твердих наночастинок призводило до зменшення кількості глікопротеїнів у складі поверхневого слизу епітелію товстої кишки та значного збільшення транслокації бактерій у кров ворітної вени, що вказує на порушення мукозального шару та цілісності кишкового бар'єра.

3. Встановлено, що довготривале (протягом 7 діб) пероральне введення твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі та медичних

масок, призводить до значного погіршення фізіологічного стану щурів, втрати маси тіла, збільшення вмісту води у фекаліях та розвитку діареї. Довготривала експозиція твердих наночастинок спричинювала деградацію слизової оболонки кишечника, зміни у складі просвітної мікробіоти з появою умовно-патогенних мікроорганізмів, порушення цілісності ендотелію судин та транслокації бактерій до кровотоку. Після 7-добового введення твердих наночастинок у товстій кишці щурів відзначали зниження струму короткого замикання та рівня відповіді на стимулювальну дію карбахоліну (50 мкМ) та збільшення парацелюлярної проникності. Ця реакція супроводжувалася збільшенням рівнів активності прозапального маркера мієлопероксидази та експресії редокс-чутливого транскрипційного фактора EGR-1. Маса імунних органів (селезінка, цекум) вірогідно не змінювалися. Важливо відзначити, що найбільш виражені зміни були виявлені після введення твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі на відміну від твердих наночастинок отриманих від згорання медичних масок.

4. Доведено, що введення твердих наночастинок, отриманих від згорання деревини тополі та медичних масок, впродовж 7 діб підвищує чутливість щурів до розвитку експериментального коліту, що проявляється у посиленні активації мієлопероксидази та EGR-1, збільшенні маси товстої кишки, зниженні кількості глікопротеїнів слизової оболонки та посиленні проникності ендотелію судин органу у порівнянні із контрольною групою з модельованим колітом. Також було встановлено, що у щурів, яким після 7-добового введення твердих наночастинок моделювали коліт, спостерігалось зниження електрогенного транспорту іонів та пригнічення карбахолін-стимульованої секреції іонів хлору через епітелій товстої кишки.

5. Тверді наночастинок, отримані від згорання деревини тополі та медичних масок, виявили інгібувальну дію на ріст та життєздатність різних штамів бактерій, проявляючи як бактеріостатичний, так і бактерицидний вплив на транзиторних та облігатних представників мікробіоти кишечника. Але їх вплив

різниться залежно від походження та концентрації. Тверді наночастинки здатні посилювати агресивний потенціал умовно-патогенних *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*, сприяючи утворенню біоплівки та розвитку резистентності до антибіотиків, а крім того, пригнічувати ріст та розвиток *Lactobacillus plantarum*, який є одним з ключових представників нормобіоти кишечника. Також виявлено, що тверді наночастинки можуть змінювати ферментативну спрямованість бактерій, викликаючи зміни у їх метаболізмі, зокрема перехід від цукролітичного до протеолітичного типу штамом *Escherichia coli* В-906 та інгібування вироблення молочної кислоти штамом *Lactobacillus plantarum* 691.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, Abbafati C, Abbas KM, et al. (2020) Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2013;2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1223–1249. *Elsevier*.
2. Thangavel P, Park D, Lee Y-C. (2022) Recent Insights into Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>)-Mediated Toxicity in Humans: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*, 19(12).
3. Kim HJ, Choi MG, Park MK, Seo YR. (2017) Predictive and Prognostic Biomarkers of Respiratory Diseases due to Particulate Matter Exposure. *J Cancer Prev*, 22(1), 6–15. *Korean Society of Cancer Prevention*.
4. Chen T, Chen F, Wang K, Ma X, Wei X, et al. (2021) Acute respiratory response to individual particle exposure (PM<sub>1.0</sub>, PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>) in the elderly with and without chronic respiratory diseases. *Environmental Pollution*, 271, 116329.
5. Hamanaka RB, Mutlu GM. (2018) Particulate Matter Air Pollution: Effects on the Cardiovascular System. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9.
6. Chuang K-J, Lin L-Y, Ho K-F, Su C-T. (2020) Traffic-related PM<sub>2.5</sub> exposure and its cardiovascular effects among healthy commuters in Taipei, Taiwan. *Atmos Environ X*, 7, 100084.
7. McGuinn LA, Schneider A, McGarrah RW, Ward-Caviness C, Neas LM, et al. (2019) Association of long-term PM<sub>2.5</sub> exposure with traditional and novel lipid measures related to cardiovascular disease risk. *Environ Int*, 122, 193–200.
8. Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG, Saeian K. (2011) Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: An ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 17(5), 1138–1145.
9. Opstelten JL, Beelen RMJ, Leenders M, Hoek G, Brunekreef B, et al. (2016) Exposure to Ambient Air Pollution and the Risk of Inflammatory Bowel Disease: A European Nested Case–Control Study. *Dig Dis Sci*, 61(10), 2963–2971.

10. Elten M, Benchimol EI, Fell DB, Kuenzig ME, Smith G, et al. (2020) Ambient air pollution and the risk of pediatric-onset inflammatory bowel disease: A population-based cohort study. *Environ Int*, 138, 105676.
11. Dorofeyev A, Dorofeyeva A, Borysov A, Tolstanova G, Borisova T. (2022) Gastrointestinal health: changes of intestinal mucosa and microbiota in patients with ulcerative colitis and irritable bowel syndrome from PM2.5-polluted regions of Ukraine. *Environmental Science and Pollution Research*.
12. Cornick S, Tawiah A, Chadee K. (2015) Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, 3(1). Taylor and Francis Inc.
13. Groschwitz KR, Hogan SP. (2009) Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3–20.
14. Peterson LW, Artis D. (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(3), 141–153.
15. Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. (2006) Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol*, 22(2).
16. Ghosh S, Whitley CS, Haribabu B, Jala VR. (2021) Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 11(5), 1463–1482.
17. Louis P, Hold GL, Flint HJ. (2014) The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*, 12(10), 661–672.
18. Sartor RB. (2008) Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 134(2), 577–594.
19. Hooper L V., Midwedt T, Gordon JI. (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*, 22, 283–307.
20. Li X, Cui J, Yang H, Sun H, Lu R, et al. (2019) Colonic Injuries Induced by Inhalational Exposure to Particulate-Matter Air Pollution. *Advanced Science*, 6(11), 1900180. John Wiley & Sons, Ltd.

21. Mutlu EA, Engen PA, Soberanes S, Urich D, Forsyth CB, et al. (2011) Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice. *Part Fibre Toxicol*, 8(1), 19.
22. Vignal C, Pichavant M, Alleman LY, Djouina M, Dingreville F, et al. (2017) Effects of urban coarse particles inhalation on oxidative and inflammatory parameters in the mouse lung and colon. *Part Fibre Toxicol*, 14(1), 46.
23. Liu Y, Wang T, Si B, Du H, Liu Y, et al. (2021) Intratracheally instilled diesel PM<sub>2.5</sub> significantly altered the structure and composition of indigenous murine gut microbiota. *Ecotoxicol Environ Saf*, 210, 111903.
24. Kish L, Hotte N, Kaplan GG, Vincent R, Tso R, et al. (2013) Environmental Particulate Matter Induces Murine Intestinal Inflammatory Responses and Alters the Gut Microbiome. *PLoS One*, 8(4), e62220-. *Public Library of Science*.
25. Dutta M, Weigel KM, Patten KT, Valenzuela AE, Wallis C, et al. (2022) Chronic exposure to ambient traffic-related air pollution (TRAP) alters gut microbial abundance and bile acid metabolism in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Toxicol Rep*, 9, 432–444.
26. Chassaing B, Darfeuille–Michaud A. (2011) The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1720-1728.e3.
27. Ferraris RP, Diamond J. (1997) Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev*, 77(1), 257–302.
28. Kunzelmann K, Mall M. (2002) Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease. *Physiol Rev*, 82(1), 245–289.
29. Bröer S. (2008) Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol Rev*, 88(1), 249–286.
30. Keita å. v., Söderholm JD. (2010) The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology & Motility*, 22(7), 718–733.

31. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang S-Y, Ko H-J, Vallance BA. (2018) The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol*, 39(9), 677–696.
32. Okumura R, Takeda K. (2017) Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med*, 49(5), e338–e338.
33. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 9(4), 265–278.
34. Толстанова Г. М., Закордонець Л. В., Жолос О. В., Сергійчук Т. М., Довбинчук Т. В., et al. (2020) Пробиотики на варті порушень роботи кишечника, спричинених застосуванням антибіотиків. *Львів: Видавець Марченко Т. В.*
35. Etzold S, Kober OI, MacKenzie DA, Tailford LE, Gunning AP, et al. (2014) Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ Microbiol*, 16(3), 888–903.
36. Johansson ME V, Larsson JMH, Hansson GC. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement\_1), 4659–4665.
37. Casalegno Garduño R, Däbritz J. (2021) New Insights on CD8+ T Cells in Inflammatory Bowel Disease and Therapeutic Approaches. *Front Immunol*, 12. *Frontiers Media S.A.*
38. Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, et al. (2013) Circulating CD4+ and CD8+ T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology*, 140(1), 87–97.
39. Suzuki K, Ha S, Tsuji M, Fagarasan S. (2007) Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol*, 19(2), 127–135.
40. Helander A, Miller CL, Myers KS, Neutra MR, Nibert ML. (2004) Protective Immunoglobulin A and G Antibodies Bind to Overlapping Intersubunit

Epitopes in the Head Domain of Type 1 Reovirus Adhesin  $\sigma 1$ . *J Virol*, 78(19), 10695–10705.

41. Lynn KS, Peterson RJ, Koval M. (2020) Ruffles and spikes: Control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862(9). Elsevier B.V.

42. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29745–29753.

43. Hartsock A, Nelson WJ. (2008) Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1778(3), 660–669. Elsevier.

44. Fung KY, Fairn GD, Lee WL. (2018) Transcellular vesicular transport in epithelial and endothelial cells: Challenges and opportunities. *Traffic*, 19(1), 5–18.

45. Reiche J, Huber O. (2020) Post-translational modifications of tight junction transmembrane proteins and their direct effect on barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(9), 183330.

46. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги "Запальні захворювання кишечника (хвороба Крона, виразковий коліт): Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 11.02.2016 № 90.

47. Wilkins T, Jarvis K. (2011) Diagnosis and Management of Crohn's Disease.

48. Lichtenstein GR, Loftus E V, Isaacs KL, Regueiro MD, Gerson LB, Sands BE. (2018) ACG Clinical Guideline: Management of Crohn's Disease in Adults. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 113(4).

49. Rubin DT, Ananthakrishnan AN, Siegel CA, Sauer BG, Long MD. (2019) ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 114(3).

50. Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. (1988) Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut*, 29(3), 342–345. *BMJ Publishing Group*.

51. Gentile N, Yen EF. (2018) Prevalence, Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Microscopic Colitis. *Gut Liver*, 12(3), 227–235. *Gut and Liver*.
52. Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, Wei SC, Ferrante M, et al. (2020) Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primers*, 6(1), 74.
53. Fumery M, Singh S, Dulai PS, Gower-Rousseau C, Peyrin-Biroulet L, Sandborn WJ. (2018) Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(3), 343-356.e3. *W.B. Saunders*.
54. D’Inca R, Di Leo V, Corrao G, Martines D, D’Odorico A, et al. (1999) Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn’s disease. *Am J Gastroenterol*, 94(10), 2956–2960.
55. Secondulfo M, de Magistris L, Fiandra R, Caserta L, Belletta M, et al. (2001) Intestinal permeability in Crohn’s disease patients and their first degree relatives. *Digestive and Liver Disease*, 33(8), 680–685.
56. Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghooos Y, et al. (1997) Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn’s disease. *Gastroenterology*, 113(3), 802–807.
57. Söderholm JD, Olaison G, Lindberg E, Hannestad U, Vindels A, et al. (1999) Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn’s disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut*, 44(1), 96.
58. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263–274. *Elsevier*.
59. Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN. (1999) Interleukin-10 Gene-Deficient Mice Develop a Primary Intestinal Permeability Defect in Response to Enteric Microflora. *Inflamm Bowel Dis*, 5(4), 262–270.
60. Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. (2009) Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut*, 58(1), 41.

61. Resta-Lenert S, Smitham J, Barrett KE. (2005) Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed *mdr1a*<sup>-/-</sup> mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(1), G153–G162.
62. Olson TS, Reuter BK, Scott KG-E, Morris MA, Wang X-M, et al. (2006) The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *Journal of Experimental Medicine*, 203(3), 541–552.
63. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke J-D, Fromm M. (2000) Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF- $\alpha$ -induced single-cell apoptosis. *The FASEB Journal*, 14(12), 1749–1753. *John Wiley & Sons, Ltd.*
64. Kucharzik T, Walsh S V., Chen J, Parkos CA, Nusrat A. (2001) Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *American Journal of Pathology*, 159(6), 2001–2009. *American Society for Investigative Pathology Inc.*
65. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, et al. (2005) Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory Investigation*, 85(9), 1139–1162.
66. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, et al. (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56(1), 61.
67. Watson AJM, Chu S, Sieck L, Gerasimenko O, Bullen T, et al. (2005) Epithelial Barrier Function In Vivo Is Sustained Despite Gaps in Epithelial Layers. *Gastroenterology*, 129(3), 902–912.
68. Liu JJ, Rudzinski JK, Mah SJ, Thiesen AL, Bao H, et al. (2011) Epithelial gaps in a rodent model of inflammatory bowel disease: A quantitative validation study. *Clin Transl Gastroenterol*, 2.
69. MacDonald TT, Hutchings P, Choy M-Y, Murch S, Cooke A. (1990) Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol*, 81(2), 301–305.

70. Kiesslich R, Goetz M, Angus EM, Hu Q, Guan Y, et al. (2007) Identification of Epithelial Gaps in Human Small and Large Intestine by Confocal Endomicroscopy. *Gastroenterology*, 133(6), 1769–1778.
71. Madara JL, Stafford J. (1989) Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest*, 83(2), 724–727. *The American Society for Clinical Investigation*.
72. Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, et al. (2009) Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. *Gastroenterology*, 136(2), 551–563.
73. Thursby E, Juge N. (2017) Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836.
74. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180.
75. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. (2012) Defining the human microbiome. *Nutr Rev*, 70(suppl\_1), S38–S44.
76. Gaskins HR. (1997) Immunological Aspects of Host/Microbiota Interactions at the Intestinal Epithelium. In *Gastrointestinal Microbiology*, Boston, MA: Springer US. pp.537–587.
77. Swidsinski A, Sydora BC, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, et al. (2007) Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*, 13(8), 963–970.
78. Herath M, Hosie S, Bornstein JC, Franks AE, Hill-Yardin EL. (2020) The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol*, 10. *Frontiers Media S.A.*
79. Sicard JF, Bihan G Le, Vogelee P, Jacques M, Harel J. (2017) Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus. *Front Cell Infect Microbiol*, 7(SEP). *Frontiers Media S.A.*

80. Macfarlane S, Bahrami B, Macfarlane GT. (2011) Chapter 4 - Mucosal Biofilm Communities in the Human Intestinal Tract. In Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM (eds). *Advances in Applied Microbiology, Academic Press*. pp.111–143.
81. Palestrant D, Holzkecht ZE, Collins BH, Parker W, Miller SE, Bollinger RR. (2004) Microbial Biofilms in the Gut: Visualization by Electron Microscopy and by Acridine Orange Staining. *Ultrastruct Pathol*, 28(1), 23–27. *Taylor & Francis*.
82. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. (2005) Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*, 11(8), 1131–1140.
83. Motta J-P, Flannigan KL, Agbor TA, Beatty JK, Blackler RW, et al. (2015) Hydrogen Sulfide Protects from Colitis and Restores Intestinal Microbiota Biofilm and Mucus Production. *Inflamm Bowel Dis*, 21(5), 1006–1017.
84. Kandori H, Hirayama K, Takeda M, Doi K. (1996) Histochemical, Lectin-Histochemical and Morphometrical Characteristics of Intestinal Goblet Cells of Germfree and Conventional Mice. *Exp Anim*, 45(2), 155–160.
85. Szentkuti L, Riedesel H, Enss M-L, Gaertner K, von Engelhardt W. (1990) Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem J*, 22(9), 491–497.
86. Ishikawa K, Satoh Y, Oomori Y, Yamano M, Matsuda M, Ono K. (1989) Influence of conventionalization on cecal wall structure of germ-free Wistar rats: quantitative light and qualitative electron microscopic observations. *Anat Embryol (Berl)*, 180(2), 191–198.
87. Enss ML, Grosse-Siestrup H, Schmidt-Wittig U, Gärtner K. (1992) Changes in colonic mucins of germfree rats in response to the introduction of a “normal” rat microbial flora. Rat colonic mucin. *J Exp Anim Sci*, 35(3), 110–119.
88. Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. (2006) Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 55(10), 1512.

89. Fernández-Navarro T, Salazar N, Gutiérrez-Díaz I, Sánchez B, Rúa-Madiedo P, et al. (2018) Bioactive compounds from regular diet and faecal microbial metabolites. *Eur J Nutr*, 57(2), 487–497.
90. Zhang LS, Davies SS. (2016) Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med*, 8(1), 46.
91. Bérdy J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*, 58(1), 1–26.
92. Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. (2016) Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *J Funct Foods*, 25, 511–522.
93. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. (2016) From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345. *Cell Press*.
94. Basson MD, Liu Y-W, Hanly AM, Emenaker NJ, Shenoy SG, Gould Rothberg BE. (2000) Identification and comparative analysis of human colonocyte short-chain fatty acid response genes. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 4(5), 501–512.
95. Wu W, Sun M, Chen F, Cao AT, Liu H, et al. (2017) Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol*, 10(4), 946–956.
96. Awad AB, Kamei A, Horvath PJ, Fink CS. (1995) Prostaglandin synthesis in human cancer cells: Influence of fatty acids and butyrate. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 53(2), 87–93.
97. D’Argenio G, Mazzacca G. (1999) Short-Chain Fatty Acid in the Human Colon. In Zappia V, Della Ragione F, Barbarisi A, Russo GL, Iacovo R Dello (eds). *Advances in Nutrition and Cancer 2, Boston, MA: Springer US*. pp.149–158.

98. Nielsen DSG, Jensen BB, Theil PK, Nielsen TS, Knudsen KEB, Purup S. (2018) Effect of butyrate and fermentation products on epithelial integrity in a mucus-secreting human colon cell line. *J Funct Foods*, 40, 9–17.
99. Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, et al. (2009) The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochemical Journal*, 420(2), 211–219.
100. Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle J-A, Cuber J-C, Plaisancié P. (2000) Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*, 46(2), 218.
101. Wang H-B, Wang P-Y, Wang X, Wan Y-L, Liu Y-C. (2012) Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Dig Dis Sci*, 57(12), 3126–3135.
102. Feng Y, Wang Y, Wang P, Huang Y, Wang F. (2018) Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), 190–205.
103. Diao H, Jiao AR, Yu B, Mao XB, Chen DW. (2019) Gastric infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal barrier function in weaned piglets. *Genes Nutr*, 14(1). *BioMed Central Ltd*.
104. Shimada Y, Kinoshita M, Harada K, Mizutani M, Masahata K, et al. (2013) Commensal Bacteria-Dependent Indole Production Enhances Epithelial Barrier Function in the Colon. *PLoS One*, 8(11), e80604-. *Public Library of Science*.
105. Guo X, Rao JN, Liu L, Zou T-T, Turner DJ, et al. (2003) Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285(5), C1174–C1187. *American Physiological Society*.
106. Guo X, Rao JN, Liu L, Zou T, Keledjian KM, et al. (2005) Polyamines are necessary for synthesis and stability of occludin protein in intestinal epithelial cells.

*American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6), G1159–G1169. *American Physiological Society*.

107. Singh R, Chandrashekarappa S, Bodduluri SR, Baby B V, Hegde B, et al. (2019) Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nat Commun*, 10(1), 89.

108. Chen Y, Yang B, Ross RP, Jin Y, Stanton C, et al. (2019) Orally Administered CLA Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice via Intestinal Barrier Improvement, Oxidative Stress Reduction, and Inflammatory Cytokine and Gut Microbiota Modulation. *J Agric Food Chem*, 67(48), 13282–13298. *American Chemical Society*.

109. Raimondi F, Santoro P, Barone MV, Pappacoda S, Barretta ML, et al. (2008) Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(4), G906–G913. *American Physiological Society*.

110. Roche HM, Terres AM, Black IB, Gibney MJ, Kelleher D. (2001) Fatty acids and epithelial permeability: effect of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. *Gut*, 48(6), 797.

111. Stenman LK, Holma R, Eggert A, Korpela R. (2012) A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304(3), G227–G234. *American Physiological Society*.

112. Sartor RB, Wu GD. (2017) Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*, 152(2), 327-339.e4.

113. Nishino K, Nishida A, Inoue R, Kawada Y, Ohno M, et al. (2018) Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, 53(1), 95–106.

114. Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, et al. (2016) Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Gastroenterologia*, 93(1), 59–65.
115. Health Effects Institute Annual Report 2022. (2022) Insights that Endure: Investing in Science for Lasting Impact. *Boston*.
116. Boogaard H, Walker K, Cohen AJ. (2019) Air pollution: the emergence of a major global health risk factor. *Int Health*, 11(6), 417–421.
117. Thurston GD, Kipen H, Annesi-Maesano I, Balmes J, Brook RD, et al. (2017) A joint ERS/ATS policy statement: what constitutes an adverse health effect of air pollution? An analytical framework. *European Respiratory Journal*, 49(1), 1600419.
118. World Health Organisation. WHO Ambient Air quality database. [Accessed on: 18.2.2023] Available at: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/air-pollution/who-air-quality-database>
119. Health Effects Institute. 2020, State of Global Air 2020. (2020) Number of Deaths Attributable to Air Pollution in 2019. [Accessed on: 18.5.2023] Available at: State of Global Air 2020
120. Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. (2020) Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Health*, 8.
121. Leung DY. (2015) Outdoor-indoor air pollution in urban environment: challenges and opportunity. *Front Environ Sci*, 2.
122. World Health Organisation. (2022) Ambient (outdoor) air pollution. [Accessed on: 18.2.2023] Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
123. Kim K-H, Kabir E, Kabir S. (2015) A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ Int*, 74, 136–143.

124. Masiol M, Squizzato S, Formenton G, Khan MB, Hopke PK, et al. (2020) Hybrid multiple-site mass closure and source apportionment of PM<sub>2.5</sub> and aerosol acidity at major cities in the Po Valley. *Science of The Total Environment*, 704, 135287.

125. Mattsson K, da Silva VH, Deonarine A, Louie SM, Gondikas A. (2021) Monitoring anthropogenic particles in the environment: Recent developments and remaining challenges at the forefront of analytical methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 56, 101513.

126. Aragon-Piña A. (2011) ¿Cómo son las partículas atmosféricas antropogénicas y cuál es su relación con los diversos tipos de fuentes contaminantes?

127. Srimuruganandam B, Shiva Nagendra SM. (2012) Source characterization of PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> mass using a chemical mass balance model at urban roadside. *Science of The Total Environment*, 433, 8–19.

128. Cheung K, Daher N, Kam W, Shafer MM, Ning Z, et al. (2011) Spatial and temporal variation of chemical composition and mass closure of ambient coarse particulate matter (PM<sub>10–2.5</sub>) in the Los Angeles area. *Atmos Environ*, 45(16), 2651–2662.

129. Misra C, Geller MD, Shah P, Sioutas C, Solomon PA. (2001) Development and Evaluation of a Continuous Coarse (PM<sub>10</sub>–PM<sub>25</sub>) Particle Monitor. *J Air Waste Manage Assoc*, 51(9), 1309–1317. *Taylor & Francis*.

130. Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W. (1996) Free radical activity and pro-inflammatory effect of particulate air pollution (PM<sub>10</sub>) in vivo and in vitro. *Thorax*, 51(12), 1216–1222. *BMJ Publishing Group*.

131. Li D, Li Y, Li G, Zhang Y, Li J, Chen H. (2019) Fluorescent reconstitution on deposition of PM<sub>2.5</sub> in lung and extrapulmonary organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), 2488–2493. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

132. Traboulsi H, Guerrina N, Iu M, Maysinger D, Ariya P, Baglolle CJ. (2017) Inhaled Pollutants: The Molecular Scene behind Respiratory and Systemic Diseases Associated with Ultrafine Particulate Matter. *Int J Mol Sci*, 18(2).

133. Aalapati S, Ganapathy S, Manapuram S, Anumolu G, Prakya BM. (2014) Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nanoparticles in CD1 mice. *Nanotoxicology*, 8(7), 786–798. *Taylor & Francis*.
134. Particles HEInstituteRP on U. (2013) Understanding the health effects of ambient ultrafine particles. *Health Effects Institute*.
135. Xie W, You J, Zhi C, Li L. (2021) The toxicity of ambient fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) to vascular endothelial cells. *Journal of Applied Toxicology*, 41(5), 713–723. *John Wiley & Sons, Ltd*.
136. Wang Y, Tang M. (2019) PM<sub>2.5</sub> induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance. *Environmental Pollution*, 254, 112937.
137. Fu H, Liu X, Li W, Zu Y, Zhou F, et al. (2020) PM<sub>2.5</sub> Exposure Induces Inflammatory Response in Macrophages via the TLR4/COX-2/NF- $\kappa$ B Pathway. *Inflammation*, 43(5), 1948–1958.
138. Wang J, Zhang WJ, Xiong W, Lu WH, Zheng HY, et al. (2018) PM<sub>2.5</sub> stimulated the release of cytokines from BEAS-2B cells through activation of IKK/NF- $\kappa$ B pathway. *Hum Exp Toxicol*, 38(3), 311–320. *SAGE Publications Ltd STM*.
139. Garcia GJM, Schroeter JD, Kimbell JS. (2015) Olfactory deposition of inhaled nanoparticles in humans. *Inhal Toxicol*, 27(8), 394–403. *Taylor & Francis*.
140. Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, et al. (2002) Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation*, 105(4), 411–414. *American Heart Association*.
141. Pryor JT, Cowley LO, Simonds SE. (2022) The Physiological Effects of Air Pollution: Particulate Matter, Physiology and Disease. *Front Public Health*, 10.
142. Xian M, Ma S, Wang K, Lou H, Wang Y, et al. (2020) Particulate Matter 2.5 Causes Deficiency in Barrier Integrity in Human Nasal Epithelial Cells. *Allergy Asthma Immunol Res*, 12(1), 56–71. *The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology and The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease*.

143. Whitsett JA. (2018) Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann Am Thorac Soc*, 15 Supplement\_3, S143–S148.

144. Mutlu EA, Comba IY, Cho T, Engen PA, Yazıcı C, et al. (2018) Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome. *Environmental Pollution*, 240, 817–830.

145. Toby C. Lewis, Thomas G. Robins, J. Timothy Dvonch, Gerald J. Keeler, Fuyuen Y. Yip, et al. (2005) Air Pollution–Associated Changes in Lung Function among Asthmatic Children in Detroit. *Environ Health Perspect*, 113(8), 1068–1075. *Environmental Health Perspectives*.

146. Zhao C, Wang Y, Su Z, Pu W, Niu M, et al. (2020) Respiratory exposure to PM<sub>2.5</sub> soluble extract disrupts mucosal barrier function and promotes the development of experimental asthma. *Science of The Total Environment*, 730, 139145.

147. Liu G, Li Y, Zhou J, Xu J, Yang B. (2022) PM<sub>2.5</sub> deregulated microRNA and inflammatory microenvironment in lung injury. *Environ Toxicol Pharmacol*, 91, 103832.

148. Zhou Y, Ma J, Wang B, Liu Y, Xiao L, et al. (2020) Long-term effect of personal PM<sub>2.5</sub> exposure on lung function: A panel study in China. *J Hazard Mater*, 393, 122457.

149. Winterbottom CJ, Shah RJ, Patterson KC, Kreider ME, Panettieri Jr. RA, et al. (2018) Exposure to Ambient Particulate Matter Is Associated With Accelerated Functional Decline in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest*, 153(5), 1221–1228. *Elsevier*.

150. Li F-R, Wu K-Y, Fan W-D, Chen G-C, Tian H, Wu X-B. (2022) Long-term exposure to air pollution and risk of incident inflammatory bowel disease among middle and old aged adults. *Ecotoxicol Environ Saf*, 242, 113835.

151. Kaplan GG, Szyszkowicz M, Fichna J, Rowe BH, Porada E, et al. (2012) Non-Specific Abdominal Pain and Air Pollution: A Novel Association. *PLoS One*, 7(10), e47669-. *Public Library of Science*.

152. Xu C, Kan H-D, Fan Y-N, Chen R-J, Liu J-H, et al. (2016) Acute effects of air pollution on enteritis admissions in Xi'an, China. *J Toxicol Environ Health A*, 79(24), 1183–1189. *Taylor & Francis*.

153. Tsai S-S, Chiu H-F, Yang C-Y. (2019) Ambient Air Pollution and Hospital Admissions for Peptic Ulcers in Taipei: A Time-Stratified Case-Crossover Study. *Int J Environ Res Public Health*, 16(11).

154. Gu J, Shi Y, Zhu Y, Chen N, Wang H, et al. (2020) Ambient air pollution and cause-specific risk of hospital admission in China: A nationwide time-series study. *PLoS Med*, 17(8), e1003188-. *Public Library of Science*.

155. Woodby B, Schiavone ML, Pambianchi E, Mastaloudis A, N. Hester S, et al. (2020) Particulate Matter Decreases Intestinal Barrier-Associated Proteins Levels in 3D Human Intestinal Model. *Int J Environ Res Public Health*, 17(9).

156. Li X, Sun H, Li B, Zhang X, Cui J, et al. (2019) Probiotics Ameliorate Colon Epithelial Injury Induced by Ambient Ultrafine Particles Exposure. *Advanced Science*, 6(18), 1900972. *John Wiley & Sons, Ltd*.

157. Fu P, Bai L, Cai Z, Li R, Yung KKL. (2020) Fine particulate matter aggravates intestinal and brain injury and affects bacterial community structure of intestine and feces in Alzheimer's disease transgenic mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 192, 110325.

158. Salim SY, Jovel J, Wine E, Kaplan GG, Vincent R, et al. (2014) Exposure to Ingested Airborne Pollutant Particulate Matter Increases Mucosal Exposure to Bacteria and Induces Early Onset of Inflammation in Neonatal IL-10–Deficient Mice. *Inflamm Bowel Dis*, 20(7), 1129–1138.

159. Liu W, Zhou Y, Qin Y, Yu L, Li R, et al. (2020) Quercetin Intervention Alleviates Offspring's Oxidative Stress, Inflammation, and Tight Junction Damage in the Colon Induced by Maternal Fine Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>) Exposure through the Reduction of Bacteroides. *Nutrients*, 12(10).

160. Park SK, Kang JY, Kim JM, Kim MJ, Lee HL, et al. (2022) Porphyra tenera Protects against PM2.5-Induced Cognitive Dysfunction with the Regulation of Gut Function. *Mar Drugs*, 20(7).

161. Jin L, Deng L, Bartlett M, Ren Y, Lu J, et al. (2022) A Novel Herbal Extract Blend Product Prevents Particulate Matters-Induced Inflammation by Improving Gut Microbiota and Maintaining the Integrity of the Intestinal Barrier. *Nutrients*, 14(10).

162. Xie S, Zhang C, Zhao J, Li D, Chen J. (2022) Exposure to concentrated ambient PM2.5 (CAPM) induces intestinal disturbance via inflammation and alternation of gut microbiome. *Environ Int*, 161, 107138.

163. Wang W, Zhou J, Chen M, Huang X, Xie X, et al. (2018) Exposure to concentrated ambient PM2.5 alters the composition of gut microbiota in a murine model. *Part Fibre Toxicol*, 15(1), 17.

164. Phillippi DT, Daniel S, Pusadkar V, Youngblood VL, Nguyen KN, et al. (2022) Inhaled diesel exhaust particles result in microbiome-related systemic inflammation and altered cardiovascular disease biomarkers in C57Bl/6 male mice. *Part Fibre Toxicol*, 19(1), 10.

165. Yi W, Ji Y, Gao H, Luo S, Pan R, et al. (2023) Effects of urban particulate matter on gut microbiome and partial schizophrenia-like symptoms in mice: Evidence from shotgun metagenomic and metabolomic profiling. *Science of The Total Environment*, 857, 159305.

166. Liu T, Chen X, Xu Y, Wu W, Tang W, et al. (2019) Gut microbiota partially mediates the effects of fine particulate matter on type 2 diabetes: Evidence from a population-based epidemiological study. *Environ Int*, 130, 104882.

167. Shelestov A, Kolotii A, Borisova T, Turos O, Milinevsky G, et al. (2020) Essential variables for air quality estimation. *Int J Digit Earth*, 13(2), 278–298. *Taylor & Francis*.

168. Tarasenko A, Pozdnyakova N, Paliienko K, Borysov A, Krisanova N, et al. (2022) A comparative study of wood sawdust and plastic smoke particulate matter

with a focus on spectroscopic, fluorescent, oxidative, and neuroactive properties. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(25), 38315–38330.

169. Borysov A, Tarasenko A, Krisanova N, Pozdnyakova N, Pastukhov A, et al. (2020) Plastic smoke aerosol: Nano-sized particle distribution, absorption/fluorescent properties, dysregulation of oxidative processes and synaptic transmission in rat brain nerve terminals. *Environmental Pollution*, 263, 114502.

170. Satoh H, Sato F, Takami K, Szabo S. (1997) New Ulcerative Colitis Model Induced by Sulfhydryl Blockers in Rats and the Effects of Antiinflammatory Drugs on the Colitis. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 73(4), 299–309.

171. Brown DR, O’Grady SM. (2008) The Ussing chamber and measurement of drug actions on mucosal ion transport. *Curr Protoc Pharmacol*, (SUPPL. 41).

172. Kisser B, Mangelsen E, Wingolf C, Partecke LI, Heidecke C, et al. (2017) The Ussing Chamber Assay to Study Drug Metabolism and Transport in the Human Intestine. *Curr Protoc Pharmacol*, 77(1). Wiley.

173. Стецька В.О. Роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів в порушеннях секретомоторної функції кишечника за експериментального паркінсонізму: дис. д-ра філософії: 091. Київ: КНУ, 2023. 189 с.

174. Терещенко МФ, Тимчик ГС, Яковенко Ю. (2019) Біофізика. Практикум. Київ: Політехніка.

175. Paliienko K, Korbush M, Krisanova N, Pozdnyakova N, Borysov A, et al. (2022) Similar in vitro response of rat brain nerve terminals, colon preparations and COLO 205 cells to smoke particulate matter from different types of wood. *Neurotoxicology*, 93, 244–256.

176. Фурзікова Т., Сергійчук М., Власенко В., Швець Ю., Позур В. (2006) Мікробіологія. Практикум. Київ: Фітосоціоцентр.

177. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GDI, Djukić S, et al. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899. John Wiley & Sons, Ltd.

178. Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів": Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 05.04.2007 № 167.

179. Larauche M, Gourcerol G, Wang L, Pambukchian K, Brunnhuber S, et al. (2009) Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(1), G215–G227.

180. Akiba Y, Guth PH, Engel E, Nastaskin I, Kaunitz JD. (2000) Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(2), G437–G447.

181. Голота Ю. О. Біохімічні показники стану кишкового бар'єра у віддалені терміни після введення цефтриаксону : дис. канд. біол. наук: 091. Київ: КНУ, 2017. 145 с.

182. Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdarska-Burek U, Jarosz-Wilkołazka A, Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev*, 41(6), 941–962.

183. Thomson A, Smart K, Somerville MS, Lauder SN, Appanna G, et al. (2019) The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. *BMC Gastroenterol*, 19(1). *BioMed Central Ltd*.

184. Blondeau D, St-Pierre A, Bourdeau N, Bley J, Lajeunesse A, Desgagné-Penix I. (2020) Antimicrobial activity and chemical composition of white birch (*Betula papyrifera* Marshall) bark extracts. *Microbiologyopen*, 9(1), e00944. *John Wiley & Sons, Ltd*.

185. Miranda I, Gominho J, Mirra I, Pereira H. (2013) Fractioning and chemical characterization of barks of *Betula pendula* and *Eucalyptus globulus*. *Ind Crops Prod*, 41, 299–305.

186. He J, Ma C, Ma Y, Li H, Kang J, et al. (2013) Cadmium tolerance in six poplar species. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(1), 163–174.

187. Chandra R, Kang H. (2016) Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. *Forest Sci Technol*, 12(2), 55–61. *Taylor & Francis*.

188. Levei L, Cadar O, Babalau-Fuss V, Kovacs E, Torok AI, et al. (2021) Use of Black Poplar Leaves for the Biomonitoring of Air Pollution in an Urban Agglomeration. *Plants*, 10(3).

189. Державне агентство лісових ресурсів України. (2020) Природна структура лісів України (Інфографіка). [Accessed on: 7.7.2021] Available at: <https://forest.gov.ua/news/prirodna-struktura-lisiv-ukrayini-infografika>

190. Seo I, Lee K, Bae M-S, Park M, Maskey S, et al. (2020) Comparison of physical and chemical characteristics and oxidative potential of fine particles emitted from rice straw and pine stem burning. *Environmental Pollution*, 267, 115599.

191. Cindoruk SS, Sakin AE, Tasdemir Y. (2020) Levels of persistent organic pollutants in pine tree components and ambient air. *Environmental Pollution*, 256, 113418.

192. Weijers E, Schaap M, Nguyen L, Matthijsen J, Denier van der Gon H, et al. (2011) Anthropogenic and natural constituents in particulate matter in the Netherlands. *Atmos Chem Phys*, 11, 2281–2294.

193. Yang X. (2023) Analysis of the Optimal Use of Fabric Masks and Disposable Medical Masks During the COVID-19.

194. Fadare OO, Okoffo ED. (2020) Covid-19 face masks: A potential source of microplastic fibers in the environment. *Science of The Total Environment*, 737, 140279.

195. Andeobu L, Wibowo S, Grandhi S. (2022) Medical Waste from COVID-19 Pandemic—A Systematic Review of Management and Environmental Impacts in Australia. *Int J Environ Res Public Health*, 19(3). *MDPI*.

196. Yogesh Sapkale, Darshan Patil, Mayur Deshmukh, Dadabhai Lakyzari. (2022) Design and Fabrication of Safe Mask and Hand Gloves Disposal Machine.

*International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology*, 232–236. Naksh Solutions.

197. Gómez Tagle M. The Massive Misuse of Face Mask as a Risk to COVID-19 Pandemic in Latin American: The Case of Mexico.

198. Peng J, Wu X, Wang R, Li C, Zhang Q, Wei D. (2020) Medical waste management practice during the 2019-2020 novel coronavirus pandemic: Experience in a general hospital. *Am J Infect Control*, 48(8), 918–921. Elsevier.

199. Kodros JK, O'Dell K, Samet JM, L'Orange C, Pierce JR, Volckens J. (2021) Quantifying the Health Benefits of Face Masks and Respirators to Mitigate Exposure to Severe Air Pollution. *Geohealth*, 5(9), e2021GH000482. John Wiley & Sons, Ltd.

200. Velasco E, Ha HH, Pham AD, Rastan S. (2022) Effectiveness of wearing face masks against traffic particles on the streets of Ho Chi Minh City, Vietnam. *Environmental Science: Atmospheres*, 2(6), 1450–1468. RSC.

201. Chami B, Martin NJJ, Dennis JM, Witting PK. (2018) Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. *Arch Biochem Biophys*, 645, 61–71.

202. Дьяченко А.Г., Горобченко К.М. (2016) Мукозний імунітет і транслокація бактерій. *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія*, 8(97), 10–16.

203. Lu J, Wang A, Ansari S, Hershberg RM, McKay DM. (2003) Colonic bacterial superantigens evoke an inflammatory response and exaggerate disease in mice recovering from colitis. *Gastroenterology*, 125(6), 1785–1795.

204. Khanna S. (2020) Management of *Clostridioides difficile* infection in patients with inflammatory bowel disease. *Intest Res*, 19(3), 265–274. Korean Association for the Study of Intestinal Diseases.

205. Lajqi T, Pöschl J, Frommhold D, Hudalla H. (2020) The Role of Microbiota in Neutrophil Regulation and Adaptation in Newborns. *Front Immunol*, 11.

206. Zhang D, Frenette PS. (2019) Cross talk between neutrophils and the microbiota. *Blood*, 133(20), 2168–2177.

207. Haas M, Forbush III B. (2000) The Na-K-Cl Cotransporter of Secretory Epithelia. *Annu Rev Physiol*, 62(1), 515–534. *Annual Reviews*.
208. Moon C, Zhang W, Sundaram N, Yarlagadda S, Reddy VS, et al. (2015) Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. *Pharmacol Res*, 102, 107–112.
209. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. (2019) Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*, 4(33), eaau6085. *American Association for the Advancement of Science*.
210. Weiberg Desiree AND Basic MANDSMANDBUANDBMANDBM. (2018) Participation of the spleen in the IgA immune response in the gut. *PLoS One*, 13(10), 1–18. *Public Library of Science*.
211. Spencer J, Dogan A. (2009) A common migratory highway between human spleen and mucosa-associated lymphoid tissues; data from nature's own experiments. *Mucosal Immunol*, 2(5), 380–382.
212. Laurin M, Everett M Lou, Parker W. (2011) The Cecal Appendix: One More Immune Component With a Function Disturbed By Post-Industrial Culture. *Anat Rec*, 294(4), 567–579. *John Wiley & Sons, Ltd*.
213. Holota Y, Tjapko O, Dovbynychuk T, Tolstanova G. (2015) The disturbance of oxidant-antioxidant balance in rat colonic mucosa after antibiotic therapy. *Studia Biologica*, 9, 49–56.
214. Tolstanova G, Deng X, French SW, Lungo W, Paunovic B, et al. (2012) Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice. *Laboratory Investigation*, 92(1), 9–21.
215. Sullivan S, Alex P, Dassopoulos T, Zachos NC, Iacobuzio-Donahue C, et al. (2009) Downregulation of sodium transporters and NHERF proteins in IBD patients and mouse colitis models: Potential contributors to IBD-associated diarrhea. *Inflamm Bowel Dis*, 15(2), 261–274. *John Wiley & Sons, Ltd*.
216. Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK. (2012) Gene Expression of Solute Carrier Family 9 (Sodium/Hydrogen Exchanger) 3, (SLC9A3) is

Downregulated in Patients with Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 18(6), 1197–1198.

217. Barmeyer C, Harren M, Schmitz H, Heinzl-Pleines U, Mankertz J, et al. (2004) Mechanisms of diarrhea in the interleukin-2-deficient mouse model of colonic inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(2), G244–G252. *American Physiological Society*.

218. Barmeyer C, Horak I, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2003) The Interleukin-2-Deficient Mouse Model. *Pathobiology*, 70(3), 139–142.

219. Paul G, Marchelletta RR, McCole DF, Barrett KE. (2012) Interferon- $\gamma$  Alters Downstream Signaling Originating from Epidermal Growth Factor Receptor in Intestinal Epithelial Cells: FUNCTIONAL CONSEQUENCES FOR ION TRANSPORT \*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 2144–2155. *Elsevier*.

220. Magalhães D, Cabral JM, Soares-da-Silva P, Magro F. (2016) Role of epithelial ion transports in inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(7), G460–G476. *American Physiological Society*.

221. Толстанова Г.М. (2010) Зміни транскрипційної активності редокс-чутливого фактору росту ранньої відповіді (Egr-1) в патогенезі запальних захворювань кишечника. *Вісник проблем біології і медицини*, 3, 66–71.

222. Li N, Yang Z, Liao B, Pan T, Pu J, et al. (2020) Chronic exposure to ambient particulate matter induces gut microbial dysbiosis in a rat COPD model. *Respir Res*, 21(1), 271.

223. Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. (2018) Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr Opin Biotechnol*, 49, 140–147.

224. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, et al. (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 732–737. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

225. Wang M, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. (2005) Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol*, 54(2), 219–231. *John Wiley & Sons, Ltd.*

226. Dasari S. (2019) Chapter 1 - Recent Findings of Lactobacillus Diversity and Their Functional Role in Vaginal Ecosystems. In Buddolla V (ed). *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Academic Press. pp.3–12.

227. Dempsey E, Corr SC. (2022) Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front Immunol*, 13.

228. Mgomi FC, Yang Y, Cheng G, Yang Z. (2023) Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. *Biofilm*, 5, 100118.

229. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. (2019) Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *Int J Mol Sci*, 20(14).

230. Hossain A. (2012) Presence and pattern of virulence genes in non-lactose fermenting *Escherichia coli* strains isolated from stools of children <5 years in rural and urban Bangladesh. *International Journal of Infectious Diseases*, 16, e395. *Elsevier*.

231. Nicoletti M, Superti F, Conti C, Calconi A, Zagaglia C. (1988) Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Somalia. *J Clin Microbiol*, 26(3), 524–529. *American Society for Microbiology*.

232. Mazumder R, Hussain A, Phelan JE, Campino S, Haider SMA, et al. (2022) Non-lactose fermenting *Escherichia coli*: Following in the footsteps of lactose fermenting *E. coli* high-risk clones. *Front Microbiol*, 13. *Frontiers Media S.A.*

233. Zhang T, Shi X-C, Xia Y, Mai L, Tremblay P-L. (2019) *Escherichia coli* adaptation and response to exposure to heavy atmospheric pollution. *Sci Rep*, 9(1), 10879.

234. Wolcott R, Dowd S. (2011) The Role of Biofilms: Are We Hitting the Right Target? *Plast Reconstr Surg*, 127.

235. Leekitcharoenphon P, Johansson MHK, Munk P, Malorny B, Skarżyńska M, et al. (2021) Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 11(1), 15108.

236. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, et al. (2023) *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol*, 21(6), 380–395.

237. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Vance FG. (2015) *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev*, 28(3), 603–661. *American Society for Microbiology*.

238. Paharik AE, Horswill AR. (2016) The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.vmbf-0022–2015. *American Society for Microbiology*.

239. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. (2019) Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol Spectr*, 7(2), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0057–2018. *American Society for Microbiology*.

240. Berezhna A V, Tertyshnyi VO, Makarova VI, Chumachenko TO. (2021) *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* in biological systems of hospital environment: Antibiotic resistance patterns in regions of Ukraine. *Regul Mech Biosyst*, 12(1).

241. Netsvyetayeva I, Fraczek M, Piskorska K, Golas M, Sikora M, et al. (2014) *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ukraine: antibacterial resistance and virulence factor encoding genes. *BMC Infect Dis*, 14(1), 128.

242. Kumar S, Varela MF. (2013) Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents.

243. Engeline van D, Anne-Kathrin S, C RM, Yang W, Stefan S. (2018) Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbiol Spectr*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.arba-0019–2017. *American Society for Microbiology*.

244. Saiki T. (1998) Myeloperoxidase concentrations in the stool as a new parameter of inflammatory bowel disease. *Kurume Med J*, 45 1, 69–73.
245. Singh V, Ahlawat S, Mohan H, Gill SS, Sharma KK. (2022) Balancing reactive oxygen species generation by rebooting gut microbiota. *J Appl Microbiol*, 132(6), 4112–4129.
246. Zhang Y-J, Li S, Gan R-Y, Zhou T, xu D, Li H-B. (2015) Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int J Mol Sci*, 16, 7493–7519.
247. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*, 54(9), 2325–2340. *Elsevier*.
248. Reygaert WC. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, 4(3), 482–501.
249. Holten KB, Onusko EM. (2000) Appropriate Prescribing of Oral Beta-Lactam Antibiotics. *Am Fam Physician*, 62(3), 611–620.
250. Blondeau JM. (2004) Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol*, 49(2), S73–S78. *Elsevier*.

## Перелік опублікованих праць та відомості про апробацію досліджень

### Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Paliienko, K., **Korbush, M.**, Krisanova, N., Pozdnyakova, N., Borysov, A., Tarasenko, A., Pastukhov, A., Dudarenko, M., Kalynovska, L., Grytsaenko, V., Garmanchuk, L., Dovbynychuk, T., Tolstanova, G., & Borisova, T. (2022). Similar in vitro response of rat brain nerve terminals, colon preparations and COLO 205 cells to smoke particulate matter from different types of wood. *Neurotoxicology*, 93, 244–256. – Q2 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank. (особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів до опублікування).

2. **Korbush M.Iu.**, Serhiichuk T.M., Yumyna Y.M., Borisova T.O., Tolstanova G.M. (2023). The effect of particulate matter of natural and anthropogenic origin on growth indicators and sensitivity to antibiotics of *Escherichia coli* B906. *Microbiological journal*, 85(4), P. 34-45. (особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).

3. **Korbush, M.**, Tolstanova, G. (2023). Intestinal barrier integrity under effect of particulate matter from cottonwood combustion. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*, 93(2), 22-28. (особистий внесок здобувача: інформаційний пошук, експериментальні дослідження, опис та статистичне опрацювання результатів, графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).

### Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. **Корбуш М.Ю.**, Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М., Борисова Т.О. (2021). Тверді частинки диму підвищують схильність до запальних захворювань кишечника. У: *VIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»*. Київ, Україна, 18-19 листопада 2021. сс. 54-56.

2. **Korbush M.**, Yumyna A., Serhiichuk T., Tolstanova G., Borisova T. (2022). Influence of synthesized water-suspended preparations of carbon-containing smoke nanoparticles from natural and synthetic origins on the growth indicators of *Escherichia coli* B906. In: *IV international scientific conference «Microbiology and Immunology - the development outlook in the 21st century»*. Kyiv, Ukraine, September 22-23, 2022. p. 43.

3. **M. Korbush**, K. Paliienko, T. Dovbynychuk, T. Borisova, G. Tolstanova. (2022). Particulate matter from natural precursor increases susceptibility to inflammatory bowel disease. In: *30<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week 2022 Poster Presentations*. Vien, Austria, October 8-11, 2022. United European Gastroenterol J, 10. pp. 620-621.

4. **Корбуш М.Ю.** Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М., Борисова Т.О. (2022). Тверді наночастинки диму сприяють виникненню прозапальних змін у кишечнику. У: *IX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень*. Київ, Україна, 18-19 листопада 2022. сс. 260-261.

5. Іщук А.М., Юмина А.Я., **Корбуш М.Ю.**, Сергійчук Т.М., Борисова Т.О., Толстанова Г.М. (2023). Вплив твердих наночастинок-забруднювачів повітря синтетичного походження на ростові показники *Lactobacillus plantarum*. У: *Youth Biological Conference*, Київ, Україна, 15 квітня 2023. сс. 19-23

6. **Корбуш М.Ю.**, Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М., Борисова Т.О. (2023). Тверді наночастинки диму від згоряння деревини тополі як фактор порушення бар'єрної функції кишечника. У: *XX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя»*. Київ, Україна 27-28 квітня 2023. сс. 185-189.