

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ “Інститут біології та медицини”

Кафедра екології та зоології

В.о.завідувача кафедри

к.б.н., доц. Анатолій ПОДОБАЙЛО

Протокол №_____ засідання кафедри

від “_____” _____20__ р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ СПОЛУК КАДМІЮ
БІОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю 101.Екологія

Євтушок Руслани Миколаївни

Науковий керівник від кафедри

Д.б.н., проф. Гарманчук Л.В.

Оцінка захисту роботи _____

Київ – 2025 р.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
РОЗДІЛ 1.....	6
1.1 Дослідження токсичності важких металів біологічними методами.....	6
1.2 Важкі метали, їх поширеність і вплив на організм.....	6
1.3 Токсикологія кадмію.....	8
РОЗДІЛ 2.....	10
2.1 Шляхи попадання кадмію в довкілля.....	10
2.2 Біомагніфікація кадмію.....	11
2.3 Накопичення кадмію в навколишньому середовищі.....	12
2.4 Шляхи надходження кадмію в організм людини.....	13
2.5. Наноматеріали та наночастинки на основі кадмію.....	14
2.6. Практичне застосування методів біоремедіації.....	16
2.7. Методи зеленого синтезу кадмію.....	17
РОЗДІЛ 3.....	19
3.1 Потенційна небезпека кадмію для здоров'я людини.....	19
РОЗДІЛ 4. Матеріали і методи.....	22
4.1. Матеріали та обладнання що використані в експерименті.....	22
4.2. Клітини та матеріали.....	23
4.3.МТТ-тест.....	24
4.4.Визначення каталазної активності.....	26
4.5. Визначення ТБК-активних компонентів.....	27
4.6.Оцінка рівня SH-активних продуктів.....	28
4.7.Статистичний аналіз.....	29
РОЗДІЛ 5.....	30
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	30

5.1 МТТ-колориметричний метод визначення виживаності гепатоцитів за впливу наночастинок сульфїду кадмію.....	31
5.2.Визначення вмісту сульфїдрильних груп та каталазної активності в гепатоцитах за дії наночастинок кадмію отриманих зеленим та хїмічним синтезом.....	34
ВИСНОВКИ.....	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	39

СПИСОК ТЕРМІНІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

CdS – сульфід кадмію

МТТ – 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолієвий бромід

DMSO – диметилсульфоксид

SH-групи – сульфгідрильні групи

ТБК – тіобарбітурова кислота, у контексті – ТБК-активні компоненти

РРМІ-1640 – стандартне живильне середовище для культивування клітин

НерG2 – клітинна лінія гепатоцитів людини

PBS – фосфатно-сольовий буфер (phosphate-buffered saline)

ЕТС – ембріональна теляча сироватка (fetal calf serum, іноді позначається як FCS або FBS)

ТОРО – три-п-октилфосфіноксид

ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія

ПЙ – пропідій йодид

ВСТУП

В довкіллі спостерігається щорічне накопичення різних груп токсикантів, в особливості, важких металів, які є малорозчинними та здатні накопичуватись у трофічному ланцюгу, що призводить до багатократного збільшення їх концентрації у тканинах живих організмів. Одними з найбільш небезпечних важких металів для біоти є свинець і кадмій, які володіють політропною дією. За умов інтоксикації свинцем та кадмієм, на шляхах їх транспорту, розподілу, клітинного метаболізму, біотрансформації, депонування та екскреції відбуваються молекулярні перебудови у процесах енергетичного та біосинтетичного обміну (Viard B., 2004).

Більше, ніж 95% кадмію, що надійшли в організм, зв'язується з еритроцитами, клітинами печінки, нирок та інших внутрішніх органів, а інша частина – з переносниками органічної природи (альбумін, продукти білкового катаболізму, хелатори типу глутатіону). Одним із найбільш поширених джерел кадмію гірничовидобувні галузі промисловості, що приводить до накопичення цього металу в місцях розташування даних об'єктів. (Deng H., 2004) В місцях накопичення кадмію висока імовірність його підвищення в овочах, а також у органах і тканинах сільськогосподарських тварин. Орієнтуючись на наукові дослідження виявлено, що концентрація кадмію на рівні 0,05моль/мг у розчинах ґрунту достатня для того, щоб більшість сільськогосподарських культур накопичували кадмій до рівня, що робить рослини небезпечними для споживання. Біоаккумуляція кадмію морськими організмами являє собою потенційну небезпеку для здоров'я людини. У метаболізмі кадмію в органах і тканинах тварин важливу роль відіграють металотіонеїни — низькомолекулярні білки, в яких третина амінокислот представлена цистеїном. Вони містять значну кількість сульф-гідрильних груп, причому внаслідок відсутності внутрішньомолекулярних SH-зв'язків, ці групи перебувають у вільній формі (Davis S. R., 2021) Найбільше

відрізняються в цьому молюски через свою виражену спорідненість до кадмію. Важливо відзначити, що токсичність кадмію залежить від вмісту інших металів в харчових продуктах, зокрема цинку та свинцю.

З іншого боку, сучасні новітні технології, пов'язані із використанням наночастинок на основі кадмію потребують детального дослідження шляхів рециркуляції цього металу і його накопичення в різних системах і органах рослин та тварин (Borovaya, M.N., 2014), (Borovaya M 2015), (P. Kumm, 2023). Найбільш уразливими компонентами щодо інтоксикації є клітини крові, білкові макромолекули а також метаболічні шляхи, пов'язані з екскрецією цього токсиканта – клітини шлунково-кишкового тракту, печінки, підшлункової залози та нирки. Незважаючи на способи отримання наночастинок кадмію (хімічний чи «зелений» синтез) небезпека від попадання в організм цього токсиканта залишається. Також важливим показником для визначення безпечності наночастинок залишаються найбільш уразливі клітини мішені, та можливість антиоксидантної системи виводить даний ксенобіотик з організму. Антиоксидантна система організму це комплекс ферментів та метаболітів, велика частка яких знаходиться в печінці, як метаболічній фабриці організму. Таким чином, вибір в якості клітин-мішеней гепатоцитів обумовлено саме такими якостями як метаболічні вивідні інтоксикаційні системи, які сприймають ксенобіотик і запускають його детоксикацію. Виходячи з актуальності щодо визначення безпечності наночастинок сульфід кадмію (CdS) мета та завдання полягали в наступному:

- Мета: провести порівняльне визначення токсичності наночастинок сульфід кадмію (CdS), отриманих «зеленим» та хімічним синтезом

Виходячи з мети завданнями роботи було:

1. В колориметричному МТТ-тесті визначити діапазон концентрацій цитотоксичної/цитостатичної дії наночастинок сульфід кадмію отриманих зеленим та хімічним синтезом відносно культивованих гепатоцитів лінії HepG2.

2. Провести порівняння активності каталази в лізатах клітин за впливу наночастинок кадмію отриманих зеленим та хімічним синтезом.
3. Дослідити рівень ТБК-активних компонентів та SH-груп білкових та небілкових в клітинах НерG2 за впливу наночастинок кадмію отриманих зеленим та хімічним синтезом

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1

1.1 Дослідження токсичності важких металів біологічними методами.

Хімічні забруднювачі стають глобальним, постійно діючим чинником. Серед хімічних речовин важкі метали та їх сполуки утворюють значну групу токсикантів, міграція яких здійснюється за умовною схемою: з джерел забруднення в ґрунт, донні відкладення, потім – у повітря, воду, продукти харчування, і зрештою – в організм людини. Підвищення концентрації важких металів в природних водах часто пов'язано з іншими видами забруднення, наприклад з окисленням. Випадання кислотних опадів сприяє зниженню рН і переходу металів з сорбованого стану на мінеральних і органічних речовинах у вільний стан.

Комбінована дія на організм важких металів як екопатогенного фактору зовнішнього середовища привертає все більшу увагу дослідників. Успішно вивчаються біомаркери експозиції металів у крові, сечі, волоссі, нігтях, жіночому молоці. Найбільш детально досліджується кров – індикатор найшвидшого впливу цих ксенобіотиків на організм, що найбільш досконало характеризує внутрішнє забруднення організму металами. Під їх впливом змінюються формені елементи крові за рахунок мембрано-токсичної дії важких металів; зміна активності мембрано-зв'язаних і цитозольних ферментів призводить до порушення вуглеводного, білкового, ліпідного, кислотно-лужного і водно-сольового обмінів. Хронічна дія хімічних факторів, зокрема солей важких металів, як правило, супроводжується морфо-функціональними змінами у крові.

1.2 Важкі метали, їх поширеність і вплив на організм

Стан навколишнього середовища невпинно погіршується, що негативно впливає на здоров'я людини. Більше половини випадків захворювань, затримок розвитку та смертей пов'язані з екологічним забрудненням. Забруднення довкілля стало глобальною проблемою, ускладненою багатокomпонентним накопиченням екотоксикантів у харчових ланцюгах. Особливу небезпеку становлять важкі метали, які не розкладаються та мають здатність накопичуватись.

Основними джерелами важких металів є підприємства хімічної, металургійної, гірничодобувної промисловості, виробництво нафтопродуктів, будматеріалів, лікарських засобів, а також спалювання бензину. Значну частину важких металів містять добрива, особливо фосфати. Вміст важких металів у ґрунті, воді й повітрі змінюється залежно від географічних умов. У ґрунтах вони існують у різних формах: водорозчинній, іонообмінній, адсорбованій або включені в мінерали. Їх міграція обмежується властивостями ґрунту, що утримує позитивно заряджені іони металів. Підвищена кислотність ґрунтів сприяє мобільності важких металів. Ґрунт є бар'єром на шляху до рослин, однак при тривалому забрудненні метали можуть накопичуватись у врожаї, особливо в зерні та плодах.

Важкі метали становлять особливу загрозу для молодих рослин, адже вже на ранніх стадіях розвитку вони активно поглинаються з ґрунту. Свинець переважно накопичується в кореневій системі, тоді як кадмій проникає як у корені, так і в надземну частину. Навіть рослини, вирощені на слабо забруднених ґрунтах, можуть накопичувати токсичні метали у своїй біомасі, що згодом спричиняє потрапляння цих елементів у тварин і людей через продукти харчування. У водойми важкі метали надходять з атмосферними опадами, промисловими стоками та при використанні мінеральних добрив. Водні рослини здатні тривалий час зберігати ці речовини у своїх тканинах, сприяючи їх переносу у водні трофічні ланцюги.

У повітря кадмій і свинець потрапляють при спалюванні вугілля, нафти, газу на теплоелектростанціях, а також внаслідок викидів промислових підприємств. Вони легко проникають в організм людини та тварин через дихальні шляхи, шкіру та слизові оболонки. У крові ці метали утворюють міцні комплекси з амінокислотами та білками, що дозволяє їм тривалий час циркулювати та депонуватися в різних органах. Найбільші концентрації ВМ виявляються у печінці, нирках та ендокринних залозах. Їх накопичення обумовлене дією білків металотіонеїнів, які мають здатність зв'язувати іони металів і концентрувати їх у клітинах.

Основний механізм токсичності важких металів полягає в їх здатності порушувати функціонування ферментних систем, блокуючи активні центри білкових молекул та замінюючи біометали у металовмісних біокомплексах. Це призводить до втрати біологічної активності ферментів та порушення обмінних процесів в організмі [14, 12].

1.3 Токсикологія кадмію

Кадмій (Cd) — один із найнебезпечніших токсикантів довкілля, назва якого в англійській літературі асоціюється з раком (cancer disease). Це сріблястий метал, схожий за властивостями на цинк, з яким часто зустрічається в природі, замінюючи його в ферментах і порушуючи обмінні процеси. У природному середовищі кадмій трапляється в малих кількостях, переважно у формі гринокіту (CdS) і отавіту (CdCO₃), разом із цинковими рудами. Забруднення кадмієм зростає внаслідок промислової діяльності: викидів металургії, виробництва барвників, добрив, спалювання відходів. Основним джерелом надходження кадмію є побічні продукти очищення цинку.

Основним джерелом потрапляння кадмію в харчові ланцюги є промислові викиди, яких щороку в атмосферу надходить близько 20 тонн. У промислових районах його концентрація часто в десятки чи сотні разів перевищує норму. Абсорбція кадмію залежить від шляху надходження: у шлунково-кишковому

тракті всмоктується лише близько 5%, тоді як через легені — до 90%. Поглинання кадмію посилюють анемія, нестача кальцію чи заліза, а знижують — споживання молока, цинку та жовчних кислот.

Після потрапляння в кров кадмій швидко зв'язується з еритроцитами та альбуміном, накопичується в печінці й нирках. Виводиться дуже повільно — період напіввиведення досягає 25–30 років. Основний шлях екскреції — через сечу (до 2 мкг/добу), також з фекаліями, потом і молоком. У нирках кадмій ушкоджує проксимальні каналці, порушуючи зворотне всмоктування білків і мінералів, що призводить до порушень обміну речовин. Інтоксикація викликає білок у сечі, зміни у тканинах нирок, а згодом — зниження чи припинення сечовиділення.

Сполуки кадмію належать до другого класу небезпеки й є високотоксичними для тварин. ЛД₅₀ кадмію хлориду становить 366,8 мг/кг для щурів, 117,3 — для кроликів, і 32,0 — для овець. Кадмій ушкоджує клітинні мембрани, порушує іонний баланс, ендокринну функцію, дихання в мітохондріях, має високу кумулятивність, загальну токсичність і канцерогенність. Він викликає гіпертонію, порушує білковий і залізний обмін, пригнічує синтез нуклеїнових білків і травних ферментів, знижує артеріальний тиск і впливає на серцево-судинну систему.

Кадмій також порушує діяльність макрофагів, викликає склероз дрібних артерій, активує ферменти гліколізу, знижує рівень глікогену. Його нейротоксичність зумовлена здатністю проникати через гематоенцефалічний бар'єр і накопичуватись у мозку, спричиняючи некроз нервових клітин і демієлінізацію. Гостре отруєння можливе при високих дозах кадмію через вдихання чи їжу. Хронічна дія найсильніше вражає легені (при інгаляції) і нирки (при будь-якому способі надходження в організм).

РОЗДІЛ 2

2.1 Шляхи потрапляння кадмію в довкілля

Кадмій — токсичний елемент, небезпечний навіть у низьких концентраціях, основна загроза якого пов'язана з техногенним забрудненням довкілля. Через інтенсивну антропогенну діяльність важкі метали все більше потрапляють у природні екосистеми, перевищуючи природний рівень їх надходження. Це спричиняє їх швидке поширення в міському середовищі та негативний вплив на здоров'я людей. Щороку зростають об'єми техногенних забруднювачів, що порушують екологічну рівновагу. Вплив людини на природу вже перевищує її здатність до самовідновлення, особливо в регіональному масштабі. Хоча зупинити технічний прогрес неможливо, потрібно мінімізувати шкоду. Основними джерелами важких металів є великі індустріальні міста (Гулько С. 2021).

Кадмій потрапляє в екосистеми через промислові викиди, стічні води, теплоелектростанції, металургійні заводи, видобуток руд, спалювання нафти й відходів, виробництво цементу, скла, добрив, а також із фосфорними добривами, вапняковими матеріалами та викидами транспорту. Найбільше забруднення спостерігається поблизу підприємств чорної й кольорової металургії, де кадмій поширюється на десятки кілометрів. Близько 10–30 % викидів Cd можуть переноситися на понад 10 км від джерела. Це спричиняє комбіноване забруднення рослин через осідання пилу й аерозолів на листя та поглинання металів коренями із ґрунтів, забруднених атмосферними викидами (Гулько С. 2021).

Суттєве забруднення біосфери відбувається внаслідок викидів автотранспорту. Автомобіль є джерелом надходження трьох видів викидів забруднюючих речовин: картерні гази, відпрацьовані гази, паливні випаровування. Найбільш об'ємними із них являються відпрацьовані гази, основними токсичними компонентами яких є оксид карбону, оксиди нітрогену,

діоксид сірки, сажа, сполуки важких металів (Cd, Pb – та інші при етилованому бензині), поліциклічні ароматичні вуглеводні, бенз(а)пірен (Гуцько С. 2021).

Фосфатні добрива є важливим джерелом дифузного забруднення кадмієм, особливо в сільському господарстві. В Австралії підвищений вміст Cd у ґрунтах пов'язаний із тривалим використанням таких добрив. Останнім часом виробники знизили вміст кадмію, перейшовши на сировину з меншою його концентрацією. У США Агентство з охорони довкілля встановило норму для цинкових мікродобрив із перероблених відходів: не більше 1,4 мг Cd на 1% цинку (Гуцько С. (2021).

Окрім фосфорних добрив, дорожнього пилу та спаленого палива, основними джерелами надходження кадмію є кольорова металургія та звалища. Металургійні підприємства щороку викидають близько 5 тис. тонн Cd, спалювання сміття — 1,5 тис. тонн, а добрива і деревина — до 0,2 тис. тонн. На відміну від цього, природа щорічно виділяє значно менше кадмію — до 0,52 тис. тонн із вулканів і 0,2 тис. тонн із рослин.

Рівень забруднення варіює залежно від регіону: Північна Америка — 7,36 тис. т/рік, Азія — 2,58, Європа — 1,59, Африка — 1,2, Австралія — 0,22. Хоча кадмій не є необхідним для організму, рослини активно його поглинають. Найбільшу небезпеку становлять розчинні сполуки Cd, які за токсичністю не поступаються ртуті та миш'яку (Мислива Т., 2012).

2.2 Біомагніфікація кадмію

Біомагніфікація кадмію — це процес накопичення цього токсичного металу в живих організмах у концентраціях, що перевищують його рівень у середовищі. Кадмій надходить у ґрунт і воду, звідки поглинається рослинами через коріння і листя, накопичуючись у їхніх тканинах. При вживанні таких рослин тваринами або людьми кадмій потрапляє в організм і накопичується переважно в печінці, нирках та кістках. Він не є життєво необхідним для

рослин, але легко засвоюється ними в розчиненому вигляді, зокрема грибами і водними організмами.

Надлишок кадмію в рослинах гальмує фотосинтез, активність ферментів, викликає хлороз і пошкодження кореневої системи, а також порушує засвоєння поживних елементів. За токсичністю і здатністю накопичуватись у рослинах кадмій перевищує інші важкі метали ($Cd > Cu > Zn > Pb$). Його біонакопичення небезпечно для екосистем та здоров'я людини, адже споживання забруднених рослин є основним шляхом потрапляння кадмію в організм. Навіть адаптовані до кадмію види рослин становлять ризик, оскільки здатні переносити метал у харчовий ланцюг.

2.3 Накопичення кадмію в навколишньому середовищі.

Серед токсичних мікроелементів у водному середовищі особливо небезпечними є кадмій і хром, які навіть у мікродозах порушують функціонування водних екосистем. Кадмій, що займає 67-ме місце за поширенням на Землі, тривалий час недооцінювався як екологічна загроза для гідросфери.

У водне середовище він переходить з такими мінеральними сполуками, як CdO , CdS , $CdCl_2 \cdot H_2O$, $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ та деякі інші. Важливим джерелом забруднення водних об'єктів є сульфідні руди та стічні води підприємств кольорової металургії та хімічних заводів. Вже в мікродозах кадмій виявляє високу токсичність.

Середня концентрація кадмію в морській воді становить $0,11 \text{ мкг/дм}^3$, а в прісних водоймах України — від $0,30$ до $10,40 \text{ мкг/дм}^3$. У донних ґрунтах дніпровських водосховищ його вміст сягає $0,6\text{--}3,9 \text{ мг/кг}$ сухої маси. Кадмій є токсичним для гідробіонтів, пригнічує фотосинтез у водяних рослин при $0,02\text{--}1,00 \text{ мкг/дм}^3$, а в концентрації 1 мкг/дм^3 спричиняє явні негативні ефекти. За 72 години при $0,003\text{--}0,5 \text{ мг/дм}^3$ гине до 50 % прісноводних безхребетних, а у риб знижується ферментативна активність при 4 мкг/дм^3 . Токсичність кадмію

зменшується при утворенні комплексів з органічними речовинами, як-от гумінові й фульвокислоти [1].

Для кадмію характерне концентрування в гідротермальних відкладеннях, міграція в гарячих підземних водах разом з цинком і іншими халькофільними елементами. Вулканічні породи містять до 0,2 мг/кг кадмію, серед осадових порід найбільш багаті кадмієм глини – до 0,3 мг/кг, вапняки містять 0,035 мг/кг, піщані ґрунти – 0,03 мг/кг. Середній вміст кадмію в ґрунті – 0,06 мг/кг. Відомі самостійні мінерали кадмію – гринокіт (CdS), отавів (CdCO₃), монтепоніт (CdO) і селенід (CdSe), але своїх родовищ вони не утворюють, а присутні у вигляді домішок у цинкових, плюмбових, купрумних і поліметалічних рудах, які і є основним джерелом його промислового видобутку (Гуцько С. 2021).

Джерела кадмію поділяються на природні (вивітрювання порід, ерозія, вулкани) і техногенні (металургія, транспорт, добрива, відходи). У природі його вміст у породах не перевищує 0,3 мг/кг, а в ґрунтах України — 0,3–0,8 мг/кг. Найвищі концентрації спостерігаються в піщаних і супіщаних моренах. Рухомі форми кадмію в ґрунтах Лісостепу й Степу становлять у середньому 0,12 мг/кг. Хоча кадмій не є необхідним для рослин, він активно поглинається і може спричинити пошкодження клітин, пригнічення ферментів і білкового обміну. У тварин надлишок кадмію викликає зниження апетиту, уповільнення росту та зменшення продуктивності.

Кадмій надходить до атмосфери з промисловими викидами, а потім осідає на ґрунт, де накопичується надовго, зокрема через добрива, особливо суперфосфат. До 70 % його сполук зв'язується з ґрунтовими комплексами і стає недоступним для рослин. Фітотоксичність кадмію проявляється в пригніченні фотосинтезу, порушенні транспірації та мембранної проникності. У забруднених зонах вміст кадмію в рослинах може перевищувати фоновий рівень у 20–30 разів [21].

2.4 Шляхи надходження кадмію в організм людини.

Кадмій надходить в організм людини і тварин переважно трьома шляхами: через травну систему, органи дихання та шкіру. Його токсичність залежить від форми сполуки, розчинності, супутніх речовин, а також від віку, статі й стану організму — зокрема, жінки, особливо під час вагітності, накопичують кадмій ефективніше.

За даними ВООЗ, USEPA добове надходження кадмію з усіх джерел становить 10–50 мкг, з їжею — 10–40 мкг. Кадмій накопичується в рослинах і тваринах, зокрема в грибах і водних організмах, потрапляючи в організм через харчовий ланцюг. Продукти, як-от овочі, фрукти, м'ясо й риба, містять 10–20 мкг/кг кадмію, а соєвий сир тофу може підвищити його вміст на 22 %. Зернові з забруднених ґрунтів містять понад 25 мкг/кг.

Кадмій накопичується у великих кількостях у нирках (100–1000 мкг/кг) і печінці (10–100 мкг/кг) тварин, а також у молюсках, зокрема в устрицях (200–1000 мкг/кг), що живляться фітопланктоном. Устриці можуть містити 13–26 мкг Cd/г сухої маси, а насіння соняшника — 0,2–2,5 мкг/г, тютюн — до 1,0 мкг/г. Значну дозу кадмію отримують курці: одна сигарета містить 1–2 мкг, а через легені всмоктується 10–20 % Cd, що вдвічі більше, ніж через шлунково-кишковий тракт.

2.5 Наноматеріали та наночастинки на основі кадмію

Наноматеріали та наночастинки, створені завдяки сучасним нанотехнологіям, мають унікальні властивості й широкі можливості для промислового використання. Однак їх застосування пов'язане з потенційними ризиками для здоров'я людини, тварин, рослин і біоценозів. Зі зростанням виробництва таких матеріалів активізуються дослідження їхньої біологічної дії, хоча механізми впливу, зокрема металевих наночастинок, досі повністю не

з'ясовані. Більшість досліджень виконані нестандартизованими методами, що ускладнює порівняння результатів (Klien K, 2012).

Оцінка токсичності наноматеріалів є важливою частиною аналізу ризиків, оскільки їхні фізичні, хімічні й біологічні властивості суттєво відрізняються від аналогічних речовин у більших формах. Основну роль відіграє високе співвідношення площі поверхні до об'єму, що надає наночастинкам унікальні властивості. Через малий розмір вони можуть уникати захисних механізмів організму, не зазнавати біотрансформації та довго залишатися в тканинах. Потрапляючи в клітини, наночастинки можуть пошкоджувати мембрани, генетичний матеріал і органели, спричиняючи клітинну загибель. Їх вплив залежить не лише від розміру, а й від способу проникнення, тривалості дії та хімічного складу (Kwon J.Y, 2014).

Саме, враховуючи таку особливість, слід відзначати принципову нестаціонарність та негомогенність інтерфейсу “нано-біо”, яка обумовлюється складною структурою білково-вуглеводно-ліпідного матриксу мембрани та мінливим (через клітинну секрецію й потоки тканинних рідин) складом середовища, що оточує наночастинку. Ці зміни можуть спричинити модифікацію властивостей поверхні наночастинки, а наночастинка, в свою чергу, може вплинути на хімічний склад середовища, частково розчиняючись в ньому або каталізуючи різні окисні процеси і генерацію активних форм кисню.

На токсичність та біологічну активність наноматеріалів також можуть впливати компоненти синтезу: розчинники (водні, неводні, неполярні), відновники неорганічні (гідразин, боргідрид натрію) або органічні (формальдегід, глюкоза, цитрати та ін.), стабілізатори природні (желатин, крохмаль, агар-агар та ін.) або синтетичні (полімери та поверхнево-активні речовини) (Гуцько С. 2021).

2.6 Практичне застосування методів біоремедіації

Рослини і гриби дійсно здатні проявляти біоремедіацію. Біоремедіація, або біоремедіація, — це природний процес очищення довкілля, при якому організми — в тому числі рослини та гриби — використовуються для знешкодження, трансформації або видалення токсичних речовин, таких як важкі метали, з ґрунту, води або повітря.

До агентів біоремедіації належать мікроорганізми (бактерії), гриби та вищі рослини. Вони мають здатність накопичувати, фіксувати або трансформувати забруднювачі в менш токсичні форми. Це досягається за рахунок біохімічної активності їх ферментів, утворення органічних кислот, зміни рН середовища та виділення метаболітів, здатних до комплексоутворення з металами. Наприклад, кореневі системи рослин можуть акумулювати важкі метали, після чого ці елементи зв'язуються в клітинних структурах і виводяться з кола біодоступності [28].

Можливе використання грибів для біосинтезу наночастинок кадмію (CdTe-квантових точок) було використано базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus*. Цей гриб не лише брав участь у формуванні наночастинок, а й виконував функцію біологічної стабілізації — регулював розмір, морфологію і поверхневу хімію утворених частинок. Таким чином, гриб виконує роль біологічного медіатора у формуванні функціональних наноматеріалів, що знижують токсичність кадмію завдяки контрольованому вивільненню іонів металу та наявності біополімерного покриття на їх поверхні [26]

Як рослини, так і гриби активно використовуються в процесах біоремедіації. Рослини здатні поглинати важкі метали з навколишнього середовища, трансформувати їх у безпечніші сполуки або накопичувати в нетоксичних формах. Гриби, у свою чергу, можуть не лише акумулювати метали, а й бути потужним інструментом у біосинтезі нових матеріалів, у тому числі наночастинок, регулюючи їхні токсикологічні властивості. Ці організми є

важливими біоінструментами для очищення середовища та розробки екологічно безпечних технологій.

2.7 Методи зеленого синтезу кадмію

У дисертаційній роботі (Борова М) на тему «Зелений синтез флуоресцентних квантових точок CdS та характеристика їх властивостей» розкрито широкий спектр біологічних систем, застосованих для формування кадмієвих наночастинок за принципами «зеленого синтезу». Такий підхід ґрунтується на використанні живих організмів або продуктів їхньої життєдіяльності як джерела відновників і стабілізаторів. Це дозволяє уникнути застосування токсичних реагентів, високих температур і агресивних хімічних умов, що робить процес більш безпечним для довкілля.

Серед використаних моделей ключову роль відіграли бактерії, гриби, клітини рослин та трансформовані кореневі культури. Зокрема, значний синтетичний потенціал продемонструвала бактерія *Escherichia coli*, яка забезпечила екстрацелюлярний синтез квантових точок CdS безпосередньо у культуральному середовищі. Це значно полегшило подальше очищення та концентрування наночастинок. Отримані частинки були сферичної форми (діаметр 5–10 нм), стабільно світили при 443 нм і зберігали свої оптичні властивості протягом щонайменше трьох місяців, що робить їх перспективними флуоресцентними зондами.

Також досліджувався базидіальний гриб *Pleurotus ostreatus*, який функціонував як джерело ферментів і природних макромолекул, що відіграють роль відновників і стабілізаторів. Наночастинки, отримані за допомогою цього гриба, мали менші розміри (3,5–5,5 нм), стабільну люмінесценцію та відзначалися найнижчою токсичністю щодо клітин людини та модельних організмів (наприклад, *Drosophila melanogaster*), що пояснюється наявністю природного біополімерного покриття.

У ще одному напрямку було використано трансформовані корені *Linaria maroccana*. У цій рослинній системі вдалося отримати наночастинки з різними люмінесцентними максимумами (425, 462 і 500 нм), що свідчить про різноманітність розмірів. Частинок виявили високу біосумісність і не мали поверхневих дефектів, що підтверджено методом електронної мікроскопії (розмір — 5–7 нм).

Окрему увагу приділено суспензійній культурі клітин тютюну *Nicotiana tabacum* (BY-2) — широко використовуваній системі для вивчення фізіології рослин. У цій моделі були синтезовані найменші квантові точки CdS (3–4 нм), з люмінесценцією на довжині хвилі 381 нм. Завдяки такому розміру ці частинки мають високий потенціал для флуоресцентного маркування живих клітин.

Усі представлені біологічні моделі забезпечили м'який, екологічно безпечний синтез, який супроводжується формуванням стабільних, біосумісних наночастинок із природним покриттям. Такі частинки мають тривалі терміни зберігання, зберігають люмінесцентні властивості та придатні до біокон'югації з макромолекулами (білками, ДНК, антитілами), що відкриває широкі можливості для їхнього застосування у біомедичних технологіях. Дослідження підтверджує ефективність біологічних моделей як інструментів для створення безпечних і функціональних наноматеріалів нового покоління.

РОЗДІЛ 3

3.1 Потенційна небезпека кадмію для здоров'я людини.

Кадмій – один з найбільш токсичних важких металів згідно розподілу хімічних елементів за класами небезпеки (ГОСТ 17.4.1.02 – 83), він віднесений до I класу небезпеки. Деякі джерела називають Cd «найбільш небезпечним екотоксикантом на рубежі тисячоліть». З огляду на причини зв'язку між діяльністю людини та рівнем дії на неї екотоксикантів, що містяться у навколишньому середовищі, найбільшу сучасну наукову зацікавленість саме для наших досліджень представляє такий аспект – людська діяльність змінює навколишнє середовище, продукує та виділяє в неї 37 поллютанти, і, як наслідок, всі зміни в навколишньому середовищі або біоті можуть діяти прямо або опосередковано на фізичне, економічне або естетичне благополуччя людини [Гуцько С. 2021).

Близько 50% абсорбованого Кадмію накопичується в печінці та нирках. При отруєнні сполуками кадмію відзначається жирова інфільтрація печінки і нирок, в печінці — дистрофія гепатоцитів. При хронічному отруєнні бувають гіпертрофія серця, у паренхіматозних органах — ділянки некрозу і проростання в них сполучної тканини, гіперплазія селезінки, у нирках зміни в тканинах приводять до порушення реабсорбції білків, глюкози, амінокислот. Хронічний вплив хлориду кадмію порушує обмін ліпідів та процеси окислення в організмі. Порушується стан крові – знижується рівень гемоглобіну, збільшується кількість активних форм кисню, які здатні пошкодити клітини. Відомо, що кадмій, як і інші важкі метали, надійшовши в організм тварин та людини з їжею, знижують моторну та секреторну функцію шлунково- кишкового тракту, активність ферментів, тим самим негативно впливають на перетравність й всмоктування поживних речовин (19).

Кадмій в організмі людини зв'язується з білком металотіонеїном, що знижує його токсичність, але не усуває небезпеки. Навіть у зв'язаному вигляді Cd накопичується й може спричиняти порушення роботи нирок та утворення каменів. Частина кадмію залишається в іонній формі, що особливо токсично. Через схожість із цинком, кальцієм і залізом він здатен заміщувати ці елементи в біохімічних процесах, що посилює його всмоктування за їх дефіциту. Організм не має механізмів гомеостатичного контролю кадмію, а його період напіввиведення становить близько 25 років.

Класичний приклад хронічного отруєння — хвороба «ітай-ітай» в Японії, спричинена споживанням кадмійзабрудненого рису, яка призводила до ураження нирок і ламкості кісток. Cd прискорює старіння, знижує рівень кальцію й підвищує ризик остеопорозу. При концентрації в сечі понад 1 мкг/г у жінок старше 50 років ризик остеопорозу зростає на 43 %. Також підвищується ризик діабету 2 типу. Гостре отруєння кадмієм через їжу або воду супроводжується симптомами гастроентериту, а смертельна доза становить орієнтовно 350–3500 мг. Вдихання кадмію (на виробництві) викликає головний біль, нудоту, набряк легень і може призвести до смерті. Організм засвоює Cd через ті ж механізми, що й цинк або залізо, тому їх нестача сприяє накопиченню кадмію.

До дії солей кадмію організм чутливий протягом всього життя починаючи з внутрішньоутробного періоду, а особливо в період росту та статевого дозрівання та вагітності. Встановлено, що у плаценті концентрація Кадмію вища у 10 разів, ніж у материнській крові та у 59 раз, ніж в пуповинній (21).

Кадмій, як і інші важкі метали практично не виводиться з організму. Позбутись вже накопиченого в організмі металу в домашніх умовах неможливо. Період напіввиведення кадмію з кісток становить приблизно 30 років.

Кадмій має канцерогенну дію: індукує мутації, ушкоджує ДНК, активує апоптоз. Його токсичність проявляється навіть у низьких концентраціях. Наночастинки CdTe, синтезовані зеленим методом, викликають гемоліз уже при 5 мкМ, ушкоджуючи мембрани еритроцитів через вивільнення іонів Cd та

окисний стрес. Вони також змінюють позаклітинний матрикс, знижують бар'єрну функцію мембран, що спричиняє вихід гемоглобіну й швидкий розвиток гемолізу.

У випадку дії неорганічного кадмію, зокрема сульфату кадмію, механізм токсичності має дещо інший характер. Іони кадмію активують процеси перекисного окислення ліпідів мембран, пригнічують антиоксидантні системи еритроцитів, змінюють проникність мембран для іонів і викликають внутрішньоклітинний іонний дисбаланс. Підвищення рівня кальцію та порушення функцій тіоловмісних ферментів, таких як Ca^{2+} -АТФаза, призводять до додаткового навантаження на клітину і порушення її гомеостазу.

За результатами оцінки стійкості еритроцитів щурів до кислотного гемолізу було встановлено, що під впливом сульфату кадмію знижується час досягнення максимуму гемолізу, загальна тривалість процесу, а також індекс стійкості клітин. Однак ериторограми при дії кадмію не демонструють таких виражених змін, як при дії ртуті або свинцю, що свідчить про дещо нижчу інтенсивність дії. Попри це, навіть у низьких концентраціях кадмію спричиняє поступове руйнування мембран і скорочення тривалості життя еритроцитів.

Кадмію у формі квантових точок діє швидко, гостро і викликає миттєвий гемоліз, тоді як неорганічний кадмію викликає більш поступові зміни, пов'язані з окислювальним стресом, змінами білкових структур і накопиченням іонів усередині клітини. Обидві форми є небезпечними, але різняться за ступенем, швидкістю та характером ушкодження клітин еритроцитарного ряду.

РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

4.1 Матеріали та обладнання, що використані в експерименті.

Для реалізації поставлених завдань у дослідженні було використано наступні матеріали, реактиви та обладнання:

Центрифуга та центрифужні пробірки – застосовувалися для осадження клітин та відділення надосадової рідини.

Камера Горяєва – використовувалась для підрахунку життєздатних та мертвих клітин з використанням відповідного барвника.

Спектрофотометр СФ-46 – слугував для вимірювання оптичної щільності при проведенні колориметричних аналізів, зокрема МТТ-тесту.

Розчин фікол-верографіну ($\rho = 1,077$ г/мл) – використовувався для градієнтного центрифугування з метою виділення лімфоцитів із крові.

Фосфатно-сольовий буфер (рН 7,4) складу: KH_2PO_4 – 1,5 мМ, Na_2HPO_4 – 8,1 мМ, KCl – 2,7 мМ, NaCl – 140 мМ – використовувався як середовище для центрифугування та обробки клітин.

Культивувальне середовище RPMI-1640 (Sigma, США), з додаванням гентаміцину (40 мкг/мл) – для підтримання росту та проліферації клітин *in vitro*.

Кріозахисне середовище: 20% диметилсульфоксиду (Serva, Німеччина), 30% ЕТС (Sigma, США) та 50% RPMI – використовувалося для заморожування клітин та їх зберігання у рідкому азоті.

Розчин трипанового синього (0,2%) – застосовувався для диференціації живих та мертвих клітин при підрахунку у камері Горяєва.

МТТ-реактив (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолієвий бромід, Sigma, США; концентрація 5 мг/мл у фосфатно-сольовому буфері, рН 7,4) – використовувався для забарвлення метаболічно активних клітин у МТТ-тесті.

Диметилсульфоксид (DMSO) (Serva, Німеччина) – для розчинення кристалів формазану, утворених у результаті МТТ-реакції.

Стерильний лабораторний пластик (“Nunclon”, Данія): 96-лункові та 6-лункові планшети, флакони об’ємом 25 см², а також чашки Петрі діаметром 6 і 10 см – використовувалися для культивування клітин та проведення біотестів.

4.2 Клітини та матеріали

Визначення метаболічної та цитостатичної активності різних класів біологічно активних сполук, що можуть застосовуватись у ветеринарії та біомедичних дослідженнях, відбувається поетапно, зокрема із залученням панелей культивованих клітин. Одним із альтернативних підходів до скринінгу метаболічної активності є використання клітин гепатоцитарного походження, які містять маркери диференціювання зрілих гепатоцитів. Зокрема, широко застосовується клітинна лінія НерG2 (гепатокарцинома людини) (рис. 3.1)

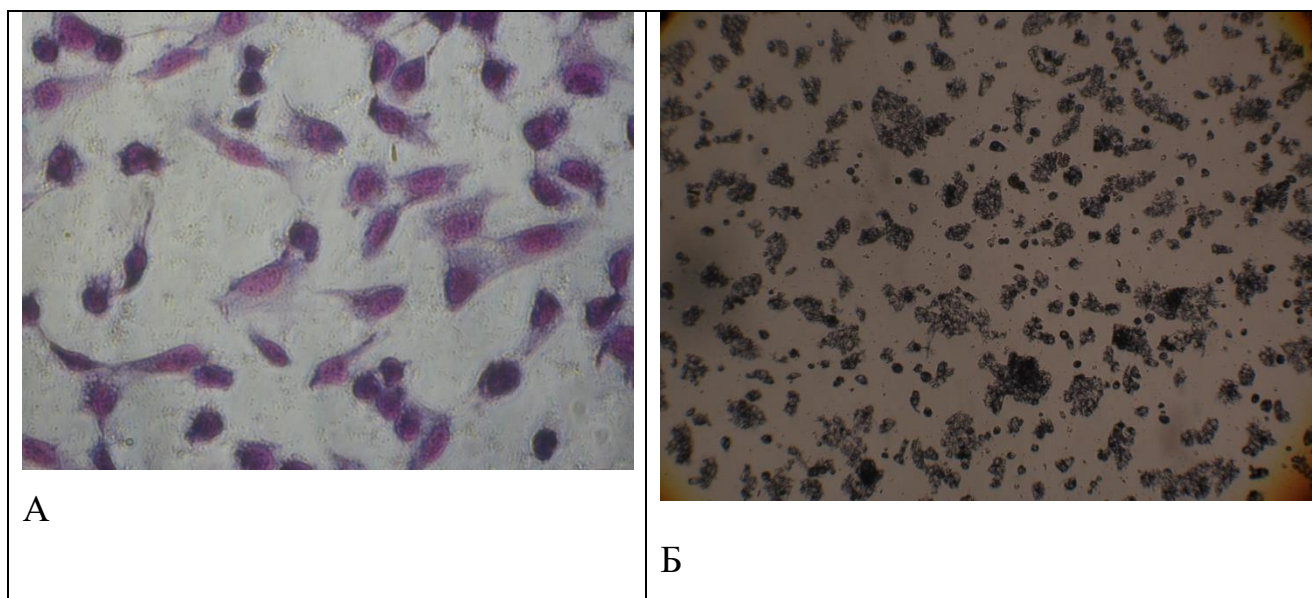


Рис. 3.1. Клітини лінії НерG2 (50% моношар)-А; МТТ-тест

Серед альтернативних методів досліджень важливе місце займають клітинні лінії, що є мішенями функціональної активності відповідних органів. Клітини НерG2 добре підходять для моделювання поляризованих гепатоцитів людини в системах *in vitro*, що дозволяє досліджувати внутрішньоклітинні обмінні процеси, а також динаміку мембранних білків і ліпідів жовчних каналців і синусоїдів.

Ця клітинна лінія характеризується необмеженим терміном культивування, високим рівнем проліферації, стабільним фенотипом, доступністю та простотою у використанні. HepG2 було отримано з біоптату печінки 15-річного хлопця європеїдної раси з діагностованою диференційованою гепатоцелюлярною карциномою. Ця культура є незамінною у вивченні функцій печінки, оскільки зберігає багато її диференційованих функцій: синтез і секреція плазмових білків, метаболізм холестерину та тригліцеридів, транспорт і обмін ліпопротеїнів, синтез жовчних кислот, утворення глікогену та інсулінова сигналізація.

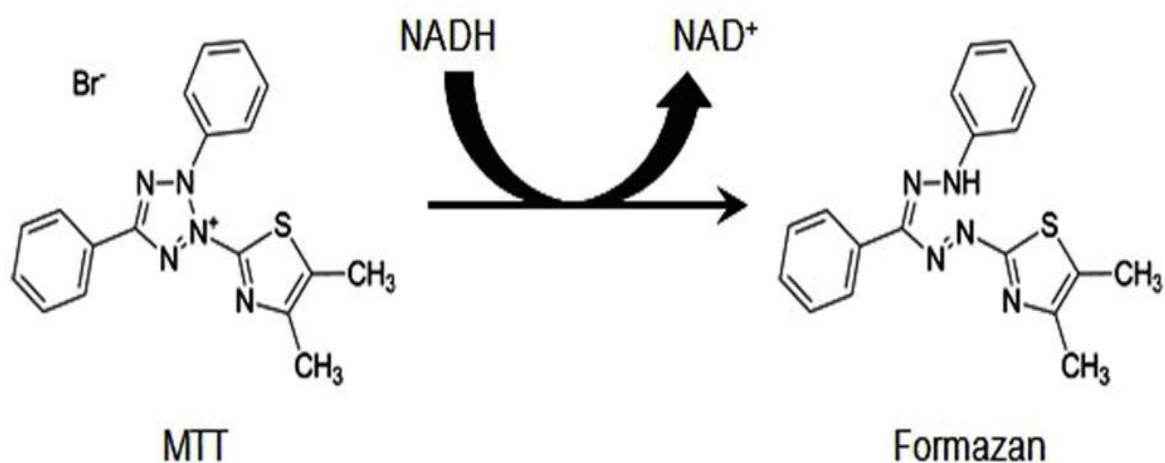
У межах експериментів клітинна лінія HepG2 використовувалася як модель для оцінки стану систем детоксикації, активності ферментів — гамма-глутамілтрансферази, аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, а також лактатдегідрогенази (загального пулу та ізоферменту ЛДГ-1). Ця модель включена до міжнародних протоколів, які регламентують альтернативні методи дослідження метаболічних порушень у клітинах з ознаками гепатоцитарної диференціації.

Наночастинки CdS були люб'язно надані Ємець Аллою Іванівною — член-кореспондентом НАН України, доктором біологічних наук, професором, завідувачкою відділу клітинної біології і біотехнології Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України — в межах реалізації спільних наукових проєктів.

4.3 МТТ- колориметричний тест

Оцінка виживання та цитоактивності гепатоцитів у системі *in vitro* проводилась за допомогою колориметричного тесту. Принцип методу полягає у використанні здатності мітохондріальних ферментів відновлювати розчинену в фізіологічному розчині сіль жовтого кольору 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ, Sigma) до утворення кристалічного МТТ-

формазау лілового кольору. Крім того, цей метод може бути використаний для аналізу клітинної проліферації та оцінки цитотоксичності.



Метод МТТ-тесту ґрунтується на здатності мітохондріальних дегідрогеназ життєздатних клітин розщеплювати тетразолієві кільця з утворенням нерозчинних у воді фіолетових кристалів формазау. Інтенсивність цього процесу та ступінь забарвлення прямо корелюють із рівнем внутрішньоклітинних відновників — NADH і NADPH, концентрація яких, у свою чергу, залежить від рівня позаклітинної глюкози.

Ключову роль у відновленні МТТ відіграють ферменти мітохондріального дихального ланцюга — сукцинатдегідрогеназа та цитохром С. Їх можна розглядати як регулятори інтенсивності дихальних процесів, які безпосередньо впливають на швидкість відновлення МТТ і, відповідно, на рівень формування формазау.

За чотири години до завершення інкубації клітин з наночастинками CdS до культурального середовища додавали 20 мкл розчину МТТ, доводячи кінцеву концентрацію до 0,6 мМ. Після завершення інкубації кристали формазау, що утворилися всередині клітин, розчиняли у 100 мкл диметилсульфоксиду. Оптичну щільність визначали фотометрично при довжині хвилі 540 нм.

Для визначення співвідношення живих і мертвих клітин з кожної лунки планшетки відбирали по дві проби, які аналізували за допомогою камери Горяєва та вітального барвника. Отримані дані усереднювали. Далі до клітинної суспензії додавали 0,4% розчин трипанового синього, витримували 5 хвилин, після чого проводили підрахунок клітин у п'яти великих квадратах камери. За результатами обчислювали середнє значення та визначали концентрацію клітин у 1 мл, враховуючи ступінь розведення суспензії та тривалість інкубації.

4.4 Визначення каталазної активності

Активність каталази в клітинах визначали за методом, описаним Королюком і співавторами. Оцінювання каталазної активності ґрунтувалося на порівнянні концентрації пероксиду водню (H_2O_2) у зразку до початку реакції та після її завершення. Для цього готували два типи проб: контрольну (нульову) та дослідну. Клітинний лізат отримували шляхом гомогенізації у фізіологічному розчині (буфер Хенкса або 0,05 М трис-НСl, рН 7,8) у співвідношенні 1:3. До 25 мкл білкового екстракту (що містив 0,025 мг білка) додавали 0,5 мл реакційного буферу, який містив 0,03% розчин H_2O_2 , і витримували 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 4% розчину амоній молібдату ($(NH_4)_2Mo_7O_{24}$). Контрольну пробу готували аналогічно, але замість білкового екстракту додавали 25 мкл дистильованої води. Після інкубації протягом 10 хвилин при кімнатній температурі реакцію також зупиняли додаванням 0,5 мл 4% розчину амоній молібдату.

Інтенсивність утвореного забарвлення вимірювали за допомогою мікропланшетного фотометра (BioTek, США) при довжині хвилі 410 нм відносно контрольної (нульової) проб

4.5 Визначення ТБК-активних компонентів

Визначення концентрації ТБК-активних продуктів проводили за методом І. Д. Стальної та Т. Г. Гарішвілі (1977), що базується на утворенні кольорового комплексу з 2-тіобарбітуровою кислотою. Попередньо зразки гомогенізували у фізіологічному розчині. До кожної пробірки додавали по 400 мкл 20% розчину трихлороцтової кислоти, після чого зразки центрифугували протягом 15 хвилин при 1000 об/хв.

До отриманого супернатанту додавали по 0,5 мл 0,8% розчину 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК) і проводили інкубацію на водяній бані при температурі 100 °С протягом 15 хвилин. Після охолодження зразків вимірювали оптичну густину утвореного кольорового комплексу при довжині хвилі 532 нм за допомогою спектрофотометра (ВіоТек, США).

Концентрацію ТБК-активних продуктів розраховували на 1 мг білка з урахуванням молярного коефіцієнта екстинкції комплексу малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою.

4.6 Оцінка рівня SH-активних продуктів

Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH) груп визначали за методом Елмана [8].

Для оцінки загального вмісту SH-груп до 0,075 мл клітинного гомогенату додавали 0,5 мл 30 мМ буфера трис-НСІ з 1 мМ ЕДТА (рН 8,0), а також 0,05 мл 1,25% розчину додецилсульфату натрію (ДСН). Суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Після цього додавали 0,025 мл реактиву Елмана (5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойна кислота)) і залишали у темному місці на 30 хвилин. Оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі 412 нм проти контрольної проби, яка містила 0,575 мл буфера трис-НСІ з ЕДТА, 0,05 мл ДСН та 0,025 мл реактиву Елмана.

Вміст небілкових SH-груп визначали шляхом осадження білків: до 0,075 мл гомогенату додавали 0,025 мл 10,5% трихлороцтової кислоти (ТХО), після чого інкубували 10 хв при кімнатній температурі та центрифугували протягом 15 хв при 1500 об/хв. Отриманий супернатант нейтралізували 1 М NaOH до досягнення рН 7,0. Далі до нього додавали 0,525 мл буфера трис-НСІ з ЕДТА та 0,025 мл реактиву Елмана, інкубували у темряві 30 хв і вимірювали оптичну густину при 412 нм. Контрольна проба містила 0,625 мл буфера з ЕДТА та 0,025 мл реактиву Елмана.

Рівень білок-зв'язаних SH-груп розраховували як різницю між загальним і небілковим вмістом SH-груп за формулою: $(C_{\text{білкові}} = C_{\text{загальні}} - C_{\text{небілкові}})$.

4.7. Статистичний аналіз

Обробку експериментальних даних проводили з використанням загальноприйнятих статистичних методів. Було обчислено середні арифметичні значення (M) та стандартні похибки середнього (m) для вибірок, що включали n спостережень. Для визначення статистично значущих відмінностей між середніми значеннями застосовували t -критерій Стьюдента. Усі розрахунки виконували за допомогою стандартних програмних засобів. Для статистичного аналізу та побудови графічних матеріалів використовували програмне забезпечення Microsoft Excel та Statistica 7.0.

РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що накопичення кадмію суттєво впливає на різні типи клітин спричиняючи їх загибель. Найбільш уразливими клітинами за впливу наночастинок кадмію є еритроцити, лімфоцити, клітини епітеліального походження а також гепатоцити. Нам відомо про два підходи до створення нанотехнологій на основі кадмію та його сполук:

Хімічний синтез — традиційний метод, що використовує хімічні реактиви та обладнання для отримання наноматеріалів.

«Зелений» синтез — більш екологічний підхід, що базується на використанні природних або менш токсичних компонентів, наприклад, графену та біоматеріалів. Отримані дані підтверджують гіпотезу про нижчу токсичність наночастинок CdS, синтезованих за допомогою біологічної сировини, у порівнянні з хімічно отриманими аналогами. Це може бути пов'язано з наявністю залишкових природних компонентів, що покривають наночастинок, зменшуючи їхню агресивну взаємодію з клітинними структурами. Підвищення активності каталази та зростання рівня SH-груп свідчить про активацію антиоксидантного захисту клітин, що дозволяє клітинам ефективніше адаптуватися до впливу наночастинок.

Таким чином, наночастинок CdS, отримані за допомогою «зеленого» синтезу, виявляють більш сприятливий токсикологічний профіль та можуть розглядатися як перспективні матеріали для подальшого використання у біомедичних дослідженнях та екологічно безпечних технологіях.

5.1 МТТ-колориметричний метод визначення виживаності гепатоцитів за впливу наночастинок сульфїду кадмію.

В нашому дослідженні з використанням клітин гепатоцитарного походження було виявлено наступне: високу токсичність наночастинок кадмію отриманих хімічним синтезом і менш виражену токсичність наночастинок «зеленого синтезу».

Рисунок 5.1 демонструє вплив наночастинок кадмію, отриманих методом "зеленого синтезу", на активність мітохондріальних ферментів як функції виживаності клітин (показник A_{540}) залежно від концентрації.

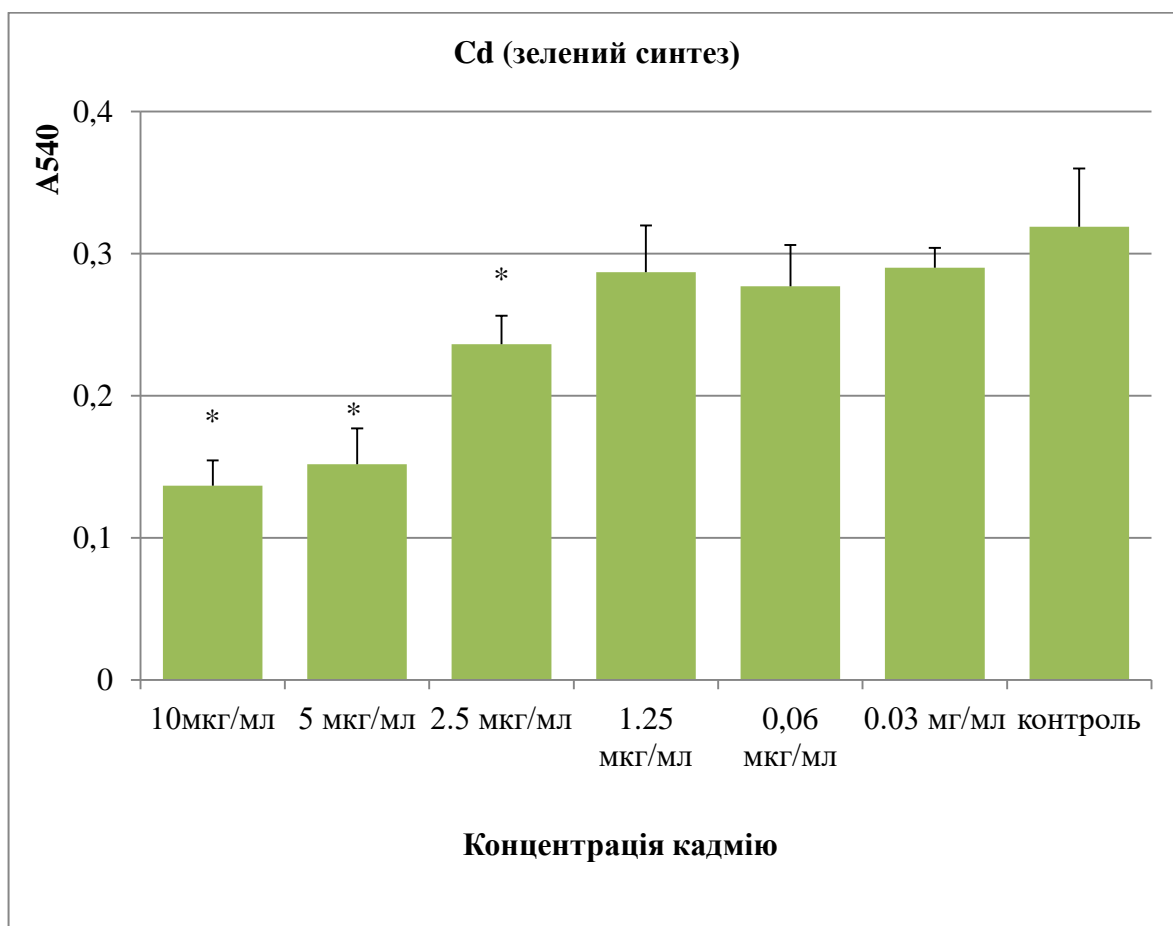


Рис. 5.1. Вплив наночастинок кадмію, отриманих методом "зеленого синтезу", на ступінь на виживаність гепатоцитів. *- $P < 0.05$ проти контролю

З графіка видно, що зі зниженням концентрації кадмію абсорбція при 540 нм зростає, що свідчить про зменшення токсичності. Найнижчі значення A_{540} зафіксовано при високих концентраціях (10 і 5 мкг/мл), що свідчить про їх виражений токсичний ефект (* $p < 0.05$). При зменшенні концентрації до 2.5 мкг/мл інтенсивність МТТ-показника підвищується, а при концентраціях 1.25 мкг/мл і нижче — показники майже не відрізняються від контролю (рис.5.1)

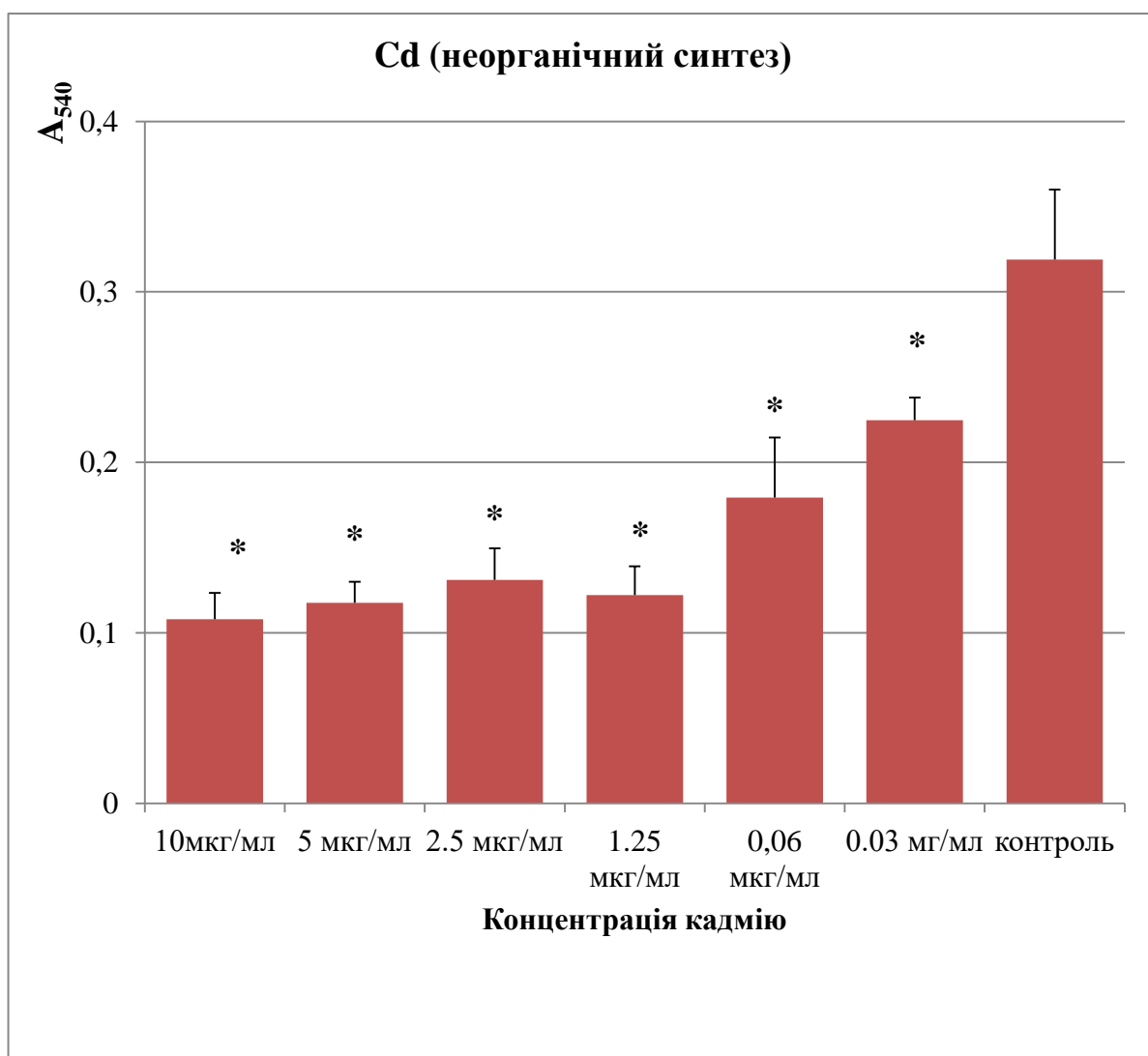


Рис. 5.2. Вплив наночастинок кадмію, отриманих методом "хімічного синтезу", на ступінь виживаності гепатоцитів. * $-P < 0.05$ проти контролю

Рисунок 5.2 По осі X — концентрація кадмію (вказано в мкг/мл та мг/мл).

По осі Y — значення оптичної щільності при довжині хвилі 540 нм (A540), яка відображає метаболічну активність клітин (живих клітин більше — значення вище).

Стовпчаста діаграма демонструє зниження оптичної щільності при зростанні концентрації кадмію. У варіантах з високими концентраціями кадмію (10, 5, 2.5, 1.25 мкг/мл) значення A540 є нижчими, що свідчить про зниження життєздатності клітин — тобто цитотоксичний ефект кадмію.

При низьких концентраціях (0.06, 0.03 мг/мл) та в контролі (останній стовпчик праворуч) оптична щільність значно вища, що вказує на вищу клітинну активність та менший токсичний вплив. Цей графік підтверджує, що вища концентрація кадмію знижує життєздатність клітин, що є типовим результатом для оцінки токсичності металів у МТТ-тесті. Контрольна група має найвищу метаболічну активність.

В попередніх дослідженнях вираженість токсичної дії за впливу наночастинок кадмію, отриманих зеленим та хімічним синтезом також мали відмінність між хімічно синтезованими та наночастинками зеленого синтезу по відношенню до еритроцитів та лімфоцитів.

5.2. Визначення вмісту сульфгідрильних груп та каталазної активності в гепатоцитах за дії наночастинок кадмію отриманих зеленим та хімічним синтезом.

Сульфгідрильні групи за впливу токсикантів відображають здатність живих клітин відповідати метаболічними змінами в системі детоксикації метаболітів з використанням потужної захисної глутатіонової системи клітин.

Рисунок 5.3 демонструє зміни рівня сульфгідрильних (SH) груп у печінкових гомогенатах щурів за умов дії кадмію, отриманого неорганічним і «зеленим» синтезом, у порівнянні з контролем.

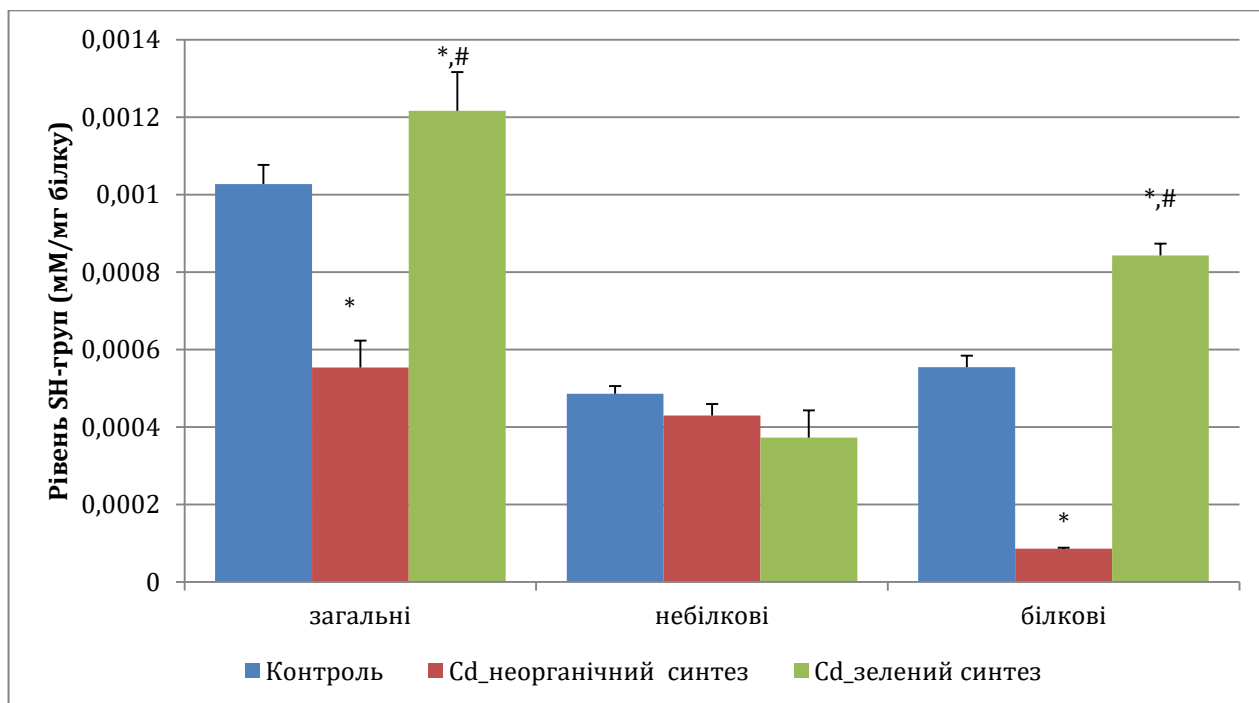


Рис. 5.3. Зміни рівня сульфгідрильних (SH) груп у печінкових гомогенатах за умов дії кадмію. *- $P < 0.05$ проти контролю; #-проти наночасток хімічного синтезу.

У групі з неорганічним кадмієм спостерігається достовірне зниження рівнів загальних, небілкових та білкових SH-груп, що свідчить про виснаження антиоксидантного захисту. Особливо помітним є падіння білкових SH-груп — майже до нульових значень ($*p < 0.05$ відносно контролю).

Наступним важливим показником антиоксидантного захисту є активація/інактивація каталазної активності (Рис.5.4), яка є відповідальною за виведення токсичних антиметаболітів, що спричиняють оксидативний стрес.

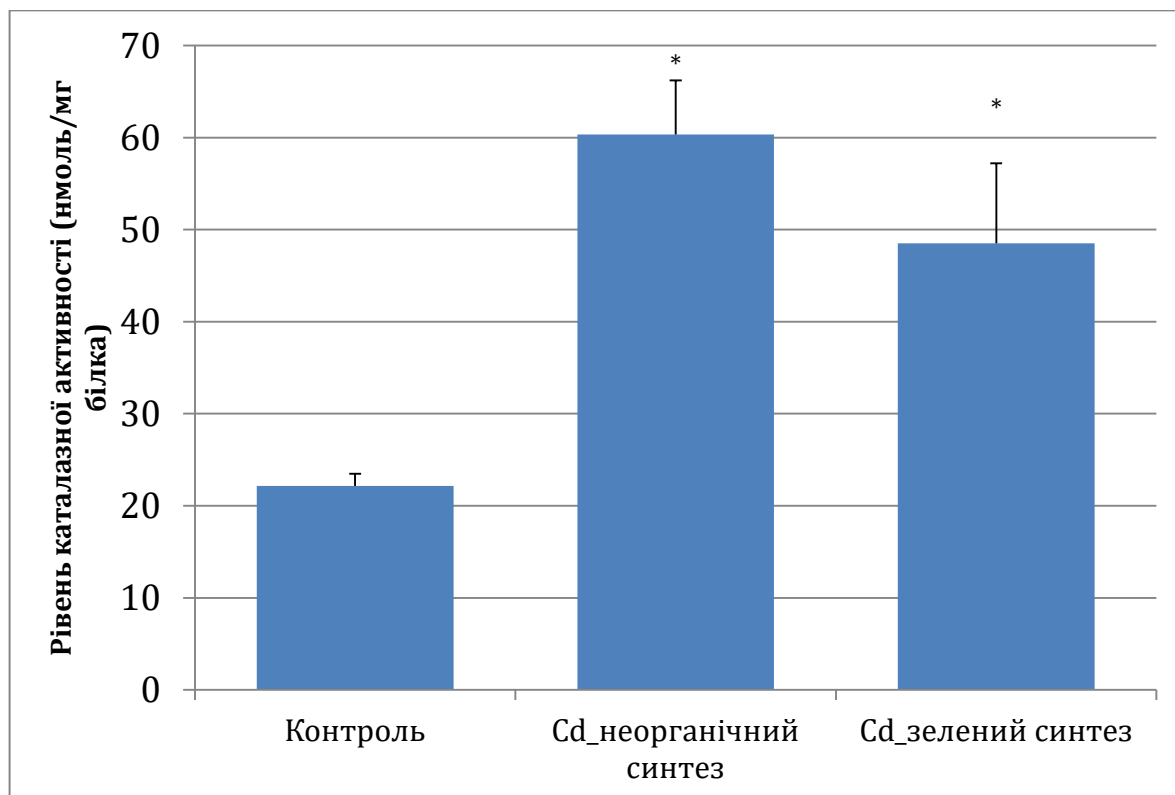


Рис. 5.4. Рівень каталазної активності в печінкових гомогенатах щурів під впливом кадмію, отриманого неорганічним та «зеленим» синтезом.

Рисунок 5.4 ілюструє рівень каталазної активності в печінкових гомогенатах щурів під впливом кадмію, отриманого неорганічним та «зеленим» синтезом, у порівнянні з контролем.

В обох експериментальних групах спостерігається достовірне підвищення каталазної активності порівняно з контролем ($*p < 0.05$), що вказує на розвиток окисного стресу та активацію антиоксидантного захисту. Найвищий рівень каталази зафіксовано при дії неорганічного кадмію — близько 60 нмоль/мг білка, що значно перевищує контрольне значення (приблизно 23 нмоль/мг білка). Для кадмію, отриманого шляхом «зеленого» синтезу, підвищення також суттєве (близько 50 нмоль/мг білка), але нижче, ніж у випадку неорганічного зразка.

Активність каталази в клітинах визначали за методом, описаним Королюком і співавт. [7]. Каталазна активність оцінювалася шляхом порівняння концентрації пероксиду водню (H_2O_2) у зразках до початку реакції та після її завершення. Для цього готували дві проби — дослідну та контрольну (нульову).

Клітинний лізат отримували шляхом гомогенізації у фізіологічному розчині (буфер Хенкса або 0,05 М трис-НСl, рН 7,8) у співвідношенні 1:3. До 25 мкл білкового екстракту (еквівалент 0,025 мг білка) додавали 0,5 мл реакційного буфера, що містив 0,03% розчин H_2O_2 , і інкубували суміш протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 4% розчину амоній молібдату ($(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$).

Контрольну пробу готували аналогічно, але замість білкового екстракту додавали 0,025 мл дистильованої води. Після 10-хвилинної інкубації при кімнатній температурі реакцію також зупиняли додаванням 0,5 мл 4% розчину амоній молібдату. Інтенсивність утвореного забарвлення вимірювали на мікропланшетному рідері (BioTek, США) при довжині хвилі 410 нм відносно контрольної проби.

Таким чином, застосовані аналітичні методики дозволили всебічно оцінити характер оксидативних змін у клітинах під впливом іонів кадмію. Визначення SH-груп надало уявлення про зміни у системі антиоксидантного захисту та структурі білків; аналіз ТБК-активних сполук підтвердив пероксидаційне ушкодження ліпідних мембран; а визначення активності каталази відобразило функціональний стан ферментативної ланки антиоксидантної системи. Отримані результати є важливими для розуміння молекулярних механізмів цитотоксичної дії кадмію.

ВИСНОВКИ

1. На клітинах гепатоцитарного походження в МТТ-тесті продемонстровано 50% пригнічення оптичного поглинання мітохондріальними ензимами живих клітин за концентрацій наночастинок неорганічного кадмію 0.5-2 мкг/мл, тоді як для наночастинок кадмію отриманих «зеленим синтезом» цей діапазон був втричі вищим і становив 5-8 мкг/мл.

2. Каталазна активність зростала порівняно з контролем за впливу як наночастинок CdS «зеленого синтезу» так і неорганічного в 3 рази ($P < 0.05$) та 2.5 рази ($P < 0.05$), відповідно

3. Рівень сульфгідрильних груп (SH-group) в клітинах гепатоцитів за дії наночастинок кадмію, отриманих зеленим синтезом суттєво зростав, порівняно з контролем та з дією наночастинок, отриманих неорганічним синтезом, особливо, щодо фракції білкових SH-group, що вказує на антиоксидантну активність наночастинок «зеленого синтезу»

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кадмій, хром, алюміній. Режим доступу: <https://studfile.net/preview/7831392/page:61/> [дата звернення 18.04.2024].
2. ATSDR Toxicological profile for Cadmium. Режим доступу: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf> (дата звернення 23.04.2024).
3. Borovaya, M., Pirko, Y., et al. (2015). Biosynthesis of cadmium sulphide quantum dots by using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, *Biotechnol. Biotechn. Equipm.*, 29(6), pp. 1156–1163.;
4. Borovaya, M.N., Naumenko, A.P. et al. (2014). Biosynthesis of luminescent CdS quantum dots using plant hairy root culture. *Nanocsale Res. Lett.*, (9), pp. 1–7.;
5. Dai H, Wang L, Li L, Huang Z and Ye L (2021) Metallothionein 1: A New Spotlight on Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* Front. Immunol., 05 November 2021. Department of Immunology, International Cancer Center, Shenzhen University Health Science Center, Shenzhen, China. Respiratory Medicine Department, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen, China
6. Daren L. Knoell, Todd A. Wyatt. The adverse impact of cadmium on immune function and lung host defense. *Semin Cell Dev Biol.* Author manuscript; available in PMC 2023 Oct 27. Published in final edited form as: *Semin Cell Dev Biol.* 2021 Jul; 115: 70– 6. Published online 2020 Nov 3.
7. Davis S. R., Cousins R. J. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function // *J. Nutr.* — 2000. — 130. — P. 1085–1088.
8. Deng H., Ye Z. H., Wong M. H. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal–contaminated sites in China // *Environmental Pollution* . — 2004. — 132. — P. 29–40.
9. Garmanchuk L., Borova M., Kapush O., Dzhagan V., Valakh M., Blume Ya., Yemets A. (2023) “Green” synthesis of CdTe quantum dots and their effect on human and animal cells, *Cytology and Genetics*, 57(3), p. 229-238.

10. Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Graminaceae and land snails. / Viard B., Pihan F., Promeprat S., Pihan J. C. // *Chemosphere*. — 2004. — 55. — P. 1349–1359.
11. Kinetics of hemolysis of normal and abnormal red blood cells in glycerol-containing media. / A. Sauer, T. Kurzion, D. Meyerstein, N. Meyerstein. // *Biochim Biophys Acta*. — 1991. — V. 1063 (2). — P. 203-211.
12. Klien K, Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies / K. Klien, J. Godnic-Cvar // *Arh Hig Rada Toksikol*. — 2012. — V. 63, N2. — P. 133–145.
13. Kwon J.Y. Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models in vitro and in vivo: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations / J.Y. Kwon, P. Koedrith, Y.R. Seo // *Int. J. Nanomedicine*. — 2014. — V. 9, Suppl 2. — P. 271–286.
14. Lead poisoning: Режим доступу: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/lead-poisoning-and-health> (дата звернення 23.04.2024).
15. Mirkov I., Popov A., Ninkov M., Tucovic D., Kulas J. Zeljkovic M., Popovich D., Kataranovski M. Immunotoxicology of cadmium: Cells of the immune system as targets and effectors of cadmium toxicity *Food and Chemical Toxicology* Volume 149, March 2021, с. 1-16.
16. Zhineng Wang, Ying Sun, Wenbo Yao, Qian Ba, Hui Wang. Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation. *Front Immunol*. 2021; 12. [Accessed 8 Apr. 2024].
17. Антоняк Г., Багдай Т., Першин О., Бубис О., Панас Є. Олексюк Н. (2015). Метали у водних екосистемах та їх вплив на гідробіонти. *Біологія тварин*, 2015, т. 17, № 2, с.с. 9-24.
18. Антоняк Г., Білецька Л., Бабич Н., Панас Н., Жиліщич Ю. (2010). Кадмій в організмі людини і тварин. I. Надходження до клітин і акумуляція. *Біологічні Студії / Studia Biologica* 2010 Том 4/№2, с. 127–140.

19. Вплив кадмію на організм. Режим доступу: <https://aam.com.ua/2023/08/09/vplyv-kadmiyu-na-organizm/> [дата звернення 15.04.2024].

20. Гунько С. (2021). Закономірності розподілу кадмію в едафотобах урбанізованих територій м. Кам'янське. Дис. канд. біол. наук. Дніпро. Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара.

21. Колосова І., Руденко К. Шаторна В. Кадмій – загроза для живих організмів (огляд літератури). ДЗ "Дніпропетровська медична академія". Дніпро. Україна, с. 433-442.

22. Мислива Т., Білявський Ю. (2012). Просторово-часова мінливість вмісту свинцю та кадмію в лікарських рослинах Житомирського Полісся. Таврійський науковий вісник № 80 частина 2, с.с. 347-356.

23. Н.С. Леоненко, О.Б. Леоненко, О.В. Демецька, Т.Ю. Ткаченко, Г.Я. Гродзюк. Дослідження цитотоксичності наночастинок сульфідів кадмію та сульфідів свинцю, стабілізованих органічними сполуками. 2015, №3 (71) - Оригінальні дослідження. Механізми інтоксикацій 2015.

24. Основи токсикології та нормування антропогенного навантаження на навколишнє середовище : конспект лекцій / укладачі: І. Ю. Аблеєва, О. С. Дроздова. – Суми : Сумський державний університет, 2020. – 260 с.

25. Плахотнюк В. (2019). Оцінка інтенсивності забруднення важкими металами ґрунтів СТОВ «Світанок» Калинівського району. Магістерська дипломна робота. Вінницький національний аграрний університет. Вінниця. 69 с.

26. Гарманчук, Л., et al. "«Зелений» синтез квантових точок CdTe та їх вплив на клітини тварин і людини." *Цитологія і генетика* 57, № 3 (2023): 28-39.

27. Апихтіна, О. Л. "Дослідження мембранотоксичної дії важких металів на моделі еритроцитів крові in vitro." *Український журнал сучасних проблем токсикології* 1-2 (2011): 65-69.

28. Важкі метали у компонентах навколишнього середовища м. Маріуполь (еколого-геохімічні аспекти) / С.П. Кармазиненко, І.В. Кураєва, А.І.

Самчук, Ю.Ю. Войтюк, В.Й. Манічев. — К.: Інтерсервіс, 2014. — 168 с.: [32] с. кол. іл.: іл.

29. Борова, М. М. "«Зелений» синтез флуоресцентних квантових точок Cds та характеристика їх властивостей." (2017).

30. Бородін С., Дворщенко К. Окисна модифікація білків у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Вип. 2(93).. 2023. С. 5-9.

31. Гордієнко Л. П. Механізми розвитку патологічних змін у слинних залозах щурів за умов експериментального ожиріння. Дис. Запорізький державний медичний університет, 2015. 141 с.

32. Остапів Д. Д. Активність окисних процесів та утворення гормонів клітинами гранульози яєчників корів. Національна академія аграрних наук України інститут біології тварин НААН. Львів. 2016. 195 с.