

Національна академія аграрних наук України
Інститут біології тварин

На правах рукопису

УДК 577.3 + 615.9

ГОЙВАНОВИЧ НАТАЛІЯ КОСТЯНТИНІВНА

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ
В ТКАНИНАХ ТВАРИН ПІД ВПЛИВОМ АФЛАТОКСИНУ В₁
ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ВВЕДЕННЯМ АНТИОКСИДАНТІВ**

03.00.04 – біохімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Антоняк Галина Леонідівна
доктор біологічних наук, професор

Львів – 2017

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Біологічні ефекти впливу афлатоксинів на організм тварин і людини	12
1.1.1. Токсичні ефекти афлатоксинів в організмі тварин і людини	14
1.1.2. Молекулярні механізми дії афлатоксинів	18
1.2. Метаболізм афлатоксину B ₁ та продуктів його перетворень в організмі тварин	20
1.3. Токсини грибів роду <i>Aspergillus</i> і джерела їх надходження до організму тварин	25
1.4. Умови росту грибів-продуцентів мікотоксинів	27
1.5. Допустимі рівні й діагностика афлатоксинів у харчових продуктах і кормах	29
1.6. Методи детоксикації афлатоксинів	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	40
2.1. Об'єкт досліджень і постановка експерименту	40
2.2. Отримання експериментального матеріалу	43
2.3. Визначення вмісту продуктів пер оксидного окиснення ліпідів	44
2.3.1. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів	44
2.4. Дослідження активності ензимів антиоксидантної системи та вмісту відновленого глутатіону	44
2.4.1. Визначення активності супероксиддисмутази	44
2.4.2. Визначення активності глутатіонпероксидази	45
2.4.3. Визначення активності глутатіонредуктази	46

2.4.4.	Визначення активності глутатіон-S-трансферази	47
2.4.5.	Дослідження вмісту відновленого глутатіону	48
2.5.	Дослідження активності ензимів енергетичного обміну	49
2.5.1.	Визначення активності лактатдегідрогенази	49
2.5.2.	Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази	49
2.6.	Визначення активності амінотрансфераз	50
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ		52
3.1	Дія афлатоксину В ₁ на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у тканинах щурів	52
3.1.1	Вплив афлатоксину В ₁ на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах щурів за гострої інтоксикації	53
3.1.2	Вплив гострої АFB ₁ -інтоксикації на окремі ланки метаболізму у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця щурів	56
3.1.3.	Рівень та активність амінотрансфераз в досліджуваних тканинах і плазмі крові щурів на тлі щодобової інтоксикації афлатоксином В ₁	72
3.1.4	Висновки	74
3.2.	Вплив біомаси дріжджів <i>Phaffia rhodozyma</i> на окремі ланки метаболізму у тканинах щурів на тлі інтоксикації афлатоксином В ₁	76
3.2.1.	Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах щурів за дії біомаси дріжджів <i>Phaffia rhodozyma</i> на тлі гострої АFB ₁ -інтоксикації	77
3.2.2.	Коригувальна дія біомаси дріжджів <i>Phaffia rhodozyma</i> на активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах щурів за щодобового введення афлатоксину В ₁	78
3.2.3.	Висновки	84

3.3.	Прооксидантно-антиоксидантні зміни у тканинах щурів у разі введення вітаміну Е на тлі AFB ₁ -інтоксикації	85
3.3.1.	Вплив вітаміну Е на процеси ліпопероксидації у тканинах щурів за щодобового введення афлатоксину В ₁	86
3.3.2.	Прооксидантно-антиоксидантний баланс у тканинах щурів за введення вітаміну Е на тлі інтоксикації афлатоксином В ₁	88
3.3.3.	Висновки	92
3.4.	Прооксидантно-антиоксидантні зміни у тканинах щурів у разі введення препарату «Е-Селен» на тлі гострої інтоксикації афлатоксином В ₁	93
3.4.1	Вплив препарату «Е-Селен» на процеси пероксидного окиснення ліпідів у тканинах щурів за щодобового введення афлатоксину В ₁	94
3.4.2.	Стан системи антиоксидантного захисту у тканинах щурів за дії препарату «Е-Селен» на тлі гострої інтоксикації афлатоксином В ₁	96
3.4.3	Висновки	101
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ		107
ВИСНОВКИ		122
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ		126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		127

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ

АлАТ	- аланінамінотрансфераза
АсАТ	- аспартатамінотрансфераза
АФО	- активні форми кисигену
Г-6-ФДГ	- глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа
ГПО	- глутатіонпероксидаза
Г-S-T	- глутатіон-S-трансфераза
ГР	- глутатіонредуктаза
ЛДГ	- лактатдегідрогеназа
ПОЛ	- пероксидне окиснення ліпідів
СОД	- супероксиддисмутаза
ТБК	- тіобарбітурова кислота
AFB ₁	- афлатоксин В ₁
АТР	- аденозинтрифосфат
GSH	- глутатіон відновлений
GSSG	- глутатіон окиснений
NAD	- нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений
NADH	- нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
NADP ⁺	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат окиснений
NADPH	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
ДОН	- дезоксиніваленол

ВСТУП

Актуальність теми. Афлатоксини (одна з груп мікотоксинів) належать до найшкідливіших токсинів природного походження. Афлатоксини можуть потрапляти в організм тварин за умов згодовування кормів, уражених грибами роду *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*), а також у продукти харчування людини у разі їх забруднення грибами-продуцентами [23, 24, 121, 133]. Найпоширенішим і найнебезпечнішим є афлатоксин В₁ (AFB₁), який разом із продуктами свого метаболізму може накопичуватися в клітинах органів і тканин [57, 139]. Афлатоксин В₁ характеризується широким спектром токсичного впливу на організм, виявляючи мутагенний, канцерогенний та імунотоксичний вплив, а також низкою віддалених ефектів [79, 87, 164]. Незважаючи на значну кількість праць, присвячених вивченню впливу афлатоксинів на організм тварин, дотепер немає цілісного уявлення про механізми впливу AFB₁ на внутрішньоклітинний метаболізм і фактично не з'ясовані особливості пошкоджувальної дії токсину в тканинах серця, головного мозку та нирок. Однак такі дослідження актуальні, оскільки AFB₁ зазнає неповної детоксикації в клітинах печінки, де відбувається знешкодження афлатоксинів, і може надходити в русло крові, потрапляючи в інші клітини організму [164, 259].

Наявні дані про те, що афлатоксини здатні перетинати гематоенцифалічний бар'єр [192, 243, 279] і, крім цього, можуть метаболізуватися не лише в гепатоцитах, а й у клітинах нирок та деяких інших органів з утворенням реакційно активних форм кисню [37, 194]. Останні спричиняють розлади внутрішньоклітинного метаболізму, пошкоджують структуру мембран, індукують запальні процеси, імуносупресію та розвиток патологічних змін у тканинах [55, 202]. Тому важливо з'ясувати особливості формування анти-оксидантного захисту й

інших захисних систем клітини, спрямованих на детоксикацію AFB₁ і активацію метаболічних механізмів відновлення гомеостазу.

Водночас важливе значення мають профілактика та зменшення шкідливого впливу афлатоксинів на організм тварин застосуванням чинників, дія яких ґрунтується і на адсорбції токсинів у травному тракті, і на метаболічному захисті клітин. Наші дослідження були скеровані на з'ясування ефективності застосування з цією метою біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma*, які, з одного боку, виявляють дію у кишково-шлунковому тракті, адсорбуючи своєю клітинною стінкою афлатоксини та продукти їх часткової детоксикації, а з іншого – привертають увагу своєю здатністю продукувати каротиноїд астаксантин, який є потужним антиоксидантом [34, 70, 96, 158; 197]. У низці досліджень [40, 68, 96] встановлено, що введення в раціон тварин антиоксидантів зумовлює зменшення загальної інтоксикації організму, тому актуальним є вивчення коригувального впливу на процеси клітинного метаболізму інших антиоксидантних препаратів (вітамін Е і комплекс «Е-Селен») за умов інтоксикації організму тварин введенням афлатоксину В₁.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом наукових досліджень, виконаних згідно з планом науково-дослідних робіт лабораторії обміну речовин імені С. З. Гжицького Інституту біології тварин НААН упродовж 2011–2015 рр. НТП 5 «Наукові основи управління мікробіологічними процесами в технологіях високопродуктивного сільськогосподарського виробництва», завдання «Вивчити біохімічні механізми дії природних токсинів кормів на мікроорганізми рубця і розробити методи зниження їх токсичності» (шифр 05/02-30Ф, № держреєстрації 0111U006137).

У межах наукової теми автор досліджувала: біохімічні механізми впливу AFB₁ на окремі ланки метаболізму у тканинах тварин (печінка, головний мозок, серце, нирки), механізми детоксикації AFB₁ у тканинах

щурів під час експериментального введення тваринам AFB₁, коригування метаболічних порушень ентеральним введенням біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* та вітаміну Е і парентеральним введенням антиоксидантного комплексу «Е-Селен».

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала у з'ясуванні впливу AFB₁ за різних доз та способів введення на окремі ланки метаболізму в тканинах білих щурів й обґрунтувати способи корекції порушень препаратами біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* й антиоксидантів з огляду на порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу в тканинах тварин під впливом AFB₁.

Для досягнення поставленої мети окреслено такі **завдання**:

- дослідити динаміку процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця білих щурів за одноразового парентерального введення AFB₁ дозою 0,5 мг/кг маси і щодобового внутрішньошлункового введення токсину дозою 0,025 мг/кг маси впродовж 14 діб;
- дослідити стан антиоксидантної системи й активність ензимів енергетичного обміну в тканинах щурів після інтоксикації AFB₁ за різних доз і способів введення токсину;
- проаналізувати процеси трансамінування у тканинах і рівень вивільнення трансаміназ у плазму крові щурів під впливом AFB₁;
- дослідити ефективність використання біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* з метою корекції порушень метаболізму, виявлених у тварин, уражених AFB₁;
- з'ясувати коригувальну дію антиоксидантів (вітамін Е, препарат «Е-Селен») щодо метаболічних змін у організмі тварин після введення AFB₁.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми розвитку метаболічних порушень під впливом афлатоксину В₁ та їх корекція у тварин за допомогою антиоксидантів.

Предмет дослідження: показники процесів ПОЛ, ензими та неензимні компоненти антиоксидантної системи в клітинах і активність трансаміназ у плазмі крові й тканинах щурів, яким вводили AFB₁, біомасу дріжджів *Phaffia rhodozyma* та антиоксиданти (вітамін Е і препарат «Е-Селен»).

Методи досліджень: біохімічні (спектрофотометричні), фізико-хімічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше на основі комплексних досліджень визначено прооксидантно-антиоксидантний баланс в тканинах головного мозку, серця, нирок та печінки щурів за умов гострого і підгострого отруєння різними дозами і способами введення афлатоксину В₁; встановлено провідну роль активації оксидативного стресу в біохімічних механізмах порушень тканинного метаболізму під впливом AFB₁. З'ясовано особливості перебігу вільнорадикального окиснення, змін активності ензимів антиоксидантного захисту й обміну моносахаридів, процесів трансамінування у тканинах щурів за різних доз і способів введення AFB₁. Встановлена залежність між активацією процесів ліпопероксидації і зниженням активності ензимів антиоксидантної системи й енергетичного обміну, вичерпанням функціональних резервів системи глутатіону, вивільнення трансаміназ у плазму крові тварин за умов розвитку AFB₁-інтоксикації. Доведено ефективність застосування біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* та антиоксидантів (вітамін Е, комплекс «Е-Селен») з метою коригування метаболічних порушень, запобігання розвитку прооксидантних ефектів у тварин, які зазнають впливу афлатоксину В₁.

Практичне значення одержаних результатів. На основі проведених досліджень обґрунтовано доцільність застосування коригувальних препаратів – біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma*, які адсорбують AFB₁ у травному тракті, й антиоксидантів – вітаміну Е і комплексу «Е-Селен», що впливають на стан антиоксидантної системи. Експериментально доведено, що з досліджених чинників щодобове введення біомаси дріжджів *Phaffia*

rhodozyma (1,5 мг/кг маси) за інтоксикації AFB₁ найефективніше сприяє зменшенню негативного впливу токсину на метаболізм у тканинах, нормалізує активність ензимів антиоксидантного захисту й може бути рекомендоване для профілактики розвитку афлатоксикозу.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка, зокрема, під час викладання дисциплін «Біохімія» і «Мікробіологія з основами вірусології та імунології».

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно здійснила аналіз літературних джерел, виконала експериментальні дослідження, статистично опрацювала результати, сформулювала основні висновки роботи. Аналіз одержаних результатів та їх інтерпретацію, підготовку до друку публікацій за матеріалами дисертації здійснено разом із науковим керівником. Окремі дослідження виконано за участю співавторів публікацій, на що вказується в авторефераті.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були оприлюднені на: VI Ogólnopolskiej konferencji naukowych młodych pracowników nauki i studentów «Nowe tendencje rozwoju rolnictwa i obszarów wiejskich» (Rzeszów, 2010), II Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасний стан та перспективи розвитку біо- і агроценозів в умовах постійного техногенного забруднення» (Трускавець, 2010), III Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2010), VIII Konferencji Młodych Badaczy p.t. «Fizjologia i biochemia w żywieniu zwierząt» (Warszawa, 2011); V Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Екологічні проблеми сільсько-господарського виробництва» (Яремче, 2011), II Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Роль науки у підвищенні технологічного рівня і ефективності АПК України» (Тернопіль, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції

«Розвиток сучасної освіти і науки: результати, проблеми, перспективи» (Дрогобич, 2013, 2015); Międzynarodowej konferencji «Wpływ czynników antropogenicznych na środowisko przyrodnicze w terenach górskich i podgórszych» (Rzeszów, 2013); Międzynarodowej konferencji «Systemy gospodarowania w województwach pogranicza polsko-ukraińskiego» (Rzeszów, 2014).

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи висвітлені в 29 наукових публікаціях. Зокрема, 6 статей опубліковані у наукових фахових виданнях, з них 4 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз, 4 – у зарубіжних наукових виданнях, решта – у наукових збірниках, матеріалах наукових конференцій і збірниках тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 163 сторінках комп'ютерного тексту, поділеного на такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел, що налічує 310 найменувань (із них 274 – латиницею), 2 додатки. Дисертація містить 24 таблиці та 6 рисунків, які займають 22 сторінки.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні ефекти впливу афлатоксинів на організм тварин і людини

Захворювання людей і тварин, пов'язані з вживанням продуктів харчування і кормів, заражених мікроскопічними грибами, відомі з давніх часів. В Україні причини виникнення і механізми розвитку мікотоксикозів почали досліджувати в 30–40 роках XX ст. через масові захворювання коней і великої рогатої худоби. Тоді ж було встановлено, що ці хвороби зумовлюються розвитком токсигенних грибів (таких, як *Stachybotrys atra*, *Dendrodochium toxicum*, *Fusarium sporotrichiella*) на зерні та інших кормах тварин [5, 9, 285]. Нині встановлено структуру та досліджено властивості багатьох мікотоксинів (афлатоксини, охратоксини, фумонізени, трихотецени та ін.). Однак ця проблема повністю не з'ясована і вимагає детального вивчення.

У 60-х роках XX сторіччя афлатоксини вперше були ідентифіковані як харчові отрути, коли на індичачих фермах в Англії спалахнула невідома хвороба, що супроводжувалася гострим некрозом печінки, пов'язаним з проліферацією клітин жовчних протоків, загибеллю майже ста тисяч голів птиці. Наукові дослідження свідчили, що отруйна речовина, яка спричинила розвиток цих захворювань, була продуктом діяльності гриба *Aspergillus flavus*, яким був забруднений корм тварин. Від видової назви гриба й походить назва токсину – афлатоксин [2, 65, 164, 241].

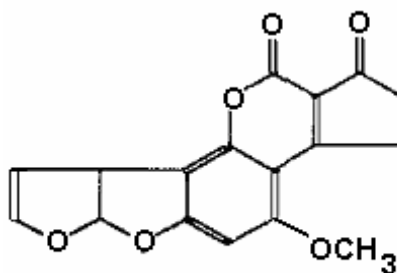
Природним середовищем існування мікроскопічних грибів – продуцентів афлатоксинів є ґрунт, рослинні рештки, зіпсоване зерно. Найчастіше цими мікотоксинами забруднюються зернові (кукурудза, сорго, просо, рис, пшениця) та олійні культури (арахіс, соя, соняшник, бавовник), а також спеції (гострий перець, чорний перець, коріандр, куркума, імбир) та горіхи (мигдаль, фісташки, волоський горіх, кокос, бразильський горіх)

[22, 71, 270]. Афлатоксини можуть надходити і в молоко тварин, які споживали забруднені токсинами корми. Потрібно зазначити, що найчастіше зараження грибами – продуцентами мікотоксинів – відбувається внаслідок пошкодження рослин шкідниками, наприклад, кукурудзяним метеликом. Афлатоксини потрапляють у плоди й насіння рослин ще в період росту та під час зберігання рослинної продукції.

Збільшенню вмісту афлатоксинів у продуктах сприяють високі температури під час вирощування сільськогосподарських культур та вологе середовище.

Потрапивши в організм тварин і людини, афлатоксини спричиняють низку шкідливих ефектів: пригнічують імунітет, уражають нирки, печінку, нервову та кровоносну систему, шлунково-кишковий тракт, спричиняють захворювання крові, септичну ангінку, дерматити, судоми, порушення гормонального балансу та функції відтворення [2, 38, 60, 146]. Споживаючи забруднені цими сполуками корми, тварини сповільнюють ріст і розвиток у зв'язку з розвитком токсикозів печінки та нирок, порушення гормонального балансу, руйнування нервової та імунної систем. Ці сполуки та продукти їхнього метаболізму можуть нагромаджуватись у тканинах і органах, а через деякий час – спричинити розвиток у клітинах, головним чином гепатоцитах, канцерогенного процесу [79, 101, 199].

Серед токсичних метаболітів грибів роду *Aspergillus* ідентифіковано низку афлатоксинів, головними з яких є чотири – афлатоксини B₁, B₂, G₁ та G₂ [49, 57, 60, 146, 164]. Однак, загалом група цих подібних за хімічною структурою органічних сполук (заміщені кумарини) охоплює принаймні 16 сполук, які відрізняються деякими властивостями та рівнем токсичності [164, 305]. У клітинах гриба *A. flavus* синтезуються афлатоксини B₁ і B₂, гриб *A. parasiticus* синтезує, крім них, ще й афлатоксини G₁ і G₂ [49, 50, 57, 175, 305].



Афлатоксин В1

Структура афлатоксину В₁ [71]

Вчені вважають, що афлатоксин В₁ є найтоксичнішим природним гепатоканцерогеном з усіх сполук, які охарактеризовані на сьогодні й він уражає організм приматів, ссавців, птахів, риб [164, 305]. Багаторічні дослідження підтвердили, що основним органом-мішенню афлатоксинів є печінка, також добре вивчений синтез афлатоксину В₁ [81, 227, 259, 278, 306].

1.1.1. Токсичні ефекти афлатоксинів в організмі тварин і людини

Афлатоксини – одні з найнебезпечніших забруднювачів кормів і харчових продуктів, які за високих рівнів надходження до організму зумовлюють отруєння – афлатоксикоз [24, 88, 132, 195]. Відомо, що ці токсини, крім безпосередньої цитотоксичної дії, індукують генетичні порушення, спричиняють ембріотоксичний, алергенний, дермато-некротичний ефекти [78, 86, 187]. Споживаючи забруднені афлатоксинами корми, тварини сповільнюють ріст і розвиток, спостерігається гормональний дисбаланс, руйнуванується нервова та імунна системи [35, 42, 53, 62, 244, 264]. Внаслідок нагромадження афлатоксинів і продуктів їхнього метаболізму у тканинах і органах, головним чином гепатоцитах, може розпочатися канцерогенний процес [71, 84, 125, 242].

Найчастіше афлатоксикози реєструють у країнах із спекотним вологим кліматом, де його спалахи особливо небезпечні. Так, тривале надходження

цих токсинів – основний чинник, що зумовлює розвиток гепатокарциноми, випадки якої зареєстровані в Кенії, Сенегалі, Китаю, Свазіленд, Мозамбіку, Мексиці [13, 43, 48, 77, 206, 219, 292, 294].

Ряд вчених вважає, що первинний рак печінки (гепатоцелюлярна карцинома), який поширений у тропічних країнах – Уганда, Свазіленд, Кенія, Заїр, Індія, може спричинятися вживанням арахісу та кукурудзи, забруднених афлатоксинами. В африканських країнах, це захворювання чітко корелює із вмістом афлатоксинів у добовому раціоні населення. Найчастіше афлатоксинами бувають забруднені горіхи, особливо арахіс, а із зернових – кукурудза. Деякі харчові продукти (молоко, м'ясо, яйця) можуть містити мікотоксини, оскільки тваринам згодовували забруднені корми або порушувалися умови зберігання цих продуктів. Експериментально доведено, що згодовування тваринам корму з афлатоксинами обумовлювало присутність їх у м'ясі, внутрішніх органах, жировій тканині [44, 77, 92].

Останнім часом, велика увага приділяється наявності афлатоксинів у молоці, зокрема афлатоксину M_1 , який в організмі перетворюється в афлатоксин B_1 . Кількість проб молока, за даними ФАО, що містили афлатоксини B_1 та M_1 , коливалась в межах від 4 до 75 %. Найменший рівень був виявлений у Німеччині та США, а найбільший – у Ірані [45, 72, 100]. Слід відмітити, що пастеризація і стерилізація не зменшують рівень афлатоксину M_1 у продуктах. Одним із найсприятливіших продуктів для розвитку грибів роду *Aspergillus* і синтезу ними афлатоксинів є сухе молоко [13, 151, 161, 237].

На сьогоднішній день, остаточно не встановлено кількість мікотоксинів, що надходять до організму людини через забруднені продукти харчування, не визначені чіткі максимально допустимі дози афлатоксину B_1 для людини. Багатьма вченими доведено, що безпечних рівнів мікотоксинів немає, навіть незначні їх кількості мають негативну дію і, з часом, здатні накопичуватись в організмі [71, 164]. Процес переходу афлатоксинів із

кормів в органи та тканини тварин, а отже і в продукти харчування, є різним. Найбільш виражена залежність встановлена між вмістом афлатоксинів у кормах та у коров'ячому молоці [100, 150].

Афлатоксикози можуть протікати в гострій або хронічній формі. Гострий афлатоксикоз виникає за середнього або високого рівнів надходження афлатоксинів до організму людини і тварин. Симптомами хвороби є порушення функцій печінки, некроз, цироз, а у важких випадках – гостра печінкова недостатність і смерть [164, 180, 257]. Отруєння афлатоксинами супроводжується підвищенням температури тіла, швидкою жовтяницею, набряками кінцівок, болем, блюванням, змінами в процесах травлення, збільшенням печінки. Випадки гострої інтоксикації афлатоксинами з швидким перебігом і високою смертністю виявляють у сільськогосподарських тварин (велика рогата худоба, свині, птиця). В уражених тварин виявляють набрякові, жирові й некротичні зміни в печінці, пошкодження нирок і травного тракту, ламкість капілярів, геморагії, порушення координації рухів, судоми, парез, пошкодження травного тракту [13, 257].

Для хронічного афлатоксикозу характерна гепатоканцерогенність. Як вказувалось, афлатоксин В₁ – один з найнебезпечніших природних канцерогенів [37, 158, 305]. В експериментальних дослідженнях показано здатність цього токсину викликати розвиток гепатоми з метастазами в легенях щурів за умов введення дозою 15 мкг/кг маси тіла [22].

Доведено, що тривале харчове надходження афлатоксинів до організму людини є основним чинником, що зумовлює виникнення карциноми клітин печінки, особливо в регіонах, ендемічних за захворюванням на вірусний гепатит В. Випадки карциноми печінки зареєстровані в Кенії, Сенегалі, Китаю, Свазіленд, Мозамбіку, Мексиці [9, 234, 305].

Таблиця 1.1.

LD_{50} афлатоксину B_1 для різних видів тварин за одноразового введення
[2, 233, 302]

Вид тварин	LD_{50} мг/кг
Хом'яки	10,2
Миші	9
Курчата	6,5 – 16,5
Щурі	
Новонароджені	0,58
Дорослі самці	7,2
Дорослі самки	17,9
Мавпи	7,8
Вівці	2,0
Морські свинки	1,4 – 2
Велика рогата худоба	1,0–1,5
Коні	0,6 – 1,0
Собаки	0,6 – 1,0
Індики	0,5 – 1,36
Свині	0,62
Кіт	0,55
Норки	0,5 – 0,6
Райдужна форель	0,5
Кролі	0,3 – 0,5
Качки	0,34 – 0,56

Мікотоксини загалом, та афлатоксини зокрема, зумовлюють подібні ефекти в організмі різних тварин, чутливість хребетних до дії цих сполук змінюється залежно від виду, віку й індивідуальних особливостей організму.

У низці досліджень доведено прямий зв'язок між канцерогенезом у риб і наявністю в їх кормах афлатоксинів [155, 165]. Потрібно зазначити, що вперше гепатому печінки у форелі спостерігали у 1933 році в Англії. Наприкінці 30-х років XX ст. у США хворобу виявляли у 0,7 % особин, а в середині XX ст. рівень захворюваності риб на гепатому становив майже 100 % [2, 13]. Випадки хвороби реєструють час від часу і тепер у рибних

господарствах Італії, Японії, США, Франції, Естонії, Німеччини та в інших країнах [2]. Це супроводжується значними економічними втратами. Так, унаслідок згодовування неякісного корму на п'яти рибоводних фермах Данії, а гепатому виявлено у більш, ніж 50 тис. особин форелі.

Афлатоксини також впливають на розвиток ембріонів, тобто мають тератогенний ефект. Зокрема, при вивченні впливу афлатоксину В₁ на розвиток курячих ембріонів, встановлено, що вже на шостий день інкубації утворюються виродки в 65–90 % [24].

Водночас афлатоксини є найсильнішими імуносупресивними чинниками з усіх мікотоксинів [13, 262]. Вони інгібують реакції клітинного імунітету, активність фагоцитозу, інтенсивність утворення комплементу (С₄), інтерферону та імуноглобулінів (IgG, IgA). До того ж, набутий шляхом вакцинації імунітет до деяких хвороб може значно пригнічуватись за умов надходження в організм цих токсичних сполук.

Тривалий вплив малих доз афлатоксинів на хребетних може підвищувати не лише їхню сприйнятливість до інфекцій, а й до процесів канцерогенезу [244, 245]. Загальні ознаки впливу афлатоксину В₁ на стан імунної системи: зменшення кількості фагоцитів та Т-лімфоцитів; зменшення маси тимусу та клоакальної сумки; гальмування процесів синтезу антитіл на введення еритроцитів барана; наявність афлатоксину в інкубаційних яйцях; зниження фагоцитозу та клітинного імунітету у ембріонів; підвищення чутливості нащадків до дії патогенів [13, 71, 164].

1.1.2. Молекулярні механізми дії афлатоксинів

У низці досліджень [55, 93, 133, 153, 158] встановлено, що в основі молекулярних механізмів дії афлатоксинів лежить їх взаємодія з макромолекулами клітини – нуклеїновими кислотами і білками. Механізм дії афлатоксинів пов'язаний з особливостями їх метаболізму, особливо, з

процесами так званої активації в клітині. При цьому, найтоксичнішим активним метаболітом афлатоксину B_1 є 2,3-епоксид афлатоксину B_1 , який ковалентно зв'язує нуклеїнові кислоти.

Афлатоксини, як й інші гепатотоксини, пригнічують синтез ДНК, РНК і білків. порушення синтезу нуклеїнових кислот є найбільш раннім біохімічним ефектом дії афлатоксинів.

У печінці афлатоксин B_1 та інші токсини цієї групи незворотно зв'язуються з молекулами білків і ДНК та утворюють аддукти (наприклад, афлатоксин B_1 -лізин у молекулі альбуміну). Руйнування білків і азотистих основ ДНК у гепатоцитах зумовлює токсичність афлатоксинів щодо печінки [51, 134].

У гепатоцитах афлатоксин B_1 перетворюється до більш токсичних і канцерогенних метаболітів за участю цитохром Р450-монооксигенази. Епоксидна форма афлатоксину зв'язується із залишками гуаніну в молекулах ДНК, з утворенням гуаніл-N7-аддуктів, які індують мутації. Вважають, що одна з мутацій ($G \rightarrow T$ трансверсія) у 249-му кодоні гена білка p53 ініціює утворення гепатокарциноми [164].

Вплив афлатоксину на процеси біосинтезу білка не обмежується його взаємодією з ДНК і РНК. Було доведено [54, 153], що афлатоксини можуть блокувати процес термінації синтезу пептидного ланцюга. Під час цього процесу, порушується рух рибосом по РНК і процес їх вивільнення, що супроводжується утворенням спіральних полісом. При введенні афлатоксину B_1 щурам в дозі 1 мг/кг вже через 15 хв в цитоплазмі гепатоцитів знаходили спіральні полісоми, їх максимальна кількість утворювалася через 4 год [36].

Афлатоксини впливають й на інші метаболічні процеси. Суттєво впливають афлатоксини на вуглеводний обмін. Зниження рівня глікогену в гепатоцитах в перші дві доби після введення токсину є характерною ознакою гострого токсикозу [108].

Порушення в обміні вітамінів та мінеральних речовин виявлені як під час гострого, так і під час хронічного афлатоксикозу. Встановлений негативний вплив афлатоксинів на обмін мінеральних речовин (залізо, мідь, фосфор), що пов'язують із виникненням гемолітичної анемії та слабкістю кінцівок. Афлатоксини спричиняють зниження концентрації вітаміну А у печінці та плазмі крові телят, свиней і курчат; погіршують всмоктування та метаболізм вітамінів групи D, що призводить до слабкості кінцівок і зниження міцності кісток [13, 103, 106, 136].

Геморагічний синдром є однією з важливих ознак гострого афлатоксикозу. Під їх впливом знижується у плазмі крові рівень факторів зсідання крові – фібриногену та протромбіну. Вважають, що зниження концентрації факторів зсідання крові є наслідком порушення їх синтезу у печінці. Свідченням ураження печінки є підвищення активності ферментів – γ -глутамілтрансферази, аспартат- та аланінамінотрансфераз.

Афлатоксини є сильними імунодепресантами, оскільки пригнічується клітинний і гуморальний імунітет та система інтерферону [124, 202].

1.2. Метаболізм афлатоксину B₁ та продуктів його перетворень в організмі тварин

Основним шляхом потрапляння афлатоксинів в організм людини і тварин є аліментарний шлях – через кишково-шлунковий тракт. Вивчення метаболізму найтоксичнішого представника цієї групи – афлатоксину B₁ показало, що період його напіврозпаду становить 12-15 год [36].

Незалежно від шляху потрапляння в організм афлатоксин B₁ швидко виявляється в печінці. У щурів вже через 30 хв після перорального введення, значна концентрація афлатоксину B₁ виявляється в печінці, де його концентрація найбільша через 2 год [299]. З допомогою високочутливого імуноферментного методу було доведено, що що під час внутрішньо-

черевного введення афлатоксину B_1 через 2 год він, в основному, локалізується в гепатоцитах, розміщених в перипортальній зоні і зрідка в клітинах, що прилягають до центральної вени.

При вивченні динаміки внутрішньоклітинного розподілу афлатоксину B_1 в печінці щурів показано, що перші 30 хв після введення основна частина токсину зв'язувалася з фракцією цитозолу, через 2 год збільшилася кількість токсину у фракції мікросом, а до 24-тої год 50 % токсину вже було зв'язано з мікросомами і тільки біля 30 % залишалось в цитозолі [36, 146]. J. Pestka і спіавт. за допомогою імуноферментного методу під час дослідів зі зрізами печінки з афлатоксином B_1 , виявили, що переважна більшість токсину зв'язується з ядрами гепатоцитів. У нирках рівень міченого афлатоксину також найбільшим виявився в ядрах [298].

Основним шляхом виведення афлатоксину та його метаболітів з організму є їх екскреція з жовчю. У щурів, мишей та курчат вже через 5 хв після введення, у жовчі виявляли афлатоксин, максимальним їх рівень був через 30 – 45 хв [146].

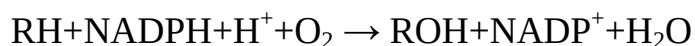
Незначна кількість афлатоксину B_1 , в основному у вигляді його метаболіту M_1 , може виводитися з молоком. Аналізуючи дані досліджень [53], можна зробити висновок, що кількість афлатоксину M_1 , що виділяється з молоком не перевищує 1 – 3 % від початкової дози афлатоксину B_1 .

Необхідно звернути увагу, що в молоці деяких видів тварин, крім афлатоксину M_1 , може знаходитися і вихідний афлатоксин B_1 : для печінки, нирок, а також сечі характерним є наявність великої кількості метаболітів, в той же час у калових масах часто виявляють кон'юговані форми афлатоксинів [64].

Шляхи перетворення афлатоксинів. Як вже було зазначено вище, афлатоксини потрапляють в організм, в основному, через всмоктування з кишково-шлункового тракту і по ворітній вені потрапляють в печінку, де відбувається їх біотрансформація. Продукти метаболізму афлатоксинів

виділяються в жовч і виводяться з фекаліями або потрапляють в нирки і виводяться з сечею. Процес біотрансформації афлатоксинів в тваринному організмі відбувається в два етапи: метаболізації та кон'югації. На етапі метаболічних перетворень під дією відповідних ферментів вони окислюються, відновлюються, гідролізують і т.п., що приводить до утворення нових функціональних груп в їх молекулах, підвищується полярність і розпочинається наступний етап – кон'югація, тобто зв'язування з такими ендogenous речовинами, як глюкуронова і сірчана кислоти, глутатіон і т. п. [67, 200]. Під час цього процесу молекула афлатоксину стає ще полярнішою, знижується її розчинність у ліпідній фазі і вона легко виводиться з організму. Слід відмітити, що кон'югація призводить до блокування функціональних молекули афлатоксину (наприклад ОН-групи), її дезактивації і, тим самим, до зниження токсичних властивостей. У процесі метаболічних перетворень в молекулі афлатоксину з'являються нові функціональні групи, що приводить до зниження токсичних властивостей. Однак, іноді в процесі метаболізму утворюються сполуки, які володіють ще токсичнішими властивостями. Це явище називається метаболічною активацією або токсифікацією [36].

Результати багатьох досліджень [85, 87, 141] довели, що метаболізм афлатоксинів відбувається за допомогою тих же ферментних систем, що й інших ксенобіотиків. Більшість метаболічних перетворень афлатоксинів каталізується монооксигеназами, що локалізовані в мембранах ендоплазматичного ретикулуму і можуть бути представлені таким чином:



Афлатоксин В₁. Доведено, що метаболічні перетворення афлатоксину В₁ за участі мікросомних монооксигеназ можуть протікати шляхом гідроксилювання в 4- або 22-му положенні з утворенням відповідно

M1 і Q₁; шляхом О-деметилування з утворенням афлатоксину Р₁; шляхом гідратації подвійного зв'язку з утворенням афлатоксину В_{2а} й шляхом епоксидування в 2,3-положенні з утворенням 2,3-епоксиду афлатоксину В₁. Крім цього, за участі NADPH-залежної дегідрогенази афлатоксин В₁ може відновлюватися до афлатоксинолу. Всі метаболіти містять гідроксильну групу й можуть вступати в реакцію кон'югації з глюкуроною кислотою, сульфатами або SH-глутатионом [170].

Афлатоксин М₁, перший з ідентифікованих метаболітів афлатоксину В₁, був виявлений у молоці корів. Для більшості біологічних видів він є основним метаболітом афлатоксину В₁ і виявляється у високих концентраціях у молоці, сечі, печінці інших видів тварин. Афлатоксин М₁ утворюється за участю цитохрому Р-448 у реакції гідроксилування афлатоксину В₁. Афлатоксин М₁ є найтоксичнішим метаболітом афлатоксину В₁, володіє канцерогенною та мутагенною активністю.

Афлатоксин Q₁, на відміну від афлатоксину М₁ має гідроксильну групу біля вуглецю, утворюється в реакції гідроксилування афлатоксину В₁ за участю цитохрому Р-450. Швидкість перетворення афлатоксину В₁ на афлатоксин Q₁ залежить від виду тварин. Найшвидше цей процес відбувається у печінці мавп (30–50 %), тоді як у печінці курчат та щурів до 2 % [13]. Афлатоксин Q₁ є менш токсичним, ніж афлатоксин В₁, також значно нижчі його канцерогенні та мутагенні властивості.

Афлатоксин Р₁ є продуктом деметилування афлатоксину В₁, був виділений із сечі мавп [13, 36, 64]. Виділяється з організму у формі глюкуронідів, сульфатів. Афлатоксин Р₁ у 10–20 разів менш токсичний, ніж афлатоксин В₁. У нього відсутні мутагенні властивості.

Афлатоксин В_{2а} – це метаболіт, що утворюється за участю мікосомальних монооксигеназ печінки. Він нетоксичний, не має мутагенних та канцерогенних властивостей, однак, на думку багатьох авторів [170]

посилює токсичність афлатоксину B_1 , здатен зв'язуватись з білками клітин, у т.ч. з ензимами.

2,3-епоксид афлатоксину B_1 – активована форма афлатоксину B_1 , його головний канцерогенний метаболіт. Цей метаболіт є недовготривалою сполукою, однак високо реакційноздатною. Взаємодіючи з водою, він може перетворюватися в дигідродіол афлатоксину B_1 . Проте він може підлягати детоксикації і шляхом кон'югації з SH-глутатіоном. При цьому глутатіон є єдиною низькомолекулярною сполукою, з якою епоксид активно реагує з утворенням 2,3-дигідро-2-(S-глутатіопіл)-3-гідрокси-афлатоксин B_1 [36, 90]. Цю реакцію каталізує глутатіонтрансфераза.

У культурі гепатоцитів щурів зменшення внутрішньоклітинного рівня SH-глутатіону супроводжувалося посиленням утворенням аддуктів афлатоксину B_1 та зниженням SH-глутатіону в печінці щурів, що супроводжувалося виразним підвищенням гепатотоксичної дії афлатоксину B_1 [13]. У той же час у дослідях зі щурами, курчатами і крільчатами спостерігалось зниження токсичної дії афлатоксину B_1 при введенні тваринам SH-глутатіону, цистеїну, а також речовин, що підсилювали синтез ендогенного SH-глутатіону в печінці [164]. Важливо, що додавання глутатіону та інших тіолових сполук попереджувало активацію афлатоксину B_1 *in vitro* і призводили до повної втрати його мутагенної активності [36].

Епоксид афлатоксину B_1 взаємодіє з нуклеофільними ділянками молекул ДНК, РНК і білків, що призводить до біохімічних порушень, які лежать в основі токсичної та канцерогенної дії. Слід зауважити, що на відміну від інших активних форм афлатоксину B_1 , епоксид значно активніше атакує нуклеїнові кислоти, в порівнянні з білками.

Вважається, що аддукти епоксиду афлатоксину B_1 з білками утворюються у результаті його взаємодії з первинними аміногрупами. Первинні аддукти афлатоксину B_1 з ДНК у фізіологічних умовах є нестійкими сполуками [90].

Афлатоксикол – продукт зворотного відновлення афлатоксину B_1 , що каталізується в цитозолі за участю NADPH-залежної дегідрогенази. Перетворення афлатоксину B_1 на афлатоксикол відбувається у крові тварин, безпосередньо в еритроцитах. У деяких видів тварин (кролі, райдужна форель) цей процес може бути зворотним (афлатоксикол перетворюється на афлатоксин B_1), чим і пояснюється висока чутливість їх до афлатоксинів. Канцерогенні та мутагенні властивості афлатоксиколу є меншими, ніж у афлатоксину B_1 [50].

1.3. Токсини грибів роду *Aspergillus* і джерела їх надходження до організму тварин

В останні роки актуальність проблеми мікозів та мікотоксикозів постійно зростає. Відзначено, що проблема мікотоксинів є складовою частиною глобальної проблеми забруднення біосфери. У зв'язку зі зростанням антропогенного впливу на геобіоценози зростає кількість конідій в атмосфері, а отже зростає ризик їх попадання в організм людини і тварин.

Мікотоксини грибів роду *Aspergillus* класифікують за ураженнями окремих органів і систем тварин [13, 58, 71, 146, 148, 176, 212]:

- нейротоксикози, до яких належать мікотоксикози, що супроводжуються тремором (*Aspergillus fumigatus*, *A. egyptiacus*);
- гепатотоксикози – включають мікотоксикози, що викликаються афлатоксинами (продуценти *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. arachidicola*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*) та коєвою кислотою (*A. flavus*, *A. oryzae*, *A. candidus*, *A. minisclerotigenes*), синдром Рейя та цирози печінки, які

викликаються стеригматоцистином (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. rambellii*, *A. discophorus*, *A. multicolor*, *A. nidulans*, *A. ustus*);

- нефротоксикози – до яких відносять мікотоксичну нефропатію свиней, в етіології якої основне значення має охратоксин (продуценти *Aspergillus ochraceus*, *A. albertensis*, *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. sulphureus*) та цитринін (продуценти *Aspergillus candidus*, *A. niveus*).

Основними продуцентами афлатоксинів є гриби роду *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* [164, 179, 229, 250, 289]. Це широко розповсюджені в природі організми з сапротрофним типом живлення, які отримують поживні речовини осмотрофно, вегетуючи на різноманітних органічних субстратах.

Aspergillus flavus, *Aspergillus pseudotamarii* і *Aspergillus ochraceoroseus* продукують тільки афлатоксини В, а *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, *A. parasiticus* і неназваний таксон із Західної Африки продукують як В, так і G токсини. Афлатоксини спочатку були ізольовані з *A. flavus* звідси і назва – FLA-токсину. М₁ і М₂ є окислювальними формами афлатоксину В₁, що утворюються в травному тракті деяких тварин, ізольовані з молока, сечі і калу [161, 300].

Провідна роль серед мікроскопічних грибів, які продукують мікотоксини, належить *A. flavus* [30, 164, 250]. Цей вид є одним з найпоширеніших ґрунтових грибів і тих, що вегетують у житлових приміщеннях, виявляється на рослинних залишках, листі дерев, напівзгнилій деревині, зерні, бавовні, компості, загиблих тваринах, тілі хворих людей і тварин, а також у повітряному середовищі всередині і зовні приміщень, вентиляційних системах [234, 305]. *A. flavus* може активно рости в широкому температурному діапазоні (12–48°C), й саме температурна толерантність сприяє патогенності гриба щодо теплокровних тварин і людини [305]. *A. flavus* здатний уражати й однодольні, й дводольні рослини, інфікувати

насіння, яке утворюється як на надземних пагонах, так і під землею [179]. Відомо, що цей патогенний гриб спричиняє хвороби багатьох сільськогосподарських рослин: кукурудзи (маїсу), бавовнику, арахісу, горіхів (фундук, пекан, фісташки, грецький і бразильський горіхи). Основним джерелом надходження афлатоксинів до організму тварин є, як вважають, три види забруднених грибами-продуцентами кормів: зерно (ячмінь, овес, пшениця), насіння бавовнику, арахіс. Меншою мірою гриби вражають бобові та олійні культури [233, 281, 286].

Забруднення афлатоксинами сільськогосподарської продукції може збільшуватись за неправильних умов її утримання. Потенційну небезпеку для харчування становить вогке й подрібнене зерно, оскільки волога і механічне пошкодження сприяють, відповідно, росту й інвазії токсигенних грибів-продуцентів [233]. Слід зазначити, що афлатоксини активно синтезуються під час збирання і зберігання врожаю, приготуванні деяких харчових продуктів [297].

1.4. Умови росту грибів-продуцентів мікотоксинів

Забруднення борошна, овочів, картоплі, фруктів та іншої сільськогосподарської продукції мікотоксинами становить велику загрозу для людей і тварин. Ці токсини можуть накопичуватися у зерні в період вегетації рослин, під час і після збору врожаю. У процесі зберігання зерна, висушеного до кондиційної вологи, відбувається поступове зараження зерна цвілевими грибами. Порушення правил і норм зберігання зерна, висівки, комбікормів супроводжується їх повторним зволоженням, спричиняє інтенсивне утворення і накопичення мікотоксинів. У повітрі міжзернового простору в свіжозібраному зерні наявна достатня кількість кисню для розвитку цвілевих грибів [88].

Герметичність досягається, як правило, повним завантаженням зерносховища та мінімальним надзерновим простором. Мікофлора зерна представлена родами *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Nigrospora*, *Diplodia*, *Ascochita*, *Botritis*, *Sclerotinia* та ін. Серед фузаріїв найчастіше виявляють *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. sambucum*, *F. equiseti* та ін. [73, 121].

У низці досліджень доведено, що продукти переробки та розмелювання зерна частіше уражуються цвільовими грибами, ніж саме зерно. Відомо, що в основному мікофлора знаходиться на поверхні зерна, й проникає в середину під час його переробки. Тому така борошняна продукція як висівки, борошняний пил, комбікорми є легкодоступними для мікроорганізмів і продуктів їх метаболізму. Потенційно небезпечними завжди є зерновідходи, які складаються із битого та пошкодженого шкідниками зерна. Забрудненню комбікормів мікотоксинами також сприяє його висока гігроскопічність, великий запас поживних речовин у зв'язку із збагаченням їх вітамінами та мікроелементами. Мікроміцети у комбікормах представлені родами *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. candidus*, *A. rimigatus*) і *Penicillium* [5,13, 173].

У більшості випадків, зараження грибами відбувається безпосередньо в полі під час збирання врожаю або його транспортуванні. Мікотоксини утворюють в продуктах харчування та кормах при порушенні норм зберігання, підвищенній вологості, температурі вище 10°C.

Мікотоксини інтенсивно продукуються грибами при абсолютній вологості кормів більше 12%, відносній вологості повітря 80 – 90% та в діапазоні температур від 10 до 42°C [120]. Ураження рослин токсигенними грибами починається від початку їх вегетації. Доведено пряму залежність між розвитком мікроскопічних грибів на харчових субстратах, їх здатністю до токсиноутворення, температурою і вологістю навколишнього середовища. Оптимальною умовою для синтезу токсичних метаболітів є вологість повітря 90-95%, що відповідає вологості зерна 18-21 % [7].

Більшість мікроміцетів росте за температури 0-60°C. Їх спори добре переносять низьку температуру, зберігають життєдіяльність протягом декількох місяців при температурі -20° – +20°C. Оскільки, спори цвілевих грибів містяться в ґрунті, вони можуть забруднювати сільськогосподарські культури. Певну роль відіграє пошкодження рослин та плодів комахами-переносниками *Aspergillus*, несвоєчасне збирання врожаю, недостатнє висушування його перед зберіганням або зберігання і транспортування продуктів при недостатньому їх захисті від зволоження [5, 13]. Все це призводить до розмноження мікроміцетів та утворення ними токсичних речовин – мікотоксинів.

При ураженні зерна грибами відбувається процес його самозігрівання. Спочатку, коли температура підвищується до 24-30° С, зменшується сипучість зерна, проявляється запах цвілі, інколи сипучість майже не змінюється, зберігається колір, хоча окремі зерна набувають темного відтінку. За температури 34-38° С, зменшується сипучість зерна, появляється солодовий запах, велика кількість потемнівших зерен та з нальотом цвілі. Якщо температура підвищується до 50°C та вище, різко зменшується сипучість зерна, з'являється запах гниття, зерно інтенсивно темніє. Завершується процес повною втратою сипучості зерна та його почорнінням [173].

1.5. Допустимі рівні й діагностика афлатоксинів у харчових продуктах і кормах

За даними 30-ти розвинених країн світу, найбільшу небезпеку становлять токсини грибів родів *Aspergillus* та *Fusarium*. Не зважаючи на велике різноманіття і токсичність мікотоксинів, лише деякі з них регламентовані в продуктах, кормах та продовольчій сировині на законодавчому рівні в Україні. Це стосується зокрема афлатоксинів

(0,005 мг/кг), Т-2 токсину (0,1 мг/кг), дезоксиніваленолу (0,5 мг/кг), патуліну (0,05 мг/кг) та зеараленону (1 мг/кг) у твердій пшениці (табл. 1.2.).

Таблиця 1.2

Допустимі рівні мікотоксинів у пшениці [24, 27, 28]

Мікотоксин	Норма, мг/кг	Метод контролювання
афлатоксин В ₁	0,005	Згідно з МР 2273, МР 4082, ДСТУ EN 12955
Зеараленон	1,0	Згідно з МР 2964
Т-2 токсин	0,1	Згідно з МР 3184
дезоксиніваленон (вомітоксин)	0,5	Згідно з МР 3940, МУ 5177
охратоксин А	0,005	Згідно з ДСТУ EN ISO 15141-1, ДСТУ EN ISO 15141-2

Дія більшості мікотоксинів на тваринний організм полягає в здатності пригнічувати синтез білка і нуклеїнових кислот [189]. Вміст мікотоксинів у кормах навіть у незначних кількостях (0,1 мг/кг) може призвести до зниження продуктивності, репродуктивних якостей та імунного статусу тварин і, як наслідок, до суттєвих економічних втрат [24, 207].

Вмісту мікотоксинів у кормі, як правило, недостатньо, щоб викликати явну хворобу. Проте навіть низький рівень токсинів може викликати метаболічні порушення, що призведуть до поганого стану здоров'я тварини. Ці порушення часто важко розпізнати, оскільки клінічні ознаки хвороби часто вказують на інфекцію, а не на токсин, що її спровокував [139, 146, 302].

За рекомендаціями Управління з контролю за харчовими продуктами і лікарськими препаратами США (FDA, Food and Drug Administration) максимальні концентрації афлатоксинів у продуктах харчування людини і кормах тварин не можуть перевищувати 20 нг/г і 300 нг/г відповідно [58, 77, 78, 115, 300].

За нормами, прийнятими Європейським Союзом, максимальні рівні афлатоксину М1 у молоці й молочних продуктах не можуть перевищувати 50 нг/кг [2, 207, 233]. Проте Управління з контролю за харчовими продуктами і лікарськими препаратами США допускає максимальну концентрацію афлатоксину М1 у молоці 500 нг/кг. Цей рівень погоджений із Комісією ООН з питань харчування та сільського господарства (FAO, Food and Agricultural Organization of the United Nations) та Всесвітньою організацією охорони здоров'я (World Health Organization) [58, 77, 78, 115, 300].

Отже, подані відомості свідчать про те, що стратегічною проблемою нині є контроль за забрудненням афлатоксинами сільськогосподарської продукції з метою попередження розвитку афлатоксикозів та погіршення здоров'я тварин і людини.

Діагностика мікотоксикозів. Діагноз «мікотоксикоз» ставлять на основі комплексних досліджень анамнезу, епізоотичного аналізу, клінічної картини, патологоанатомічних змін, результатів хіміко-токсикологічних та мікологічних досліджень. Для мікотоксикозів характерним є раптовість виникнення, масовість та одночасність захворювання великих груп тварин. Окрім того, тварини, які переохворіли, можуть захворіти повторно. Кожен із мікотоксинів не має добре вираженої специфічної дії на організм тварини, всі вони викликають подібні клінічні ознаки. Отруєння мікотоксинами може бути гострим і хронічним. Гостра інтоксикація мікотоксинами супроводжується тремором скелетних м'язів, пригніченням або збудженням, порушенням координації руху, судомою, ослабленням і втратою рефлексів, розладами травлення (пронос або запор), серцевою недостатністю [144, 160, 164, 177, 191, 210].

Хронічна інтоксикація призводить до затримки росту та розвитку, розладів травлення, підвищення температури тіла, нервових розладів і порушенням роботи органів дихання. Для багатьох мікотоксикозів

характерним є некротичне ураження шкіри з появою тріщин та виразково-некротичні зміни на слизових оболонках, особливо ротової порожнини. Мікотоксикози можуть супроводжуватися лейкопенією, еритропенією, тромбоцитопенією і зменшенням рівня гемоглобіну, запальними процесами в травному тракті, геморагічним діатезом, дистрофічними змінами в паренхіматозних органах, набряком легень, ураженням печінки та органів імунної системи [243, 245, 248, 277].

На першому етапі діагностування мікотоксикозів ставиться попередній діагноз на основі анамнестичних даних, клінічних, патологоанатомічних та гістологічних досліджень. На другому етапі ставиться заключний діагноз на основі санітарно-мікологічного аналізу кормів та виділення мікотоксину з корму, а також із органів і тканин хворих та загинблих тварин [5, 13].

На сьогодні існує великий спектр методів визначення мікотоксинів у продуктах харчування і кормах [6, 154, 282]. Широко застосовується високоефективна рідинна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія з мас-спектрометрією, газова хроматографія з мас-спектрометрією [164, 282, 303]. Однак недоліком цих методів є велика кількість псевдопозитивних результатів, а також проблеми, що виникають у разі кількісного визначення мікотоксинів у низьких концентраціях. Описано спроби біосенсорного визначення мікотоксинів на основі кондуктометричних та амперметричних датчиків, а також пристроїв на основі поверхневого плазмонного резонансу [160, 268].

В останні роки в багатьох країнах одержали поширення імуноферментні методи визначення афлатоксинів, охратоксину А, ДОН, зеараленону і фумонізинів, застосування яких дозволяє швидко встановити наявність або відсутність мікотоксинів [24, 154].

Для напівкількісного визначення афлатоксину В₁ розроблено колориметричні тест-системи на основі твердофазового імуноферментного аналізу, які є найперспективнішими з розроблених на сьогодні методів

визначення афлатоксинів [24, 52]. Відомо, що загальним недоліком біосенсорних методів визначення, а також методів твердофазового імуноаналізу є низька стабільність біомолекул у зовнішньому середовищі, необхідність розроблення методів іммобілізації біомолекул на поверхні фізичних перетворювачів, а також необхідність стабілізації антитіл або рецепторів у складі тест- та біосенсорних систем протягом тривалого зберігання [166].

Останнім часом значну увагу дослідників, що працюють у галузі новітніх біотехнологій, привернуло створення штучних аналогів біологічних рецепторів та антитіл і застосування їх для розроблення нового покоління біосенсорних пристроїв. Значного поширення для синтезу таких матеріалів набув метод молекулярного імпринтингу [32, 205, 209].

Аналіз експресії генів використовується для з'ясування біосинтетичних шляхів окремих мікотоксинів та факторів, які впливають на структуру та кількість мікотоксинів, створених одним чи декількома грибовими видами. Аналіз експресії генів може бути хорошим підходом для аналізу ситуації, коли тварини зазнають впливу більш ніж одного мікотоксину в той же самий час [165, 246, 304, 308].

Дослідження одночасного впливу декількох мікотоксинів: афлатоксинів, охратоксину А, фумонізіну, Т2-токсину, цитриніну, підтвердило, що навіть низькі концентрації окремих комбінацій мікотоксинів можуть мати негативний вплив на здоров'я тварин [236, 246, 247]. Дослідження проводили в рамках вирішення проблеми впливу «замаскованих» мікотоксинів. Встановлено, що в деяких випадках мікотоксикозів, клінічні спостереження у тварин не корелювали з низьким вмістом мікотоксинів у кормах. Через те, несподівану появу високої токсичності пояснили непоміченими, сполученими формами мікотоксинів, які можливо гідролізуються до попередніх токсинів в шлунково-кишковому тракті тварини [13, 309].

1.6. Методи детоксикації афлатоксинів

Забруднення сільськогосподарських продуктів мікотоксинами важко уникнути, оскільки воно відбувається в усьому навколишньому середовищі. Токсичність мікотоксинів виявляється за малих концентрацій у кормах (понад 5–10 мг/кг) [233, 302]. Цим вони відрізняються від інших токсичних метаболітів, що виробляються мікроорганізмами.

Контроль за рівнями мікотоксинів необхідний на всіх етапах виробництва, транспортування, збереження і переробки зерна і зернопродуктів, а також у процесі їх детоксикації – використання достовірних, простих і недорогих методів аналізу.

У ряді лабораторій світу розробляються генетичні методи контролю чисельності популяцій токсигенних грибів. Проте питання мінливості видового складу токсигенних грибів, особливості їх життєвого циклу, екології й еволюції потребують ретельного аналізу.

Після збирання врожаю істотними чинниками, що визначають утворення мікотоксинів, є вологість зерна, температура і тривалість термінів його збереження до висушування. Для припинення життєдіяльності грибів зерно слід негайно висушити до вмісту вологи 13-15% і потім охолодити вентильованням до температури зберігання [7, 64].

Одним з найбільш ранніх прийомів із знезараження зернових продуктів є вимочування. В основі методу детоксикації зерна шляхом вимочування лежать два механізми [13]: 1) екстракція водорозчинних мікотоксинів; 2) трансформація ензимами, що містяться в зерні.

Процес деконтамінації зерна – це спрямований вплив фізичних, хімічних чи біологічних факторів або їх комбінацій, внаслідок якого відбувається руйнування мікотоксинів. Зерно обробляється деконтамуючими факторами після висушування або у водному середовищі. У більшості випадків другий підхід виявляється ефективнішим через те, що, по-

перше, переважна кількість реакцій, що ведуть до детоксикації, відбувається у водному середовищі, по-друге, в сухому субстраті мікотоксини менш доступні для дії як фізичних, так і для хімічних агентів. Недоліком цього підходу є необхідність видалення залишків хімічних агентів, наявність яких в кормах небажана, продуктів трансформації мікотоксинів, щоб уникнути можливості зворотних реакцій і реакцій активації. Крім того, після завершення деконтамінації зерно необхідно висушити, а це потребує додаткових енергетичних витрат.

Варто підкреслити, що до теперішнього часу багато методів детоксикації залишаються малопридатними (наприклад, фракціонування зерна за питомою масою), або ж вони надмірно дорогі, або не пристосовані для технологій переробки зерна (наприклад, екстрагування за допомогою органічних розчинників), або занадто складні для рутинної детоксикації зерна [13, 27, 116, 172, 173].

Мікотоксини через згодовування заражених кормів потрапляють в організм тварин, а звідти відповідно в м'ясо і молоко, що споживає людина. При використанні запліснявілої сировини для виробництва круп чи борошна мікотоксини в круп'яних і хлібобулочних виробках можуть досягти небезпечних концентрацій. Мікотоксини є стійкими до нагрівання, пастеризації, кулінарної обробки [5, 24, 71, 94, 208].

Існують два основні методи зниженні концентрації вільних афлатоксинів. До корму додають сорбенти, які зв'язують токсин і запобігають його всмоктуванню у кишковому тракті. Найчастіше для цієї мети використовують добавки на основі мінеральних глин (цеолітових, бентонітових, алюмосилікатних), комплексних карбогідратів та активованого вугілля. Однак ці сорбенти не дуже ефективні і призначені тільки для тварин [13, 32, 173, 204].

На сьогодні найбільш оптимальними методами детоксикації мікотоксинів для кормів у тваринництві та птахівництві вважається

використання ентеросорбентів. Сорбенти знижують біологічну активність мікотоксинів, зменшують всмоктування токсинів у шлунково-кишковому тракті, захищають продукцію тваринництва від забруднення мікотоксинами. Метод сорбції вважається найбільш ефективним і безпечним для тварин. Ідеальний ентеросорбент повинен здійснювати такі функції: поглинання токсичних метаболітів, що утворюються безпосередньо в шлунково-кишковому тракті та токсинів, які потрапляють туди ззовні та із крові зворотним шляхом; зв'язування токсичних речовин, які виділяються разом із травними соками.

Лікувальний ефект сорбенту досягається за рахунок фізико-хімічних властивостей сорбуючої речовини, яка здатна зв'язувати та виводити з організму токсичні продукти. Не дивлячись на те, що на ринку є багато ентеросорбентів: «Чек-о-токс», Індія, «Клінофід», Великобританія; «Екосорб», Естонія; «Baracid», Польща; «Toxidex-premix», Іспанія; «Салкіл», Великобританія; «Мікотокс NG», Франція; «Мікофікс», Австрія; «Зеніфікс», Аргентина; «Фрітокс», Нідерланди; «Біотокс», Німеччина; «Сорбатокс», Великобританія; «Бактацид», Великобританія; «Альфасорб», Україна; «Кормосан» Україна; «Активоване вугілля», Україна; «Міколад», Україна; «Вітакорм-Рео», Україна; «Мікосорб», Україна [23, 33], цей напрям є найбільш перспективним, а пошук і розробка «ідеального сорбенту» на сьогодні триває.

У низці наукових праць наявні дані щодо деградації охратоксину А, фумінізинів В₁ та В₂, деоксиніваленолу та Т-2 токсину [162, 267] за участю дріжджів *S. cerevisiae*. Дріжджі *Phaffia rhodozyma* продукують антиоксидант астаксантин й привертають увагу як можливий сорбент афлатоксинів у кишково-шлунковому тракті.

Ефективним новим способом нейтралізації АFB₁ є озонування кормів і продуктів рослинного походження. Це дешевий метод, який дозволяє швидко обробити великі обсяги продукції. Однак і він не руйнує афлатоксини

повністю. Для деконтамінації зерна використовують насичену озоном воду. При дії озону відбувається деградація афлатоксинів B1, B2, G1 і G2 [87, 261].

В експериментах *in vitro* озон розкладав AFB₁ за 5-10 хвилин, а ступінь його деградації залежала від концентрації O₃. Подальше додавання модифікованих наноалмазів в оброблені озоном зразки, призводить до подальшого зниження концентрації AFB₁. При вмісті токсину менше 0,1 мкг/мл вдалося домогтися його повного розкладання. Тому дослідники пропонують спочатку проводити об'ємне озонування продуктів, заражених AFB₁, а потім застосовувати гідрозолі модифікованих наноалмазів для адсорбції залишкового токсину. Такий спосіб ефективніше, ніж використання двох методів детоксикації окремо [32, 205, 209].

Руйнування мікотоксинів (афлатоксинів, охратоксинів, цитриніну, пеніциллової кислоти, зеараленону, патуліну) досягається шляхом обробки кормів розчинами кислот і лугів, проте використання таких методів у значній мірі утрудняється через агресивність вказаних чинників. Була випробувана велика кількість різноманітних хімічних речовин щодо їх властивості викликати деконтамінацію зерна або корму, деякі речовини виявилися ефективними, проте усі вони – за винятком аміаку і бісульфіту – виявилися або непрактичними, або викликали утворення токсичних залишків [173].

Відомо, що властивістю руйнувати афлатоксини і ряд інших мікотоксинів характеризується аміак (за різних температур і тиску), а також солі амонію [24]. Обробка кормів аміаком, забруднених мікотоксинами, веде до поліпшення їх поживності для курчат, про що свідчать ріст і конверсія корму [128, 204].

Обробка аміаком чи монометиламіном неефективна щодо афлатоксинів, зеараленону і охратоксинів. Ефірні і лактонні групи, наявні у складі молекул зеараленону і споріднених йому сполук, а також охратоксинів

і афлатоксинів, взаємодіють з первинними та вторинними амінами, в результаті чого утворюються амідні, що корінним чином змінює властивості молекул мікотоксинів. Однак розрив лактонного кільця за впливу цих речовин відбувається лише при інкубації від півгодини до декількох годин і тиску від 3 до 10 бар у сильно лужному середовищі, за температури 100°C. Встановлено, що вуглеамонійні солі (ВАС) здатні руйнувати афлатоксини B₁ і G₁, а також Т-2 токсин з утворенням Т-2 тріолу і Т-2 тетраолу [23, 24]. ВАС володіють сильною фунгіцидною, бактерицидною і інсектицидною дією. Залежно від виду і вологості зерна концентрація ВАС повинна становити від 2,5 до 4,5%.

Одним із популярних методів детоксикації є обробка ультразвуком. Метод заснований на явищі ультразвукової мікрокавітації – локальному хвилеподібному утворенню пор (бульбашок) із зниженим тиском. Даний метод дозволяє знизити концентрацію Т-2 токсину, НТ-2 токсину, ДОНу, зеараленону, охратоксинів і афлатоксинів у зерні злакових на 70-80% [10, 13, 263].

Під час ультразвукової обробки ефективно руйнується епоксидна група мікотоксинів, що відіграють ключову роль в механізмі токсичної дії. Гідролізу епоксигрупи сприяє зрушення кислотно-лужної рівноваги, як у бік зниження, так і в бік підвищення рН. Для залуження середовища можна використовувати карбонати, а також первинні і вторинні аміни. У ролі каталізаторів можуть виступати спирти, наприклад, метанол, етанол, пропанол, гліцерин або поліетиленгліколь. Крім участі у трансформації мікотоксинів, спирти, присутні в реакційній суміші, покращують змочування зерна і підвищують розчинність мікотоксинів і, отже, їх екстракцію із зерна. Після завершення ультразвукової обробки, реакційну суміш зливають, а зерно промивають водою, при необхідності повторно піддаючи впливу ультразвуку, і висушують.

Необхідно не допускати згодовування птиці кормів, вміст мікотоксинів в яких перевищує визначені рівні для профілактики і зменшення несприятливих наслідків мікотоксикозів. Корми для молодняку, племінної птиці, а також для поголів'я у періоди перед вакцинаціями і після вакцинацій не повинні містити будь-які мікотоксини в будь-яких концентраціях [5].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт досліджень і постановка експерименту

Дослідження проводили впродовж 2009-2015 років на білих безпородних щурах масою 180-200г, яких утримували в умовах віварію на стандартному раціоні *ad libitum* з необмеженим доступом до питної води, дотримуючись рекомендацій щодо поводження з лабораторними тваринами.

На першому етапі експериментальних досліджень вивчали метаболічні порушення в тканинах печінки, головного мозку, нирок, серця та еритроцитах під впливом афлатоксину В₁ (Sigma, США) за різних доз і способів введення в організм (внутрішньочеревна ін'єкція дозою 0,5 мг/кг та щодобове введення в шлунок дозою 0,025мг/кг щодоби впродовж 14-ти діб).

Другий етап дослідної роботи був присвячений дослідженню можливості корекції наслідків експериментальної інтоксикації афлатоксином В₁ за допомогою введення антиоксидантів – вітаміну Е, препарату «Е-Селен» (ЗАТ «Ніта-Фарм») і біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma*. Дози для інтоксикації тварин дослідної групи афлатоксином підбирали, виходячи з джерел наукової літератури [40, 216, 233].

Високопродуктивний штам IBM Y-5021 дріжджів *Phaffia rhodozyma* був наданий для досліджень лабораторією біотехнології мікроорганізмів Інституту біології тварин НААН. Цей штам синтезує 20 мг каротиноїдів на грамм сухої маси.

Пошук можливих ефективних протекторів для корекції порушень спричинених афлатоксином В₁, здійснювали, користуючись даними, наявними у наукових джерелах та спираючись на результати досліджень, проведених на перших етапах дослідної роботи.

Моделями токсичного ураження тварин слугувала гостра і підгостра інтоксикація АFB₁ за різних доз (одноразово – 0,5 мг/кг маси; щодобово –

0,025 мг/кг маси, протягом 14 діб) і способів введення (парентерально і внутрішньошлунково). Сухий афлатоксин В₁ (Sigma, США) перед введенням розводили в оливковій олії. Всього проведено 5 етапів досліджень. Всього в дослідженнях використано 140 щурів. Кожна дослідна група налічувала по 5-7 особин, контрольна група – 20 особин.

На першому етапі проводили модельні експерименти з використанням лабораторних щурів, яких поділили на 3 групи. Афлатоксин В₁, розчинений у кип'яченій оливковій олії, щурам вводили одноразово, внутрішньочеревною ін'єкцією дозою 0,5 мг/кг маси тіла (дослідні групи Д1–Д2). Тваринам контрольної групи (К) вводили кип'ячену оливкову олію у такому самому об'ємі. Евтаназію тварин і відбір дослідного матеріалу проводили на 7-му (Д1) і 14-ту (Д2) доби після введення токсину.

На другому етапі проводили дослід з використанням трьох груп тварин: дослідним групам (Д3, Д4) щодоби вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда дозою 0,025 мг/кг маси тіла афлатоксин В₁, розчинений у кип'яченій оливковій олії. Щурам групи Д3 вводили АFB₁ упродовж 7-ми діб, а щурам групи Д4 – впродовж 14-ти діб. Тваринам контрольної групи (К) вводили кип'ячену оливкову олію у такому самому об'ємі. Евтаназію щурів груп Д3 і Д4 та відбір матеріалу для досліджень у них здійснювали через 24 год після останнього введення афлатоксину В₁.

На третьому етапі модельних досліджень оцінювали ефективність використання живих культивованих дріжджів *Phaffia rhodozyma* для корекції зумовлених афлатоксином В₁ метаболічних порушень. Афлатоксин, розведений у кип'яченій оливковій олії, вводили щодоби внутрішньошлунково дозою 0,025 мг/кг маси тіла щурам груп Д5 і Д6 упродовж 7-ми і 14-ти діб відповідно. Тваринам груп Д7 і Д8 крім афлатоксину щодоби вводили внутрішньо-шлунково препарат культивованих дріжджів *P. rhodozyma* дозою 1,5 г/кг маси тіла. Щурам груп Д9 і Д10 щодоби вводили препарат дріжджів *P. rhodozyma* дозою 1,5 г/кг маси тіла

відповідно впродовж 7-ми і 14-ти діб. Тваринам контрольної групи (К) вводили кип'ячену оливкову олію у такому самому об'ємі. Евтаназію щурів груп Д5–Д8 і відбір матеріалу для досліджень здійснювали через 24 год після останнього введення афлатоксину В₁, а щурів груп Д9 і Д10 – відповідно через 7 і 14 діб після введення *P. rhodozyma*.

На четвертому етапі досліджували можливість корекції метаболічних порушень, спричинених афлатоксином В₁, введенням вітаміну Е. АFB₁, розведений у кип'яченій оливковій олії, вводили щодоби внутрішньошлунково дозою 0,025мг/кг живої маси щурам групи Д11 – упродовж 7-ми діб, а щурам групи Д12 – впродовж 14-ти діб. Тваринам груп Д13 і Д14 одноразово внутрішньошлунково вводили вітамін Е дозою 100 мг/кг маси за 1 год до першого введення афлатоксину В₁. Щурам груп Д15 і Д16 вітамін Е вводили внутрішньошлунково дозою 100 мг/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи (К) вводили кип'ячену оливкову олію у такому самому об'ємі. Евтаназію щурів груп Д11–Д14, відбір матеріалу для досліджень здійснювали через 24 год після останнього введення афлатоксину В₁, а щурів груп Д15 і Д16 – відповідно через 7 і 14 діб після введення вітаміну Е.

На п'ятому етапі досліджували можливість корекції метаболічних порушень, спричинених афлатоксином В₁, введенням препарату «Е-Селен». Афлатоксин В₁, розведений у кип'яченій оливковій олії, вводили щодоби внутрішньошлунково дозою 0,025 мг/кг маси тіла щурам групи Д17 – впродовж 7-ми діб, а щурам групи Д18 – впродовж 14-ти діб. Препарат «Е-Селен» вводили дозою 0,05 мл/кг маси тіла тваринам груп Д19 і Д20 внутрішньом'язовою ін'єкцією за 1 год до першого введення афлатоксину В₁. Щурам груп Д21 і Д22 вводили препарат «Е-Селен» одноразовою внутрішньом'язовою ін'єкцією дозою 0,05 мл/кг. Тваринам контрольної групи (К) вводили кип'ячену оливкову олію у такому самому об'ємі. Евтаназію щурів груп Д17–Д20, відбір матеріалу для досліджень здійснювали

через 24 год після останнього введення афлатоксину В₁, а щурів груп Д21 і Д22 – відповідно через 7 і 14 діб після введення препарату «Е-Селен».

Евтаназію щурів контрольних груп відбір матеріалу для досліджень здійснювали через 7 і 14 діб після введення кип'яченої оливкової олії. Евтаназію тварин проводили згідно з біотичними вимогами стосовно тварин, що відповідають Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р., з дотриманням вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) та загальних етичних принципів експериментів на тваринах, схвалених на Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001).

2.2. Отримання експериментального матеріалу

Матеріалом досліджень були тканини (печінка, головний мозок, нирки, серце, плазма) щурів, отримані після евтаназії, яку здійснювали декапітацією під легким ефірним наркозом.

Кров збирали у пробірки з гепарином, відділяли плазму центрифугуванням при 3 000 g впродовж 15 хв.

Відібрані після евтаназії тканини (печінка, головний мозок, нирки, серце), охолоджували у фізіологічному розчині, підсушували фільтрувальним папером, зважували та заморожували у рідкому азоті для подальших досліджень.

Гомогенати готували із заморожених у рідкому азоті зразків, розтираючи їх у фарфоровій ступці та гомогенізуючи за допомогою гомогенізатора MPW-324 (Польща) при 4 000 об./хв., додаючи охолоджений до 0°C 0,05 М тріс-НСІ буфер (рН 7,5) у масовому співвідношенні тканина:буфер – 1:9. Одержані гомогенати центрифугували за допомогою

центрифуги MLW-T23D (Німеччина) при 10 000 g впродовж 30 хв., використовуючи для досліджень надосадову рідину.

Всі вимірювання під час визначення досліджуваних показників здійснювали за допомогою приладів, які пройшли метрологічну перевірку.

2.3. Визначення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів

2.3.1. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Визначення вмісту кінцевих продуктів ПОЛ, які взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) в досліджуваних зразках здійснювали методом, описаним Н. Ohkawa та співавт. [220]. Досліджуваний зразок розводили в 0,15 М фосфатному буфері, потім додавали для стимуляції процесів пероксидного окиснення феруму (II) сульфат і аскорбінову кислоту та інкубували на водяній бані при 37°C впродовж 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням трихлороцтової кислоти. Суспензію центрифугували і до аліквоти супернатанту додавали 0,7%-ний розчин тіобарбітурової кислоти (ТБК). Після закінчення інкубації вимірювали інтенсивність забарвлення досліджуваних зразків при 532 нм. Вміст ТБК-активних продуктів виражали в нмоль/г тканини.

2.4. Дослідження активності ензимів антиоксидантної системи та вмісту відновленого глутатіону

2.4.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) визначали за рівнем інгібування ензимом процесу відновлення нітросинього тетразолію за наявності NADH і феназинметасульфату методом, описаним Е. Дубініною і

співавторами [12]. До гомогенату тканин досліджуваних органів додавали суміш етилового спирту та хлороформу (в кінцевих концентраціях, відповідно, 30% і 15%) для осадження сполук, які перешкоджали визначенню ензимної активності, і після перемішування центрифугували впродовж 15 хв при 12 000 g.

Аліквоту надосадової рідини, отриманої після центрифугування, додавали в інкубаційну суміш, яка містила 0,15 М Na-фосфатний буфер (рН 7,8), 1×10^{-6} М EDTA, $0,4 \times 10^{-3}$ М нітросиній тетразолій, $1,8 \times 10^{-6}$ М феназинметасульфат, $0,1 \times 10^{-6}$ М NADH, 1 мг желатину (загальний об'єм 3 мл). Контрольні проби містили ті ж самі компоненти крім надосадової рідини. Реакцію запускали додаванням NADH до дослідних і контрольних проб. Інкубацію здійснювали впродовж 10 хв у темряві за температури 20°C в аеробних умовах. Екстинкцію вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при $\lambda=540$ нм. Ензимну активність розраховували, визначаючи пригнічення рівня відновлення нітросинього тетразолію в дослідній пробі за 1 хв – Т (%).

Активність супероксиддисмутази розраховували за формулою:

$$A = T\% / (100 - T)\%.$$

Перерахунок здійснювали на 1 г білка.

2.4.2. Визначення активності глутатіонпероксидази

Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали методом А. Р. Гаврилова та співавт. [11] з використанням гідропероксид-трет-бутилу (ГПТБ) як субстрату.

Принцип методу полягає у використанні відновленого глутатіону глутатіонпероксидазою під час інкубації гомогенату тканин з ГПТБ. Вміст GSH в пробах до і після інкубації визначали за кольоровою реакцією з ДТНБ.

Хід визначення. В дослідну і контрольну проби вносили 0,2 мл розведеного в 10 разів гомогенату органу, додавали 0,73 мл 0,1 М Тріс-НС1

буферу рН 8,5 (в 1 мл буферу містилося 0,1 мг ЕДТА, 0,78 мг NaN_3 та 1 мг GSH) та інкубували в термостаті при 37°C впродовж 10 хв. Реакцію запускали внесенням в інкубаційне середовище 70 мкл розчину ГПТБ. У контрольні проби замість розчину ГПТБ вносили 70 мкл дистильованої H_2O . Після інкубації впродовж 5 хв при 37°C реакцію зупиняли додаванням у пробірку по 0,2 мл 20%-ного розчину трихлороцтової кислоти. Проби центрифугували при 3 000 g 10 хв, супернатант використовували для визначення вмісту відновленого глутатіону за методом, описаним вище. Розрахунок активності ензиму проводили за калібрувальним графіком на основі різниці кількості GSH у дослідній і контрольній пробах та виражали в нмоль NADPH/хв·мг протеїну.

2.4.3. Визначення активності глутатіонредуктази

Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) визначали методом, описаним I. Carlberg та B. Maimervik [76].

Принцип методу базується на каталітичній NADPH-залежній реакції відновлення окисненої форми глутатіону, інтенсивність якої можна оцінити за швидкістю зниження екстинкції проб, при якій розчин NADPH має максимум світлопоглинання (340 нм):

Глутатіонредуктаза



Хід визначення. Для здійснення ензимної реакції гомогенати органів додатково розводили, відповідно, 0,1 М калій-фосфатним буфером (рН 7,4) і 5 мМ Тріс-НС1 буфером (рН 7,4) у співвідношенні 1:9. Реакцію проводили в термостатованій кюветі при температурі 37°C . В кювету вносили 1,8 мл 0,1 М калій-фосфатного буферу (рН 7,0) з додаванням 1 мМ ЕДТА, 0,1 мл 20 мМ водного розчину окисненого глутатіону і 100 мкл розведеного гомогенату. Після 3 хв врівноваження температур реакцію запускали додаванням 0,1 мл 2 мМ розчину NADPH, розчиненого в 10 мМ Тріс-НС1

буфері рН 7,0. Вимірювання оптичної густини досліджуваних розчинів проводили при довжині хвилі 340 нм на спектрофотометрі СФ-26 проти дистильованої води у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм. Як контроль використовували реакційну суміш, в яку замість досліджуваного зразка вносили в такому самому об'ємі 0,1 М калій-фосфатний буфер (рН 7,4). Розрахунок активності глутатіонредуктази здійснювали відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера, використовуючи молярний коефіцієнт світлопоглинання для NADPH при довжині хвилі 340 нм ($\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Активність ензиму виражали в нмоль NADPH/хв·мг білка.

2.4.4. Визначення активності глутатіон-S-трансферази

Визначення активності глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) проводили методом, описаним W. H. Habig та співавт. [137].

Принцип методу базується на взаємодії відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом в присутності глутатіон-S-трансферази з утворенням продукту реакції, що має максимум світлопоглинання при довжині хвилі 340 нм.

Хід визначення. Реакцію здійснювали в термостатованій кюветі при 37°C. В кювету вносили 1,2 мл 2 мМ розчину відновленого глутатіону в 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 6,5) та 0,1 мл досліджуваного зразка. Після урівноважування температур реакцію запускали внесенням в інкубаційне середовище 1,2 мл 2 мМ розчину 1-хлор-2, 4-динітробензолу. Вимірювання оптичної густини досліджуваних розчинів проводили на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 340 нм проти дистильованої води.

Контролем слугували проби, в які замість досліджуваного зразка вносили такий самий об'єм 0,1 М калій-фосфатного буферу (рН 7,4). Розрахунок активності глутатіон S-трансферази здійснювали відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера з використанням молярного коефіцієнта

світлопоглинання для утвореного продукту реакції при довжині хвилі 340 нм ($\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Активність глутатіон-S-трансферази виражали в мкмоль/хв·на 1 г білка.

2.4.5. Дослідження вмісту відновленого глутатіону

Вміст відновленого глутатіону (GSH) в гомогенатах досліджуваних тканин визначали з використанням 5,5'-ди-тіо-біс (-2-нітробензойної) кислоти (ДТНБ) за методикою, описаною G. Ellman [105]. Для осадження білка використовували розчин сульфосаліцилової кислоти.

Принцип методу базується на утворенні при взаємодії ДТНБ (реактиву Елмана) з кислоторозчинними тіоловими групами забарвленого комплексу – 5-тіо-2-нітробензойної кислоти (ТНБ) з максимумом світлопоглинання при 412 нм.

Хід визначення. До 0,6 мл гомогенату тканин додавали 0,2 мл 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. Пробирки центрифугували впродовж 10 хв при 3 000 g. Аліквоту (0,1 мл) переносили в пробірки, які містили 2,55 мл 0,1 М Тріс-НС1 буферу з 0,01% етилендіамінтетраацетату (ЕДТА), рН 8,5. До отриманої суміші додавали 25 мкл розчину ДТНБ. Після утворення забарвлення визначали показник екстинкції на спектрофотометрі СФ-26 проти дистильованої води при $\lambda=412$ нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Розрахунок вмісту відновленого глутатіону проводили за калібрувальним графіком і виражали в мкмоль/г тканини. Для побудови калібрувального графіку, з комерційного препарату GSH («Sigma», США) готували розчини з концентраціями від 0,02 до 2,0 ммоль/л, з яких відбирали пробирки для визначення вмісту відновленого глутатіону за описаною вище методикою.

2.5. Дослідження активності ензимів енергетичного обміну

2.5.1. Визначення активності лактатдегідрогенази

Хід визначення лактатгідрогенази (КФ 1.1.1.27): у кювету спектрофотометра вносили трис-НСІ буфер 0,05 М (рН 7,5), піруват натрію 0,006 М, NADPH 0,005 М та 0,05 мл гомогенату. Загальний об'єм розчину в кюветі спектрофотометру доводили бідистильованою водою до 3,0 мл. Реакцію запускали додаванням пірувату натрію. Показники оптичної густини фіксували кожні 30 с впродовж 3 хв.

Активність лактатдегідрогенази визначали за формулою:

$$A = (\Delta E \times V) / (6,22 \times c),$$

де:

ΔE – різниця оптичної густини між дослідною і контрольною пробами;

V – об'єм інкубаційної суміші в кюветі;

c – вміст білка в кюветі;

6,22 – коефіцієнт мілімолярної екстинкції нікотинамідних коензимів.

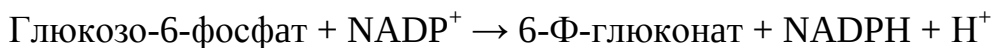
Активність виражали в мкмоль NADH /хв на 1 г тканини.

2.5.2. Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49). визначали методом, описаним А. Kornberg та співавт. [169].

Принцип методу базується на ензимній реакції перенесення протонів з глюкозо-6-фосфату на NADP^+ за участю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. При цьому утворюється NADPH з максимумом світлопоглинання при довжині хвилі 340 нм.

Г-6-Ф-ДГ



Хід визначення. Ензимну реакцію проводили в термостатованій кюветі при температурі 37°C. В кювету вносили 3,0 мл 50 мМ Тріс-НС1 буферу (pH 7,6) з додаванням 5 мМ ЕДТА, 0,1 мл 10 мМ NADP⁺ (натрієва сіль) і 50 мкл гомогенату органу. Після урівноваження температури реакцію ініціювали додаванням у досліджуване середовище 0,1 мл 5 мМ розчину глюкозо-6-фосфату. Проби спектрофотометрували при довжині хвилі 340 нм проти дистильованої води відразу після перемішування вмісту в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Розрахунок активності проводили за різницею екстинкцій відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера, враховуючи молярний коефіцієнт світлопоглинання при $\lambda=340$ нм ($\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Активність виражали в мкмоль/хв на 1 г білка.

2.6. Визначення активності амінотрансфераз (АлАТ, АсАТ)

Визначення активності аланінамінотрансферази

Принцип методу. Внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією аланін амінотрансферази, утворюється L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот в лужному середовищі. Оскільки гідразон піровиноградної кислоти має вищий коефіцієнт молярної екстинкції, то виявляється прямо пропорційна залежність оптичної щільності реакційного розчину від активності ензиму.

Активність АлАТ визначали за допомогою стандартного набору «СІМКО» (Свідоцтво про державну реєстрацію № 8347/2008).

В основі набору закладений уніфікований динітрофенілгідразиновий метод Райтмана-Френкеля.

Визначення активності аспаратамінотрансферази

Принцип методу. Аспаратамінотрансфераза каталізує реакцію між L-аспаратом і 2-оксиглутаратом, в результаті якої вони перетворюються до L-глутамату і оксалацетату. Метод визначення активності АсАТ ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності гідразонів 2-оксиглутарової та піровиноградної кислот у лужному середовищі. Гідразон піровиноградної кислоти, який утворюється при декарбоксилюванні оксалацетату має більшу оптичну щільність.

Активність АСаТ визначали за допомогою стандартного набору «СІМКО» (Свідоцтво про державну реєстрацію № 8347/2008).

В основі набору закладений уніфікований динітрофенілгідразиний метод Райтмана-Френкеля. В результаті переамінування, що відбувається під впливом АсАТ, утворюються щавлевооцтова і піровиноградна кислоти, які при додаванні 2,4-динітрофенілгідразину утворюють в лужному середовищі забарвлені гідразони, котрі мають максимум світлопоглинання при $\lambda=540$ нм. Активність амінотрансфераз виражали в мкмоль/мл.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дія афлатоксину В₁ на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у тканинах щурів

У низці досліджень встановлено, що в механізмі токсичної дії токсинів мікроскопічних грибів, у тому числі мікроміцетів роду *Aspergillus*, важливе значення має стимуляція процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та пригнічення природних захисних систем організму [3, 218, 248, 250]. Інтенсифікація процесів ПОЛ у клітинах спричиняє низку таких шкідливих ефектів, як оксидативне пошкодження мембран, пригнічення каталітичної активності ензимів тощо [138]. За умов посиленого перебігу процесів ПОЛ важливу роль відіграє функціональна активність внутрішньоклітинних захисних систем.

Важливим показником функціонального стану клітин є стан антиоксидантної системи, яка захищає клітини від пошкоджень, зумовлених дією активних форм Оксигену (АФО). Загалом компоненти антиоксидантної системи беруть участь у регуляції інтенсивності утворення вільних радикалів і знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів [17, 138, 288].

Під час розвитку афлатоксикозу в організмі тварин виявляються значні зміни в метаболічних процесах [73, 87, 108, 141, 146, 203]. Проте вплив афлатоксину АFB₁ на процеси ПОЛ та антиоксидантну систему тканини вивчений недостатньо. Тому здійснення досліджень у цьому напрямі – це актуальна проблема, вирішення якої має діагностичне та профілактичне значення. Адже дисбаланс, який постає в системі прооксиданти-антиоксиданти внаслідок надходження афлатоксину в організм значною мірою впливає на перебіг біохімічних і фізіологічних процесів, пригнічуючи функції життєво важливих органів і систем.

Відомо, що найбільшого ризику ураження внаслідок надходження AFB₁ в організм зазнають гепатоцити, в яких відбувається акумуляція та часткова детоксикація цього токсину. Вплив AFB₁ на тканини печінки супроводжується пригніченням синтезу білків та іншими шкідливими метаболічними ефектами [3, 133, 164, 186]. Водночас рівень пошкодження афлатоксином тканин таких органів, як серце та головний мозок, фактично, не з'ясований.

Тому важливим етапом нашої роботи було дослідити вплив афлатоксину B₁ за різних доз і способів введення в організм на механізми біохімічних порушень в тканинах і органах. З метою з'ясування цих проблем проводили дослідження процесів пероксидного окиснення, активності ензимів антиоксидантної системи (супероксидисмутаза, глутатіон-пероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза), вмісту відновленого глутатіону, динаміки активності ензимів енергетичного обміну (лактатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа), в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця щурів за умов одноразового парентерального введення AFB₁ дозою 0,5 мг/кг і щодобового внутрішньошлункового введення дозою 0,025 мг/кг.

3.1.1. Вплив афлатоксину B₁ на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах щурів за гострої інтоксикації

Згідно з літературними даними, підвищення активності пероксидного окиснення ліпідів є пусковим механізмом дії більшості афлатоксинів [46, 164]. Вважається, що першочергово афлатоксини руйнують печінку та інгібують синтез білка.

Актуальність досліджень процесів ПОЛ у тканинах головного мозку, нирок та серця за умов інтоксикації афлатоксином B₁ зумовлена патогенетичною роллю вільнорадикального окиснення як потужного

чинника деструкції клітинних мембран, а отже, патологічних процесів [122, 254].

Результати досліджень свідчать про те, що одноразове парентеральне (0,5 мг/кг) і щодобове внутрішньошлункове (0,025 мг/кг) введення AFB₁ призводить до індукції процесів утворення АФО і стимуляції пероксидного окиснення ліпідів в досліджуваних тканинах щурів. Про це свідчить накопичення кінцевих продуктів ПОЛ – ТБК-активних продуктів у зазначених тканинах (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Концентрація продуктів ПОЛ в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину В₁ (M±m, n=5)

Умови досліджень		ТБК-активні продукти, нмоль/г тканини	
Тканина печінки			
Контроль		44,60±3,63	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	78,22±6,83**	68,51±5,81*
	14	97,31±8,12**	86,30±7,60**
Тканина головного мозку			
Контроль		28,91±2,74	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	67,16±4,09**	44,33±3,25*
	14	94,66±7,23***	55,50±4,70**
Тканина нирок			
Контроль		31,22±2,51	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	52,84±3,95**	47,16±3,15**
	14	45,14±2,88*	53,90±3,87**
Тканина серця			
Контроль		28,10±2,02	

		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	58,10±3,91**	40,29±2,92*
	14	78,9±5,34	50,14±3,45**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$).

За одноразового і щодобового введення афлатоксину В₁ спостерігалось різке збільшення концентрації ТБК-активних продуктів у всіх типах досліджуваних тканин. Так, на 7-му і 14-ту доби після одноразового введення токсину вміст ТБК-активних продуктів у тканині печінки щурів зростає в 1,75 ($p<0,01$) і 2,18 ($p<0,01$) разу порівняно з контролем.

У тканині головного мозку спостерігається найбільше зростання вмісту продуктів ПОЛ на 7-му і 14-ту доби після одноразового введення тваринам AFB₁. На зазначених стадіях досліджень концентрація ТБК-активних продуктів зростає, відповідно, в 2,33 і 3,28 разу ($p<0,01-0,001$). Для тканини серця характерна подібна динаміка, концентрація ТБК-активних продуктів зростає протягом 14 днів досліджень у 1,47 і 2,45 разу ($p<0,01$). У тканині нирок на 7 добу експерименту концентрація ТБК-активних продуктів зростає на 1,69 разу ($p<0,01$), проте на 14 добу незначно знижується порівняно з 7 добою.

За умов щодобового введення AFB₁, у досліджуваних органах відбувається поступове збільшення концентрації ТБК-активних продуктів із тривалістю надходження токсину в організм тварин, тобто зі збільшенням сумарної введеної в організм дози AFB₁ (табл. 3.1).

Швидкість прооксидантних процесів у тканинах зазначених органів, ймовірно, залежить від їх метаболічних і функціональних особливостей. Згідно з отриманими результатами, в тканинах печінки активація процесів ПОЛ під впливом AFB₁ має найбільші масштаби, оскільки цей орган є ключовим під час знешкодження дії афлатоксину В₁ (рис. 3.1).

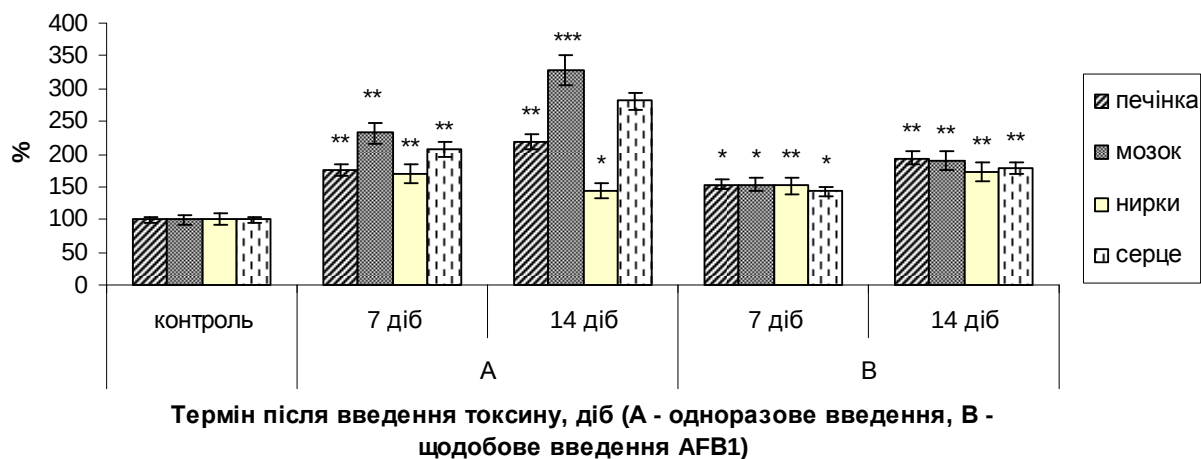


Рис. 3.1. Зміни вмісту продуктів ПОЛ в тканинах щурів після введення афлатоксину В₁: А. – одноразове введення 0,5 мг/кг; Б. – щодобове введення 0,025 мг/кг.

Необхідно відзначити, що при порівнянні динаміки нагромадження ТБК-активних продуктів при одноразовій та щодобовій інтоксикації афлатоксином В₁, відмічене деяке зниження інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів за щодобової інтоксикації. Це, ймовірно, свідчить про розвиток адаптаційних процесів у тканинах щурів за дії афлатоксину В₁ впродовж 14 діб.

3.1.2. Вплив гострої АFB₁-інтоксикації на окремі ланки метаболізму у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця щурів

Інтенсифікація процесів ПОЛ у тканинах спричиняє низку таких шкідливих ефектів, як оксидативне пошкодження мембран, пригнічення каталітичної активності ензимів тощо [138]. За умов посиленого перебігу процесів ПОЛ важливу роль відіграє функціональна активність внутрішньоклітинних захисних систем. До них, у першу чергу, належить антиоксидантна система, представлена комплексом неензимних антиоксидантів і спеціалізованих ензимів, що каталізують процеси

детоксикації АФО. Загалом компоненти антиоксидантної системи беруть участь у регуляції інтенсивності утворення вільних радикалів і знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів [99, 198, 223].

Аналіз результатів досліджень свідчить про прямий взаємозв'язок між збільшенням концентрації продуктів пероксидного окиснення ліпідів у досліджуваних тканинах щурів за умов гострої інтоксикації тварин афлатоксином B_1 та відповідними змінами активності ензимів антиоксидантної системи.

Експериментальні дані, отримані на цьому етапі досліджень, узгоджуються із результатами щодо динаміки концентрації продуктів ПОЛ у досліджуваних тканинах (печінка, головний мозок, нирки, серце).

Показовою є динаміка супероксиддисмутази, яка каталізує початкову стадію детоксикації вільних радикалів Оксигену і, таким чином, обриває ланцюг вільнорадикальних реакцій у тканині [119, 290].

Згідно з результатами досліджень, за умов одноразового введення щурам афлатоксину B_1 активність СОД у тканині печінки на 7-му добу знижується на 24,9 % ($p < 0,05$), а на 14-ту добу – на 40,5 % ($p < 0,01$). За умов щодобового введення AFB_1 цей показник зменшується на 14-ту добу експерименту на 40,2% ($p < 0,01$) (табл. 3.2).

У тканинах головного мозку і серця супероксиддисмутазна активність знижується протягом 14-ти діб після одноразового введення AFB_1 . Так, на 7-му добу активність знижується на 21,8 % ($p < 0,05$) і 21,1 % ($p < 0,01$), а на 14-ту – на 40,3 % ($p < 0,05$) і 42,1 % ($p < 0,01$) відповідно. За умов щодобового введення токсину активність цього ензиму також знижувалася впродовж 14-ти діб експерименту ($p < 0,05-0,01$).

Таблиця 3.2

Супероксиддисмутазна активність в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину В₁ (М±m, n=5)

Умови досліджень		Супероксиддисмутаза, ум. од./хв. на 1·г білка	
Тканина печінки			
Контроль		6,84±0,47	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	5,14±0,34*	4,79±0,38*
	14	4,07±0,26**	4,09 ±0,32**
Тканина головного мозку			
Контроль		6,47±0,39	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	5,06±0,41*	4,89±0,39*
	14	3,86±0,38**	4,17±0,34**
Тканина нирок			
Контроль		4,71±0,24	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	4,09±0,27	3,69±0,29*
	14	2,65±0,19**	3,25±0,21**
Тканина серця			
Контроль		5,89±0,36	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	4,65±0,39*	4,55±0,23*
	14	3,41±0,24**	4,40±0,26*

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001).

Для тканин нирок встановлена найвиразніша динаміка зниження супероксиддисмутасної активності. Зокрема, за умов одноразового введення афлатоксину В₁, активність ензиму знижується на 7-му добу на 13,2 %, а на 14-ту – на 43,7 % (p<0,01) порівняно з контролем. Щодобове введення AFB₁

також виявляє негативний вплив на супероксиддисмутазну активність, проте динаміка активності показує пропорційне зниження активності ензиму на 7-му і 14-ту доби – 21,7 і 31,0 % ($p < 0,05-0,01$).

Характерна для тканин печінки, головного мозку, нирок і серця щурів динаміка супероксиддисмутазної активності може зумовлюватись інтенсивним нагромадженням у цих тканинах продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які, як відомо, пригнічують активність ензимів.

Результати досліджень активності супероксиддисмутази за умов одноразового і щодобового введення AFB₁ свідчать, що інтоксикація пригнічує активність ензиму продуктами пероксидного окиснення ліпідів. Це може свідчити про розвиток метаболічних пошкоджень в тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця впродовж одноразового та щодобового ураження організму афлатоксином B₁.

Основну роль у реалізації антирадикального та антипероксидного захисту клітин відіграє глутатіонова система [130, 138]. Узгоджена дія всіх її компонентів (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, відновлений глутатіон,) сприяє збереженню антиоксидантного гомеостазу. Ця система забезпечує детоксикацію пероксидів, органічних гідропероксидів, інактивацію вільних радикалів.

Відомо, що ферментативна редокс-система глутатіону відіграє провідну роль в забезпеченні життєдіяльності клітин [178]. Адже відновлений глутатіон, окрім забезпечення антиоксидантного захисту, детоксикації, відомий своєю участю в модуляції редокс-регульованої сигнальної передачі, регуляції клітинної проліферації, диференціювання клітин, запасанні та транспортуванні цистеїну, в синтезі дезоксирибонуклеотидів, регуляції імунної відповіді, синтезі білків [90, 129, 167].

Глутатіон модулює клітинну відповідь на редокс-зміни, що асоційовані з наявністю активних форм кисню. Свої функції глутатіон реалізовує як

самостійна сполука або опосередковано як субстрат глутатіон-залежних ензимів. Відновлений глутатіон є найважливішим внутрішньоклітинним захисним чинником в клітинах внутрішніх органів ссавців [129, 187].

Зменшення вмісту відновленого глутатіону в досліджуваних тканинах спричинено його участю у забезпеченні антиоксидантного захисту під час гострої інтоксикації організму афлатоксином B₁.

Результати досліджень свідчать, що після одноразового введення афлатоксину B₁ вміст відновленого глутатіону в тканинах печінки на 7-му добу зменшується на 40,4 % ($p < 0,01$), головного мозку – 39,5 % ($p < 0,01$). На 14-ту добу спостерігається незначна динаміка до збільшення вмісту GSH в тканинах печінки й головного мозку тварин порівняно з 7-мою добою експерименту (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину B₁ ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджень		GSH, мкмоль/г тканини	
Тканина печінки			
Контроль		2,33±0,16	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	1,39±0,11**	1,45±0,12**
	14	1,49±0,14*	0,99±0,08**
Тканина головного мозку			
Контроль		1,19±0,08	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	0,72±0,06**	0,76±0,07*
	14	0,80±0,08*	0,69±0,06**
Тканина нирок			
Контроль		2,39±0,16	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	2,27±0,14	1,5±0,10**
	14	1,88±0,13*	1,2±0,08**

Тканина серця			
Контроль		1,45±0,08	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	0,99±0,09*	0,99±0,11*
	14	0,90±0,08**	0,81±0,08**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$)

У тканинах нирок і серця за умов одноразового введення AFB₁ концентрація GSH зменшується на 14-ту добу досліджень, відповідно, на 21,3% ($p<0,05$) і 37,9 % ($p<0,01$).

За умов щодобового введення AFB₁ вміст GSH зменшується у всіх досліджуваних тканинах, починаючи з 7-ї доби експерименту. У тканинах печінки вміст GSH зменшується на 14-ту добу на 57,5 % ($p<0,01$), головного мозку – на 42,0 % ($p<0,01$), нирок – на 49,8 % ($p<0,01$), серця – на 44,1 % ($p<0,01$).

Загалом отримані результати свідчать, що одноразове парентеральне і щодобове внутрішньошлункове введення афлатоксину B₁ призводить до неоднозначних змін вмісту відновленого глутатіону в досліджуваних тканинах піддослідних щурів.

Клітинний фонд відновленого глутатіону долучає до процесу відновлення ендогенних антиоксидантів, зокрема вітаміну Е, який також бере безпосередню участь у регулюванні ПОЛ [15, 17, 25, 90]. Тому при недостатці у тканинах печінки, нирок, головного мозку і серця відновленого глутатіону виникає порушення механізму глутатіон-залежного регулювання ПОЛ.

За результатами дослідження прооксидантно-антиоксидантного балансу у тварин інтоксикованих AFB₁ прослідковується виражене зниження активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази і глутатіонтрансферази, вмісту відновленого глутатіону, що свідчить про стійкий інактивуючий вплив токсикації щодо компонентів антиоксидантної системи.

Процес відновлення молекул глутатіону здійснюється в глутатіонредуктазній реакції. У знижені вмісту GSH у тканинах щурів, інтоксикованих AFB₁, можуть бути задіяні різні механізми. Важливу роль у такому ефекті відіграє кон'югація цього трипептиду з продуктами метаболізму афлатоксину B₁ [90, 266], а також слід враховувати динаміку глутатіонредуктазної активності. Тому важливим завданням на цьому етапі нашої роботи було проаналізувати динаміку активності глутатіонредуктази в тканинах досліджуваних органів щурів, яким вводили афлатоксин B₁ одноразовою ін'єкцією (дозою 0,5 мг/кг) та щодобово (дозою 0,025 мг/кг).

У процесі досліджень встановлено, що вірогідне пригнічення глутатіонредуктазної активності відбувається у всіх досліджуваних тканинах на 7-му і 14-ту доби після одноразового введення AFB₁ ($p < 0,05-0,001$) (табл. 3.5).

Аналізуючи функціональну активність глутатіонредуктази, потрібно зазначити, що за умов щодобового введення афлатоксину в організм щурів динаміка активності ензиму в тканині серця відрізняється від динаміки в інших досліджуваних тканинах. У тканині серця активність ензиму знижується на 7-му добу експерименту на 61,6% ($p < 0,01$), а на 14-ту добу зростає на 20% ($p < 0,01$) порівняно зі значенням, установленим на 7-му добу досліджу.

У тканинах печінки, нирок та головного мозку на 14-ту добу відбувається поступове зменшення активності ензиму на 61,7 %, 37,1 %, 64,8 % ($p < 0,05-0,001$) відповідно.

Отже, за умов щодобового введення AFB₁ в тканинах досліджуваних органів можна прослідкувати залежне від дози зниження глутатіонредуктазної активності впродовж експериментального періоду. Динаміка глутатіонредуктази в досліджуваних тканинах за різних доз та способів введення афлатоксину B₁, свідчить про виснаження резервів глутатінової системи захисту.

Таблиця 3.5

Глутатіонредуктазна активність в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину B₁ (M±m, n=5)

Умови досліджень		Глутатіонредуктаза, нмоль NADPH/хв·мг білка	
Тканина печінки			
Контроль		29,45±1,89	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	14,67±0,91**	10,07±0,47***
	14	9,76±0,62***	11,27±0,86**
Тканина головного мозку			
Контроль		23,14±1,51	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	12,68±0,96**	7,38±0,57
	14	8,67±0,41**	8,14±0,76***
Тканина нирок			
Контроль		12,51±0,75	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	8,91±0,58*	10,40±0,60*
	14	8,10±0,52**	7,86±0,69**
Тканина серця			
Контроль		17,75±10,15	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	13,03±0,71*	6,81±0,43**
	14	8,50±0,63**	8,23±0,59**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001)

Глутатіонпероксидаза бере участь в детоксикації гідроген пероксиду, каталізує процес відновлення гідропероксидів ліпідів до відповідних оксисполук. У процесі експериментальних досліджень встановлено, що за

умов гострої інтоксикації афлатоксином B₁ активність ГПО в тканині печінки знижується на 7-му добу на 27,4 % (p<0,05), а на 14-ту добу – на 41 % (p<0,01) (табл. 3.3). Подібна динаміка характерна для тканин головного мозку. Активність ензиму знижується відповідно на 7-му і 14-ту доби експерименту в тканині головного мозку на 23,3 і 26,9 % (p<0,05-0,01).

Таблиця 3.6

Глутатіонпероксидазна активність в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину B₁ (M±m, n=5)

Умови досліджень		Глутатіонпероксидаза, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	
Тканина печінки			
Контроль		158,5±9,21	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	115,11±6,68*	110,15±5,51**
	14	93,57±5,97**	99,64 ±6,33**
Тканина головного мозку			
Контроль		136,86±5,94	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	105,03±6,28*	108,64±5,43*
	14	100,09±5,93**	98,51±4,93**
Тканина нирок			
Контроль		332,9±17,54	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	137,00±10,52***	217,41±11,90**
	14	156,30±10,61**	165,20±9,84**
Тканина серця			
Контроль		121,17±5,91	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	100,29±6,08*	104,35±4,05*
	14	104,92±5,51	97,13±3,90*

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001).

У тканинах нирок та серця за умов одноразового введення AFB₁, глутатіонпероксидазна активність знижувалася на 7-му добу і 14-ту доби. Так, активність ГПО у тканинах нирок у зазначених періодах зменшувалася на 58,9 і 53 % ($p < 0,01-0,001$), серця – на 17,2 і 13,4 % ($p < 0,05$), відповідно.

За умов щодобового введення AFB₁, активність ГПО зменшується у всіх досліджуваних тканинах протягом всього дослідного періоду, причому зі збільшенням тривалості надходження токсину в організм тварин рівень інгібування ГПО в тканинах посилюється.

Наявність молекул відновленого глутатіону, що беруть участь у реакціях детоксикації гідропероксидів ліпідів та токсичних продуктів метаболізму афлатоксину, необхідна для функціонування глутатіон-S-трансфери. Г-S-T бере участь у детоксикації токсичних метаболітів афлатоксину B₁ [89, 90, 157, 274], його каталітична активність значною мірою сприяє захисту тканин від оксидативного стресу [140, 142, 283].

Аналізуючи функціональну активність глутатіон-S-трансфери, потрібно зазначити, що за умов одноразового введення афлатоксину в організм щурів динаміка активності ензиму в досліджуваних тканинах подібна. Активність ензиму значно знижується на 7-му добу експерименту і зростає на 14-ту добу. Однак, у тканинах нирок активність зростає протягом 14 діб в 1,22 разу ($p < 0,05$), ймовірно, це відіграє компенсаторну роль, сприяючи зменшенню токсичних ефектів афлатоксину.

За умов щодобового введення тваринам AFB₁, глутатіон-S-трансферазна активність зменшується у всіх досліджуваних тканинах протягом усього експерименту (табл. 3.7). Вірогідно це відбувається внаслідок зв'язування ензиму із метаболітами афлатоксину [170].

Таблиця 3.7

Глутатіон-S-трансферазна активність в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину В₁ (M±m, n=5)

Умови досліджень		Глутатіон-S-трансфераза, мкмоль/хв·на 1 г білка	
Тканина печінки			
Контроль		482,40±27,21	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	211,51±12,84***	227,54±10,43**
	14	289,73±14,60**	201,90±11,12***
Тканина головного мозку			
Контроль		214,70±11,16	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	94,72±7,10***	105,53±7,27**
	14	119,81±8,93**	98,24±7,96**
Тканина нирок			
Контроль		571,71±28,58	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	634,63±33,16	445,81±23,91*
	14	698,20±44,00*	374,70±20,87**
Тканина серця			
Контроль		201,61±11,56	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	132,90±8,31***	121,61±8,71**
	14	146,22±9,90*	109,60±7,78**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001).

Отже, результати досліджень стану системи глутатіону в досліджуваних тканинах свідчать, що її активність пригнічується під впливом AFB₁ майже на всіх стадіях проведених експериментів (рис. 3.2-3.3).

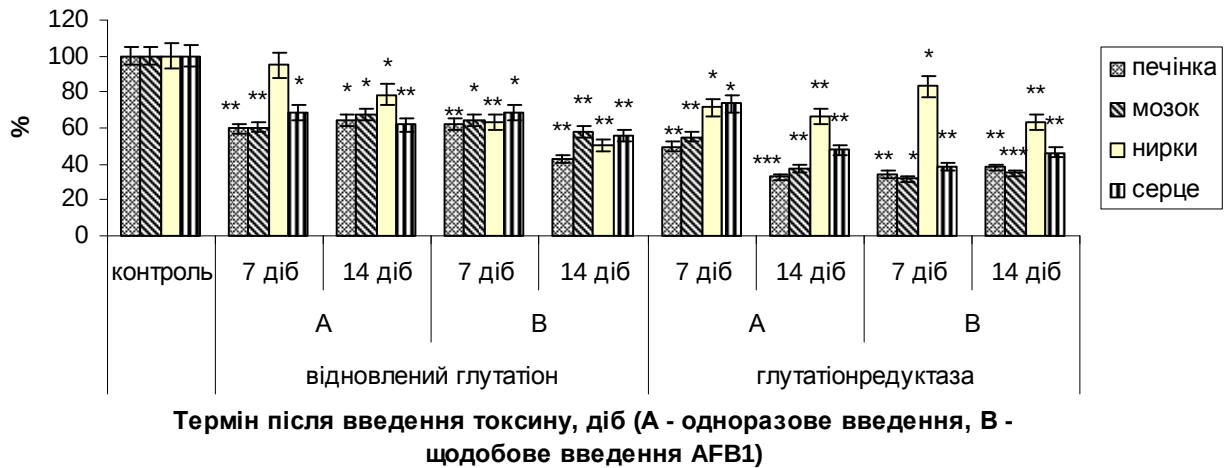


Рис. 3.2. Вплив AFB₁ на вміст відновленого глутатіону та активність глутатіонредуктази у досліджуваних тканинах щурів (А – одноразове введення, В – щодобове введення AFB₁).

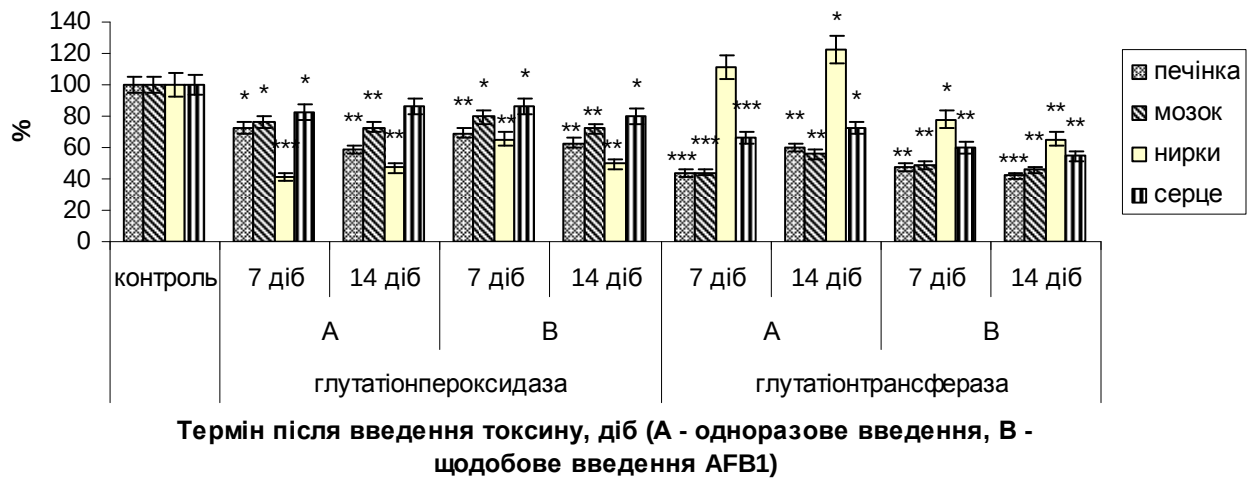


Рис. 3.3. Вплив AFB₁ на активність глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази у досліджуваних тканинах щурів (А – одноразове введення, В – щодобове введення AFB₁).

Порівняльний аналіз змін у функціональній активності глутатіонової системи (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, відновлений глутатіон) свідчить, що за умов інтоксикації афлатоксином В1 ця система відіграє ключову роль у зменшенні токсичних ефектів токсину.

Каталітична активність ензимів антиоксидантного захисту залежить від регенерації NADPH, одного з продуктів дегідрогеназних реакцій пентозофосфатного шляху окиснення глюкози. Таким чином, реалізується метаболічний зв'язок між енергетичними процесами та функціональною здатністю антиоксидантної системи у тканинах. Динаміка ензимів, які каталізують реакції катаболізму глюкози, є важливим показником змін під впливом афлатоксину B₁.

Тому метою наступної стадії досліджень було з'ясувати вплив AFB₁ на активність ензимів енергетичного обміну в тканинах печінки, нирок, головного мозку та серця щурів. Зокрема, проведено дослідження впливу AFB₁ на активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) – ензиму завершальної стадії гліколізу та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) – каталізатора початкової стадії пентозофосфатного шляху, що визначає рівень відновлення в цих тканинах нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату [16, 215].

Аналіз результатів досліджень свідчать, що активність лактатдегідрогенази в досліджуваних тканинах зменшувалася як за умов одноразового введення афлатоксину B₁, так і щодобового. Так, негативна динаміка чітко виражена у тканинах печінки, нирок, головного мозку та серця за одноразової дози AFB₁. Активність ЛДГ зменшувалася на 56,1 % ($p < 0,001$) на 14-добу в тканині печінки, 60,2 % ($p < 0,001$) – у тканині головного мозку, 53,5 % ($p < 0,001$) – у тканині нирок, 51,2 % ($p < 0,01$) – у тканині серця (табл. 3.8).

За умов щодобової інтоксикації активність ЛДГ зменшувалася протягом всього експериментального періоду. Зокрема, активність ензиму на 14-добу в тканині печінки зменшилася на 35,6 % ($p < 0,01$), у тканині головного мозку – на 50,2 % ($p < 0,01$), у тканині нирок – на 39,8 % ($p < 0,01$), у тканині серця – на 60,3 % ($p < 0,01$).

Таблиця 3.8

Лактатдегідрогеназна активність в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину B₁ (M±m, n=5)

Умови досліджень		Лактатдегідрогеназа, мкмоль NADH /хв на 1 г тканини	
Тканина печінки			
Контроль		120,58±6,67	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	74,13±4,86**	90,30±7,64*
	14	52,90±3,81***	77,61±4,19**
Тканина головного мозку			
Контроль		96,10±5,86	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	67,81±4,15*	54,31±3,93**
	14	38,23±1,89***	47,91±2,88**
Тканина нирок			
Контроль		191,40±9,90	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	123,80±5,81**	148,71±5,55*
	14	89,11±4,35***	115,30±5,06**
Тканина серця			
Контроль		51,41±3,11	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	34,87±2,24**	21,81±1,16**
	14	25,10±1,52**	20,42±1,70**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001).

Привертає увагу динаміка лактатдегідрогеназної активності у тканині серця, спостерігається більш виражене зменшення активності при щодобовій інтоксикації – на 60,3 % (p<0,01), ніж за одноразової – на 51,2 % (p<0,01).

Таблиця 3.9

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність в тканинах щурів за різних доз введення афлатоксину В₁ (M±m, n=5)

Умови досліджень		Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, мкмоль/хв·на 1 г білка	
Тканина печінки			
Контроль		84,50±4,94	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	48,33±2,91**	62,47±4,22*
	14	37,10±2,30**	45,92±3,95**
Тканина головного мозку			
Контроль		56,71±3,26	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	48,30±3,81	41,52±3,11*
	14	37,2±2,69**	33,11±2,76**
Тканина нирок			
Контроль		71,50±4,54	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	42,34±2,39**	51,61±3,93*
	14	29,31±1,77**	44,90±2,58**
Тканина серця			
Контроль		38,11±1,98	
		Одноразове введення AFB ₁ (0,5мг/кг)	Щодобове введення AFB ₁ (0,025 мг/кг)
Термін введення AFB ₁ , діб	7	35,71±1,72	31,43±1,56*
	14	30,61±1,67*	28,80±1,62*

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001).

Проведені нами дослідження показали, що активність NADPH-генеруючого ензиму – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в тканинах тварин дослідних груп була нижча, порівняно з тканинами тварин контрольної групи. У процесі наших досліджень встановлено, що надходження в організм

афлатоксину В₁ по-різному впливає на активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в досліджуваних тканинах.

Зокрема, в гомогенатах тканин печінки, нирок і головного мозку введення АFB₁ спричиняє пригнічення глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності майже вдвічі за умов одноразового парентерального введення в організм тварин ($p < 0,05-0,01$). (табл. 3.9).

Щодобове введення афлатоксину В₁ також пригнічує активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в досліджуваних тканинах. Так, на 7-му і 14-ту доби, активність ензиму у тканині печінки зменшується на 26,1 % і 56,1 % ($p < 0,05-0,01$), у тканині головного мозку – на 26,8 % і 51,2 % ($p < 0,05-0,01$), у тканині нирок – на 27,8% і 37,2% ($p < 0,05-0,01$) відповідно.

Однак, як свідчать отримані результати, в тканині серця піддослідних щурів глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність зменшується під впливом афлатоксину В₁ за умов одноразового і щодобового введення на 19,7-24,4 % ($p < 0,05$) (табл. 3.9).

Для регенерування відновленого глутатіону в клітинах наявна глутатіонредуктаза. Ферментативне відновлення глутатіону залежить від НАДФН, тому функціонування глутатіон-залежних компонентів антиоксидантної системи тісно пов'язана з активністю НАДФН генеруючих ензимів. Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа в тканинах і органах метаболічно пов'язана з глутатіонредуктазною активністю [61]. Цей зв'язок опосередковується через молекули відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату, які утворюються в глюкозо-6-фосфатдегідрогеназній реакції та використовуються під час відновлення глутатіону в глутатіонредуктазній реакції.

ГПО з відновленим глутатіоном каталізує розкладання гідропероксидів ліпідів, стероїдів і нуклеїнових кислот, попереджаючи пошкодження структурних і функціональних компонентів клітин. За умов нормального функціонування ГПО, вміст відновленого глутатіону може суттєво

зменшуватися внаслідок недостатності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, і відповідно НАДФН. Наслідком зниження активності цих ензимів може бути порушення процесів мембранного транспортування, руйнування структури цитоскелета й клітини загалом [4, 15, 17, 39, 61]. Вміст відновленого глутатіону та активність глутатіонтрансферази у тканинах знижується внаслідок його зв'язування з метаболітами AFB₁. Механізм утворення кон'югатів AFB₁, тим самим зменшення їх токсичності, захищає від руйнування білкові SH-групи.

3.1.3. Рівень та активність амінотрансфераз в досліджуваних тканинах і плазмі крові щурів на тлі щодобової інтоксикації афлатоксином В₁

Амінотрансферази – це ензими, які каталізують реакції транс-амінування. Ці реакції активно проходять в багатьох органах, найактивніше – в печінці, скелетних м'язах, міокарді, головному мозку, нирках. Визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ) широко застосовується для діагностики пошкоджень внутрішніх органів. Функціональне значення АлАТ полягає у каталізі перенесення аміногрупи аланіну на α -кетоглутарову кислоту з утворенням піровиноградної та глутамінової кислот, АсАТ каталізує перенесення аміногрупи з аспарагінової на α -кетоглутарову кислоту. Висока активність АлАТ у тканинах призводить до порушення проникності клітинних мембран або руйнування клітин.

З метою з'ясування загальних змін у метаболічних процесах та можливості пошкодження структури клітинних мембран ми проводили дослідження активності амінотрансфераз в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця щурів за умов щодобового внутрішньошлункового введення афлатоксину В₁ дозою 0,025 мг/кг.

Результати досліджень свідчать, що під впливом афлатоксину B_1 відбуваються виразні зміни активності трансаміназ у досліджуваних тканинах щурів (табл. 3.10). Особливо виразною є динаміка зниження активності АлАТ у тканинах печінки і нирок щурів, яким вводили AFB_1 протягом 14 діб. На 14-ту добу цей показник зменшився, відповідно, у тканині печінки – у 1,85 разу ($p<0,01$), у тканині нирок – 2,09 разу ($p<0,01$).

Активність аспартатамінотрансферази знижується у 1,76-2,33 разу ($p<0,05$ - $0,001$) у всіх досліджуваних тканинах щурів, яким вводили афлатоксин B_1 (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Активність амінотрансфераз у тканинах органів та плазмі крові щурів за умов введення афлатоксину B_1 ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджень		АлАТ (мкмоль/мл)	АсАТ (мкмоль/мл)	АсАТ / АлАТ
Тканина печінки				
Контроль		0,72 $\pm$ 0,048	0,66 $\pm$ 0,044	0,92
Термін після введення AFB_1 , діб	7	0,64 $\pm$ 0,027	0,51 $\pm$ 0,033*	0,79
	14	0,39 $\pm$ 0,025**	0,28 $\pm$ 0,024**	0,72
Тканина головного мозку				
Контроль		0,26 $\pm$ 0,019	0,42 $\pm$ 0,023	1,62
Термін після введення AFB_1 , діб	7	0,21 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,012**	1,29
	14	0,20 $\pm$ 0,009	0,18 $\pm$ 0,019***	0,9
Тканина серця				
Контроль		0,25 $\pm$ 0,017	0,58 $\pm$ 0,035	2,32
Термін після введення AFB_1 , діб	7	0,22 $\pm$ 0,008	0,48 $\pm$ 0,026*	2,18
	14	0,19 $\pm$ 0,009	0,32 $\pm$ 0,019**	1,68
Тканина нирки				
Контроль		0,86 $\pm$ 0,048	0,75 $\pm$ 0,049	0,87
Термін після введення AFB_1 , діб	7	0,74 $\pm$ 0,039	0,58 $\pm$ 0,032*	0,78
	14	0,41 $\pm$ 0,023**	0,30 $\pm$ 0,024**	0,73
Плазма крові				
Контроль		0,45 $\pm$ 0,028	0,29 $\pm$ 0,027	0,64
Термін після введення AFB_1 , діб	7	1,32 $\pm$ 0,09***	0,55 $\pm$ 0,036**	0,42
	14	1,93 $\pm$ 0,12***	0,75 $\pm$ 0,044*	0,39

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць між контрольною і дослідними групами тварин (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$).

У діагностиці біохімічних порушень досить часто використовують коефіцієнт Де Рітиса – співвідношення АсАТ/АлАТ. За змінами цього показника визначають глибину ураження тканин печінки та серця. Відомо, що у разі пошкодження гепатоцитів цей показник знижується, а при цитолізі клітин міокарду – зростає [29]. Згідно з результатами наших досліджень, у тканинах печінки і нирок щурів, яким вводили АFB₁, співвідношення АсАТ/АлАТ знижується в порівнянні зі значеннями у тварин контрольної групи. У тканинах печінки на 7-му добу експерименту цей показник становить 0,79, а на 14-ту добу – 0,72 (у порівнянні зі значенням 0,92 у щурів контрольної групи), у тканинах нирок – 0,78 і 0,73, відповідно. У тканинах головного мозку і серця також знижується коефіцієнт Де Рітиса. На 7-му добу експерименту у тканині головного мозку цей показник становить 0,9, а на 14-ту добу – 1,29 (у порівнянні зі значенням 1,62 у щурів контрольної групи), у тканині серця – 1,51 і 2,18 (у порівнянні зі значенням 2,32 у щурів контрольної групи) відповідно (табл. 3.10).

Результати досліджень свідчать, що під впливом афлатоксину В₁ відбуваються виразні зміни активності трансаміназ у плазмі крові щурів, зокрема збільшується АлАТ у 4,29 разу ($p < 0,001$), а АсАТ – у 2,59 разу ($p < 0,05-0,01$). Ці результати можуть свідчити про порушення функцій досліджуваних органів під впливом афлатоксину В₁.

3.1.4. Висновки

Реакційно активні форми кисню індуюють пероксидне окиснення ліпідів та інші процеси, що призводять до деструктивних змін у тканинах. За таких умов зменшення рівня антиоксидантного захисту клітин в організмі, інтоксикованому афлатоксином В₁, може посилювати шкідливий вплив токсину на діяльність органів і систем.

Результати експерименту свідчать, що AFB_1 істотно впливає на процеси метаболізму в різних типах тканин – печінки, головного мозку, нирок, серця, еритроцитах. Під час вивчення вмісту ТБК-активних продуктів, динаміки активності СОД та ферментів глутатіонової системи, в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця щурів за умов введення афлатоксину B_1 виявлено пригнічення функціональної активності антиоксидантної системи та інтенсифікацію процесів ПОЛ, що свідчить про важливу роль вільнорадикального окиснення в патогенезі отруєння. Активність антиоксидантних ензимів і концентрація кінцевих продуктів ПОЛ характеризують окремі етапи вільнорадикального окиснювального процесу. З цього випливає, що визначення активності антиоксидантних ензимів і вмісту ТБК-активних продуктів дозволяє орієнтуватися в характері вільнорадикального окиснення.

Загалом, результати досліджень свідчать про руйнівну дію проміжних та кінцевих продуктів метаболізму афлатоксину B_1 , а також активних форм Оксигену, які утворюються в реакціях біотрансформації афлатоксину за участю внутрішньоклітинних ензимних систем та внаслідок опосередкованого впливу AFB_1 на процеси утворення АФО та пероксидне окиснення ліпідів в тканинах організму тварин.

Отримані результати свідчать про різну чутливість метаболізму в тканинах печінки, головного мозку, нирок, серця та еритроцитах до дії афлатоксину B_1 . Згідно з результатами досліджень, введення AFB_1 різними способами (парентеральний і внутрішньошлунковий) і в різних дозах, призводить до активації процесів пероксидного окиснення ліпідів у всіх досліджуваних тканинах. Активність ензимів антиоксидантної системи (СОД, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза) в тканинах тварин пригнічується під впливом AFB_1 майже на всіх стадіях проведених експериментів.

3.2. Вплив біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на окремі ланки метаболізму у тканинах щурів на тлі інтоксикації афлатоксином В₁

Для запобігання та корекції метаболічних порушень застосовують синтетичні і природні антиоксиданти. Використання синтетичних антиоксидантів обмежується високою ймовірністю появи небажаних побічних ефектів [23]. Це зумовлює пошук природних антиоксидантів, які послаблюють дію вільних радикалів. Доцільним є використання препаратів, котрі діють у травному тракті або клітинах тканин: адсорбенти і пробіотики на основі дріжджів та бактерій у живій або неактивній формі, або окремі компоненти клітин [28, 40, 56, 70, 75, 83, 114, 118, 163, 188, 197, 231, 253]. До сполук з антиоксидантними властивостями належать каротиноїди [34, 138, 267, 269].

До перспективних пробіотиків належать дріжджі *Phaffia rhodozyma* (штам IBM Y-5021). Вони синтезують потужний природний антиоксидант – каротиноїд астаксантин (3,3'-дигідрокси-β,β-каротин-4,4'-діон, C₄₀H₅₂O₄) [34, 222]. У низці досліджень адсорбтивно-зв'язувальної здатності структурних компонентів клітин дріжджів встановлено, що зовнішні компоненти клітинної стінки *P. rhodozyma* здатні адсорбувати деякі мікотоксини [260, 264]. Однак, комплексних наукових даних щодо використання *P. rhodozyma* з метою зниження токсичної дії афлатоксину В₁ на сьогодні недостатньо.

Метою даного етапу роботи було з'ясування коригувальної дії біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* при внутрішньошлунковому введенні дозою 1,5 г/кг маси тіла щодоби впродовж 14-ти діб за щодобової AFB₁-інтоксикації у лабораторних тварин.

3.2.1. Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у тканинах щурів за дії біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на тлі гострої AFB₁-інтоксикації

AFB₁ сприяє збільшенню вмісту активних форм Оксигену в тканинах прямим і опосередкованим шляхом [255]. Реакційно активні АФО індують пероксидне окиснення ліпідів та інші процеси, що призводять до деструктивних змін у клітинах. Збільшення концентрації ТБК-активних продуктів у тканинах щурів, які зазнавали впливу AFB₁, є показником активації у них процесів ПОЛ. Результати аналізу концентрації продуктів ПОЛ за умов введення тваринам біомаси дріжджів *P. rhodozyma* свідчать, що вони сприяють зменшенню стимулювального впливу AFB₁ на процеси ліпопероксидації в досліджуваних тканинах (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Концентрація ТБК-активних продуктів в тканинах щурів, яким вводили афлатоксин В₁ і біомасу *P. rhodozyma*, (M±m, n=5-7)

Дослідні групи	ТБК-активні продукти
Тканина печінки (нмоль/г тканини)	
Контроль	44,60±3,63
AFB ₁ , 7 доба	68,51±5,81*
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	41,52±2,15
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	54,70±3,45 [#]
AFB ₁ , 14 доба	86,30±7,60**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	41,38±1,77
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	57,11±3,25 [#]
Тканина головного мозку (нмоль/г тканини)	
Контроль	28,91±2,74
AFB ₁ , 7 доба	44,33±3,25*
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	29,03±2,22
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	36,60±2,65
AFB ₁ , 14 доба	55,50±4,70**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	28,00±2,17
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	32,66±2,45 ^{##}

Тканина нирок (нмоль/г тканини)	
Контроль	31,22±2,51
AFB ₁ , 7 доба	47,16±3,15**
P. rhodozyma, 7 доба	28,11±2,22
AFB ₁ + P. rhodozyma, 7 доба	35,13±2,67 ^{##}
AFB ₁ , 14 доба	53,90±3,87**
P. rhodozyma, 14 доба	27,41±2,45
AFB ₁ + P. rhodozyma, 14 доба	28,60±2,97 ^{##}
Тканина серця (нмоль/г тканини)	
Контроль	28,10±2,02
AFB ₁ , 7 доба	40,29±2,92*
P. rhodozyma, 7 доба	26,91±2,27
AFB ₁ + P. rhodozyma, 7 доба	35,13±2,08
AFB ₁ , 14 доба	50,14±3,45**
P. rhodozyma, 14 доба	27,20±2,29
AFB ₁ + P. rhodozyma, 14 доба	28,67±2,53 ^{##}

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$)

Зниження під дією біомаси каротиносинтезувальних дріжджів вмісту первинних продуктів ПОЛ у досліджуваних органах щурів може свідчити, що наявні в дріжджах каротиноїди пригнічують вільнорадикальне окиснення ліпідів.

3.2.2. Коригувальна дія біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на активність ензимів антиоксидантного захисту в тканинах щурів за щодобового введення афлатоксину В₁

Важливим показником антиоксидантного захисту тканин є активність ензимів антиоксидантної системи [271]. У процесі досліджень встановлено, що за умов щодобової токсикації афлатоксином В₁ в досліджуваних тканинах піддослідних тварин відбувається зниження активності ензимів антиоксидантної системи та вмісту відновленого глутатіону. Тому, важливим

етапом нашої роботи є дослідження впливу введення в раціон щурів біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на стан антиоксидантної системи.

Отримані результати дають підставу стверджувати, що зменшення інтенсивності процесів ПОЛ в інтоксикованих афлатоксином щурів пов'язане із впливом біомаси дріжджів на активність ензимів антиоксидантної системи в тканинах.

Зокрема, за умов щодобового введення біомаси *P. rhodozyma* в досліджуваних тканинах щурів, які отримували AFB₁, на 14-ту добу експерименту, супероксиддисмутазна активність нормалізується ($p < 0,01$) (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Супероксиддисмутазна активність в тканинах щурів, яким вводили AFB₁, біомасу *P. rhodozyma* ($M \pm m$, $n=5-7$)

Дослідні групи	Супероксиддисмутаза, ум. од./хв·на 1 г білка
Тканина печінки	
Контроль	6,84±0,47
AFB ₁ , 7 доба	4,79±0,38*
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	7,21±0,53
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	5,69±0,27
AFB ₁ , 14 доба	4,09±0,32**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	7,09±0,32
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	6,03±0,33 ^{##}
Тканина головного мозку	
Контроль	6,47±0,39
AFB ₁ , 7 доба	4,89±0,39*
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	6,71±0,39
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	5,65±0,37
AFB ₁ , 14 доба	4,17±0,34**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	6,40±0,36
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	5,89±0,37 ^{##}
Тканина нирок	
Контроль	4,71±0,24
AFB ₁ , 7 доба	3,69±0,29*
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	4,29±0,38

AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	4,35±0,28
AFB ₁ , 14 доба	3,25±0,21**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	4,76±0,34
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	4,77±0,26 ^{##}
Тканина серця	
Контроль	5,89±0,36
AFB ₁ , 7 доба	4,55±0,23*
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	5,29±0,39
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	3,91±0,28*
AFB ₁ , 14 доба	4,40±0,26*
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	5,23±0,35
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	4,83±0,39

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p<0,05$; ## - $p<0,01$; ### - $p<0,001$)

Характерна для тканин печінки, головного мозку, нирок та серця щурів динаміка супероксиддисмутази активності при введення біомаси *P. rhodozyma* може зумовлюватись зменшенням у цих тканинах продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які, як відомо, пригнічують активність ензиму.

Для збереження антиоксидантного гомеостазу необхідна узгоджена дія всіх компонентів глутатіонової системи (відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза) (табл. 13-14, рис. 3.4).

Таблиця 3.13

Глутатіонредуктазна та глутатіонпероксидазна активність в тканинах щурів, яким вводили AFB₁ і біомасу *P. rhodozyma* ($M \pm m$, $n=5-7$)

Дослідні групи	Глутатіонредуктаза, нмоль NADPH/хв·мг білка	Глутатіонпероксидаза, нмоль NADPH/хв·мг протеїну
Тканина печінки		
Контроль	29,45±1,89	158,5±9,21
AFB ₁ , 7 доба	10,07±0,47***	110,2±5,51**
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	28,28±1,39	169,1±9,99*

AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	20,61±1,85 ^{###}	153,2±8,21 ^{##}
AFB ₁ , 14 доба	11,27±0,86 ^{**}	99,6 ±6,33 ^{**}
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	28,83±1,49	185,9±10,31 ^{**}
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	24,23±1,37 ^{###}	138,9±6,94 ^{##}
Тканина головного мозку		
Контроль	23,14±1,51	136,9±5,94
AFB ₁ , 7 доба	7,38±0,57	108,6±5,43 [*]
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	21,41±1,91	163,7±7,39 [*]
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	17,40±1,14 ^{###}	149,8±7,11 ^{##}
AFB ₁ , 14 доба	8,14±0,76 ^{***}	98,5±4,93 ^{**}
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	24,12±1,17	164,7±8,37 [*]
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	20,65±1,85 ^{###}	128,3±7,13 ^{##}
Тканина нирок		
Контроль	12,51±0,75	332,9±17,54
AFB ₁ , 7 доба	10,40±0,60 [*]	217,4±11,90 ^{**}
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	15,31±0,84 ^{**}	350,1±22,93
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	11,71±0,77	320,3±20,35 [#]
AFB ₁ , 14 доба	7,86±0,69 ^{**}	165,2±9,84 ^{**}
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	14,12±0,74 [*]	341,1±21,92
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	12,00±0,63 ^{##}	316,6±18,11 ^{##}
Тканина серця		
Контроль	17,75±10,15	121,8±5,91
AFB ₁ , 7 доба	6,81±0,43 ^{**}	104,4±4,05 [*]
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	21,96±1,05	137,5±7,48
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	18,71±1,03 ^{###}	108,1±6,34
AFB ₁ , 14 доба	8,23±0,59 ^{**}	97,1±3,90 [*]
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	21,93±0,88	139,1±6,75
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	20,90±1,22 ^{##}	115,3±6,18 ^{##}

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,01$)

У процесі досліджень встановлено, що застосування біомаси дріжджів *P. rhodozyma* впливає на активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази в досліджуваних тканинах. На 14-ту добу експерименту, при щодобовому введенні дріжджів тваринам, інтоксикованим афлатоксином B₁, активність цих ензимів наближується до контрольних значень ($p < 0,01-0,001$).

У тканинах нирок і серця, за умов введення інтоксикованим AFB₁ щурам, *P. rhodozyma*, нормалізується активність Г-S-T ($p<0,01$).

Спостерігається зростання активності Г-S-T у тканинах печінки і головного мозку за умов введення тваринам, інтоксикованим AFB₁, біомаси дріжджів *P. rhodozyma* в порівнянні з групами тварин, яким вводили тільки AFB₁ ($p<0,01-0,001$) (табл. 3.14).

Таблиця 3.14

Г-S-T активність та вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів, яким вводили AFB₁, та біомасу *P. rhodozyma* ($M\pm m$, $n=5-7$)

Дослідні групи	Глутатіон-S- трансфераза, мкмоль/хв·на 1 г білка	GSH, мкмоль/г тканини
Тканина печінки		
Контроль	482,4±27,21	2,33±0,16
AFB ₁ , 7 доба	227,5±10,43**	1,45±0,12**
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	493,2±26,57	2,38±0,095
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	377,1±22,25 ^{##}	1,61±0,085
AFB ₁ , 14 доба	201,9±11,12***	0,99±0,08**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	490,8±26,93	2,36±0,115
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	398,6±29,91 ^{##}	2,38±0,092 ^{###}
Тканина головного мозку		
Контроль	214,7±11,16	1,19±0,08
AFB ₁ , 7 доба	105,5±7,27**	0,76±0,07*
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	220,6±18,18	1,22±0,054
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	168,2±11,46 ^{##}	0,92±0,041
AFB ₁ , 14 доба	98,2±7,96**	0,69±0,06**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	222,1±11,69	1,19±0,043
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	195,5±7,13 ^{###}	1,12±0,057 ^{##}
Тканина нирок		
Контроль	571,7±28,58	2,39±0,16
AFB ₁ , 7 доба	445,8±23,91*	1,50±0,10**
<i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	580,9±30,30	2,38±0,14
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 7 доба	491,8±27,88	2,00±0,084 [#]
AFB ₁ , 14 доба	374,7±20,87**	1,20±0,08**
<i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	575,2±29,0	2,44±0,117
AFB ₁ + <i>P. rhodozyma</i> , 14 доба	567,6±28,74 ^{##}	2,27±0,081 ^{##}

Тканина серця		
Контроль	201,6±11,56	1,45±0,08
AFB ₁ , 7 доба	121,6±8,71**	0,99±0,11*
P. rhodozyma, 7 доба	207,9±15,91	1,50±0,051
AFB ₁ + P. rhodozyma, 7 доба	198,6±15,88 ^{##}	1,10±0,056
AFB ₁ , 14 доба	109,6±7,78**	0,81±0,08**
P. rhodozyma, 14 доба	210,7±16,93	1,51±0,047
AFB ₁ + P. rhodozyma, 14 доба	202,9±16,15 ^{##}	1,52±0,058 [#]

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p<0,05$; ## - $p<0,01$; ### - $p<0,001$)

Введення в раціон дріжджів призводить до збільшення вмісту GSH в тканинах тварин, яким вводили афлатоксин B₁ ($p<0,05-0,001$), і водночас наближує значення цього показника до контролю (табл. 3.14, рис. 3.4).

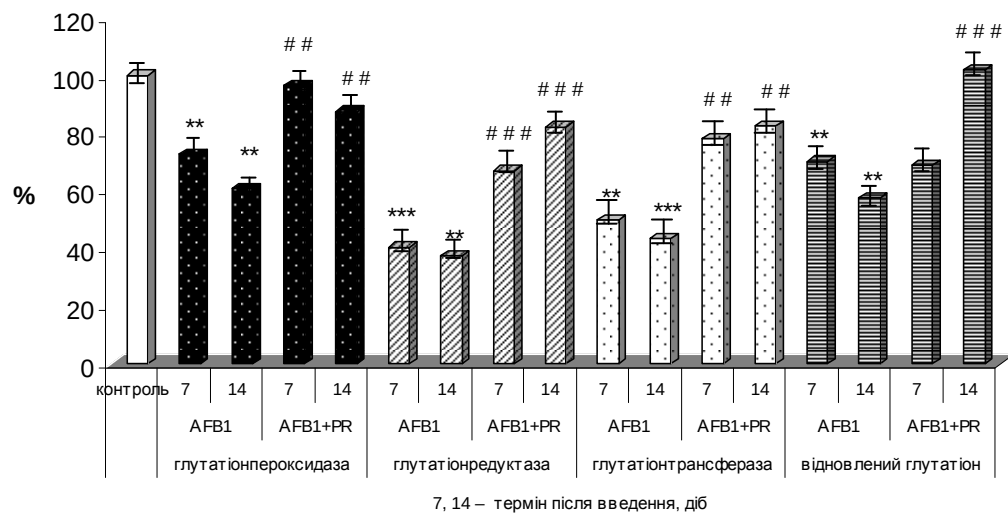


Рис. 3.4. Вплив AFB₁ і біомаси *Phaffia rhodozyma* на стан глутатіонової системи у печінці щурів

Примітка. На цьому і подальших рисунках: за 100 % приймали значення показників у тварин контрольних груп; *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p<0,05$; ## - $p<0,01$; ### - $p<0,001$)

Результати досліджень свідчать, що за умов щоденного введення біомаси дріжджів *P. rhodozyma* показники глутатіонової антиоксидантної системи (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, відновлений глутатіон) досягають контрольних значень.

3.2.3. Висновки

Результати дослідження коригувальної дії *Phaffia rhodozyma* свідчать, що додавання біомаси дріжджів до раціону інтоксикованих афлатоксином В₁ щурів, сприяє зменшенню пошкоджувальної дії цього мікотоксину на організм. *P. rhodozyma* синтезують каротиноїд астаксантин, що володіє антиоксидантними властивостями. Щодобове введення *P. rhodozyma* підтримує функціональну активність тканин, а отже й детоксикацію афлатоксину В₁.

Зниження під дією біомаси каротиносинтезувальних дріжджів вмісту кінцевих продуктів ПОЛ у досліджуваних органах щурів може свідчити, що наявні в дріжджах каротиноїди пригнічують вільнорадикальне окиснення ліпідів.

Згодовування інтоксикованим тваринам біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* приводило до зростання активності ензимів антиоксидантної системи в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця. Отже, зменшуються наслідки оксидативного стресу в тканинах тварин інтоксикованих афлатоксином В₁.

Отримані результати можуть бути базою для практичного використання біомаси дріжджів *P. rhodozyma* для зменшення метаболічних наслідків афлатоксикозів.

3.3. Прооксидантно-антиоксидантні зміни у тканинах щурів у разі введення вітаміну Е на тлі AFB₁-інтоксикації

Результати модельних досліджень на білих щурах, наведених вище, свідчать, що афлатоксин В₁ порушує окремі ланки метаболізму у тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця.

Антиоксидантна система є потужним механізмом, що запобігає розвитку вільнорадикальних та пероксидних реакцій в організмі. Ця система діє завдяки наявності в організмі антиоксидантів, у складі яких міститься рухливий атом водню. У результаті взаємодії антиоксидантів та вільних радикалів утворюються сполуки, які є слабкими окисниками й не можуть продовжувати перебіг вільнорадикальних реакцій окиснення, тобто вони обривають ці ланцюги [17, 26]. Радикали молекул-антиоксидантів виводяться у вигляді кінцевих продуктів. Антиоксиданти можуть знешкоджувати вільні радикали ще до моменту реалізації їх руйнівної дії. Таким чином основним завданням антиоксидантної системи є зменшення кількості вільних радикалів до мінімально можливого рівня [91, 97, 256].

До компонентів антиоксидантної системи організму відносять низькомолекулярні неферментні сполуки (жиророзчинні та водорозчинні вітаміни). Вітамін Е забезпечує захист мембранних структур від ушкодження та руйнації під дією вільних радикалів [104]. Цей вітамін ефективно обриває ланцюги вільнорадикальних реакцій, тому токоферол відносять до ключових жиророзчинних антиоксидантів клітини [29, 40, 217]. У низці досліджень [63, 82, 109, 123, 147, 159, 190, 201, 221, 228, 310] доведено, що введення до раціону тварин антиоксидантів зменшує рівень метаболічних порушень спричинених мікотоксинами.

У нашій роботі проведено дослідження впливу вітаміну Е на показники, які дають можливість охарактеризувати прооксидантно-антиоксидантний стан тканин печінки, головного мозку, нирок і серця тварин за умов щодобового введення афлатоксину В₁.

3.3.1. Вплив вітаміну Е на процеси ліпопероксидації у тканинах щурів за щодобового введення афлатоксину В₁

Вітамін Е – біологічний антиоксидант, який захищає клітини від пошкодження вільними радикалами, бере участь в ліпідному обміні, формуванні клітинних мембран, укріплює стінки кровоносних судин, а також забезпечує клітинне дихання, підвищує загальну опірність організму тварин [126, 146].

У процесі досліджень встановлено, що одноразове введення вітаміну Е за умов щодобової інтоксикації тварин афлатоксином В₁ сприяє зниженню концентрації продуктів ПОЛ у тканинах порівняно з дослідними групами щурів, які зазнавали лише впливу АFB₁.

На 7-му добу експерименту, за введення вітаміну Е на тлі АFB₁-інтоксикації, у тканинах печінки концентрація ТБК-активних продуктів збільшувалась на 23,7 % ($p < 0,05$), головного мозку – на 27,2 % ($p < 0,05$), нирок – на 37,3 % ($p < 0,05$), серця – на 21,6 % ($p < 0,05$), на 14-ту добу відбувається значне зростання концентрації продуктів ліпопероксидації у досліджуваних тканинах ($p < 0,05-0,01$) порівняно з контролем (табл. 15). Необхідно відзначити, що накопичення ТБК-активних продуктів у тканинах не таке інтенсивне порівняно з тканинами тварин, яким вводили АFB₁.

Таблиця 3.15

Вміст ТБК-активних продуктів в тканинах щурів, яким вводили
афлатоксин В₁ і вітамін Е, (М±m, n=5-7)

Дослідні групи	ТБК-активні продукти
Тканина печінки (нмоль/г тканини)	
Контроль	44,60±3,63
Вітамін Е	39,99±2,13
AFB ₁ , 7 доба	68,51±5,81*
AFB ₁ + вітамін Е, 7 доба	55,18±4,76*
AFB ₁ , 14 доба	86,30±7,60**
AFB ₁ + вітамін Е, 14 доба	77,40±6,07**
Тканина головного мозку (нмоль/г тканини)	
Контроль	28,91±2,74
Вітамін Е	26,93±1,91
AFB ₁ , 7 доба	44,33±3,25*
AFB ₁ + вітамін Е, 7 доба	36,76±1,82*
AFB ₁ , 14 доба	55,50±4,70**
AFB ₁ + вітамін Е, 14 доба	44,91±3,45 [#]
Тканина нирок (нмоль/г тканини)	
Контроль	31,22±2,51
Вітамін Е	36,41±2,14
AFB ₁ , 7 доба	47,16±3,15**
AFB ₁ + вітамін Е, 7 доба	42,87±1,99*
AFB ₁ , 14 доба	53,90±3,87**
AFB ₁ + вітамін Е, 14 доба	51,15±4,51*
Тканина серця (нмоль/г тканини)	
Контроль	28,10±2,02
Вітамін Е	27,11±1,81
AFB ₁ , 7 доба	40,29±2,92*
AFB ₁ + вітамін Е, 7 доба	34,17±1,71*
AFB ₁ , 14 доба	50,14±3,45**
AFB ₁ + вітамін Е, 14 доба	48,81±2,39**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ ([#] - p<0,05; ^{##} - p<0,01; ^{###} - p<0,001)

Отже, результати досліджень свідчать, що введення вітаміну Е щурам, інтоксикованим AFB₁, перешкоджає накопиченню продуктів

ліпопероксидації на 7-му добу експерименту у всіх досліджуваних тканинах, проте на 14-ту добу протекторний ефект вітаміну Е втрачається.

3.3.2. Прооксидантно-антиоксидантний баланс у тканинах щурів за введення вітаміну Е на тлі інтоксикації афлатоксином В₁

Наступним етапом було визначення активності ензимів антиоксидантної системи, що регулюють прооксидантно-антиоксидантний баланс у тканинах.

Введення вітаміну Е за щодобової інтоксикації афлатоксином В₁, призводить до підвищення супероксиддисмутази активності на 7-му та 14-ту доби експерименту порівняно з групами тварин, яким вводили АFB₁ ($p < 0,05-0,01$) (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Супероксиддисмутазна активність в тканинах щурів, яким вводили АFB₁ та вітамін Е ($M \pm m$, $n=5-7$)

Дослідні групи		Супероксиддисмутаза, ум. од./хв·на 1 мг тканини			
		Печінка	Головний мозок	Серце	Нирки
Контроль		6,84±0,47	6,47±0,39	5,89±0,36	4,71±0,24
Вітамін Е		7,95±0,55*	7,13±0,51*	6,01±0,37	4,08±0,15
7-ма доба	АFB ₁	4,79±0,38*	4,89±0,39*	4,55±0,23*	3,69±0,29*
	АFB ₁ + вітамін Е	6,97±0,50 ^{##}	5,64±0,32	5,02±0,36	3,89±0,16
14-та доба	АFB ₁	4,09 ±0,32**	4,17±0,34**	4,40±0,26*	3,25±0,21**
	АFB ₁ + вітамін Е	4,86±0,33*	4,28±0,32*	3,05±0,17 ^{###}	3,31±0,12

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили АFB₁ (# - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$)

Аналіз активності глутатіон-залежних ензимів у печінці, головному мозку, нирках і серці щурів, за одночасної дії афлатоксину B₁ та вітаміну E, зафіксував зниження активності ГПО, ГР і Г-S-T, на 7-му та 14-ту доби досліджу. Проте, необхідно відмітити, що при введенні вітаміну E на тлі AFB₁-інтоксикації, активність ГПО, ГР і Г-S-T зростає порівняно з активністю ензимів на 7-му добу в тварин, яким вводили AFB₁, хоча й не повертається до меж контролю. На 14-ту добу експерименту, активність усіх глутатіонових ензимів знижується, хоча й не досягає активності цих ензимів у тканинах тварин, яким вводили афлатоксин B₁.

Таблиця 3.17

Глутатіонпероксидазна і глутатіонредуктазна активність в тканинах щурів, яким вводили AFB₁ та вітамін E (M±m, n=5-7)

Дослідні групи	Глутатіонпероксидаза, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	Глутатіонредуктаза, нмоль NADPH/хв·мг білка
Тканина печінки		
Контроль	158,5±9,21	29,45±1,89
Вітамін E	151,9±8,29	28,43±2,12
AFB ₁ , 7 доба	110,6±5,51**	10,07±0,47***
AFB ₁ + вітамін E, 7 доба	117,6±5,81**	17,13±0,94 ^{###}
AFB ₁ , 14 доба	99,6 ±6,33**	11,27±0,86**
AFB ₁ + вітамін E, 14 доба	106,4±5,64***	11,67±0,89**
Тканина головного мозку		
Контроль	136,9±5,94	23,14±1,51
Вітамін E	129,9±6,04	29,77±2,21
AFB ₁ , 7 доба	108,6±5,43*	7,38±0,57
AFB ₁ + вітамін E, 7 доба	105,7±6,51*	18,86±0,91 ^{###}
AFB ₁ , 14 доба	98,5±4,93**	8,14±0,76***
AFB ₁ + вітамін E, 14 доба	101,4±6,05**	13,81±0,98 [#]
Тканина нирок		
Контроль	332,9±17,54	12,51±0,75
Вітамін E	312,5±19,34	14,03±0,83
AFB ₁ , 7 доба	217,4±11,90**	10,40±0,60*
AFB ₁ + вітамін E, 7 доба	273,6±16,55 [#]	11,86±0,88
AFB ₁ , 14 доба	165,2±9,84**	7,86±0,69**
AFB ₁ + вітамін E, 14 доба	251,8±18,11 ^{##}	10,50±0,95 [#]

Тканина серця		
Контроль	121,8±5,91	17,75±10,15
Вітамін Е	131,2±5,64	20,34±1,07
AFB ₁ , 7 доба	104,4±4,05*	6,81±0,43**
AFB ₁ + вітамін Е, 7 доба	103,5±5,32*	18,13±0,73 ^{###}
AFB ₁ , 14 доба	97,1±3,90*	8,23±0,59**
AFB ₁ + вітамін Е, 14 доба	90,5±4,81**	11,74±0,87**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p<0,05$; ## - $p<0,01$; ### - $p<0,001$)

Активність ГПО за одноразового введення вітаміну Е при щодобовому ураженні AFB₁ у тканинах печінки на 7-му добу знижувалася на 25,8 % ($p<0,01$), головного мозку – 22,8 % ($p<0,05$), нирок – 17,8 % ($p<0,01$), серця – 14,6 % ($p<0,05$). Одночасно у груп інтоксикованих AFB₁ активність ензиму знижувалась на 7-му добу на 30,5 %, 20,6 %, 34,7 %, 13,9 % ($p<0,01-0,001$) (табл. 3.17). На 14-ту добу активність ензиму поступово знижувалася й у тварин дослідних груп з додатковим введенням вітаміну Е, хоча й не опускалася до значень у тканинах тварин, яким вводили афлатоксин В₁.

Введення вітаміну Е щурам, ураженим AFB₁, також позитивно впливало на активність ГР у досліджуваних тканинах на 7-му добу експерименту. На 14-ту добу, активність ензиму також знижується у досліджуваних тканинах, проте у тканинах печінки активність ГР за введення вітаміну Е та AFB₁ зрівнюється з показниками у тканинах щурів за введення афлатоксину В₁ (табл. 3.17).

Глутатіонтрансферазна активність за введення вітаміну Е на тлі AFB₁-інтоксикації має динаміку подібну до ГПО і ГР. Активність Г-S-T у печінці, головному мозку, нирках і серці за введення вітаміну Е та AFB₁ на 7-му добу знижується на 23,0 %, 5,2 %, 13,7 %, 8,7 % ($p<0,05-0,01$), відповідно (табл. 3.18).

За щодобового введення AFB₁ і одноразового вітаміну Е вміст відновленого глутатіону знижується у зв'язку зі зниженням ензимів, що беруть участь у його окисненні та синтезі. На 7-ту добу вміст GSH у

тканинах печінки знижується на 37,0 %, головного мозку – 22,7 %, нирок – 10,9 %, серця – 31,7 % ($p<0,05-0,01$) (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Активність глутатіон-S-трансферази та вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів, яким вводили AFB₁ та вітамін E ($M\pm m$, $n=5-7$)

Дослідні групи	Г-S-T, мкмоль/хв. на 1 г білка	GSH, мкмоль/г тканини
Тканина печінки		
Контроль	482,4±27,21	2,33±0,16
Вітамін E	501,7±30,50	2,24±0,10
AFB ₁ , 7 доба	227,5±10,43**	1,45±0,12**
AFB ₁ + вітамін E, 7 доба	371,4±20,61 ^{##}	1,47±0,09**
AFB ₁ , 14 доба	201,9±11,12***	0,99±0,08**
AFB ₁ + вітамін E, 14 доба	286,9±13,68 [#]	1,41±0,07**
Тканина головного мозку		
Контроль	214,7±11,16	1,19±0,08
Вітамін E	230,3±10,21	1,26±0,07
AFB ₁ , 7 доба	105,5±7,27**	0,76±0,07*
AFB ₁ + вітамін E, 7 доба	203,5±11,04 ^{##}	0,92±0,05*
AFB ₁ , 14 доба	98,2±7,96**	0,69±0,06**
AFB ₁ + вітамін E, 14 доба	133,7±8,41 [#]	0,78±0,05**
Тканина нирок		
Контроль	571,7±28,58	2,39±0,16
Вітамін E	566,8±22,91	2,48±0,13
AFB ₁ , 7 доба	445,8±23,91*	1,50±0,10**
AFB ₁ + вітамін E, 7 доба	493,4±22,73 [#]	2,13±0,12 [#]
AFB ₁ , 14 доба	374,7±20,87**	1,20±0,08**
AFB ₁ + вітамін E, 14 доба	341,0±18,51**	1,75±0,08 ^{##}
Тканина серця		
Контроль	201,6±11,56	1,45±0,08
Вітамін E	198,9±9,71*	1,51±0,08
AFB ₁ , 7 доба	121,6±8,71**	0,99±0,11*
AFB ₁ + вітамін E, 7 доба	184,2±8,54 ^{##}	0,99±0,05**
AFB ₁ , 14 доба	109,6±7,78**	0,81±0,08**
AFB ₁ + вітамін E, 14 доба	129,6±8,97 [#]	0,89±0,05**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p<0,05$; ## - $p<0,01$)

Результати досліджень свідчать, що за умов одноразового введення вітаміну Е показники глутатіонової антиоксидантної системи (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, відновлений глутатіон) підвищується (рис. 3.5).

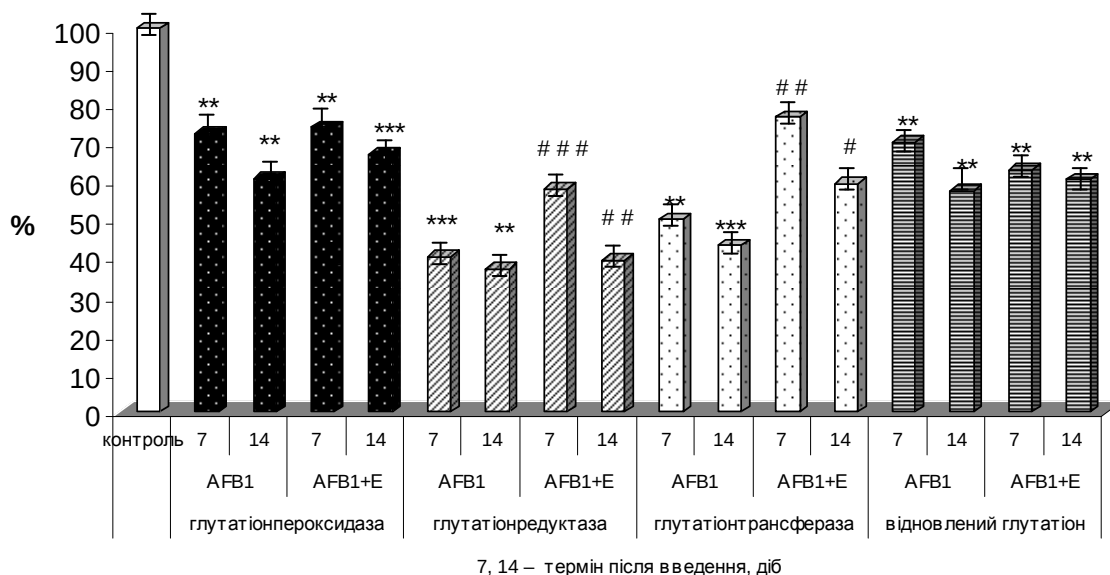


Рис. 3.5. Вплив AFB₁ і вітаміну Е на стан глутатіонової системи у печінці щурів

Однак, необхідно відмітити, що за одноразового введення вітаміну Е, на тлі інтоксикації AFB₁, активність ензимів значно знижується на 14-ту добу у всіх досліджуваних тканинах щурів порівняно з контролем ($p < 0,05-0,001$).

3.3.3. Висновки

Вітамін Е є універсальним протектором клітинних мембран від окисного пошкодження. Його розміщення в мембрані перешкоджає контакту кисню з мембранними ненасиченими ліпідами, тобто захищає біомембрани від деструкції. Антиоксидантні властивості вітаміну Е обумовлені його здатністю безпосередньо взаємодіяти з вільними радикалами кисню, вільними радикалами ненасичених жирних кислот і пероксидами жирних

кислот, захищати від окиснення подвійні зв'язки в молекулах каротину і вітаміну А.

В умовах корекції вітаміном Е експериментальної AFB₁-інтоксикації вміст ТБК-активних продуктів у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця щурів на 7-му добу був суттєво нижчим, ніж без введення вітаміну. Вміст ТБК-активних продуктів зростав у порівнянні з контролем максимально у тканинах печінки і головного мозку на 37,5-37,6 % ($p < 0,05$) на 7-му добу інтоксикації. Це свідчить, що введення вітаміну Е зменшує активацію ПОЛ при AFB₁-інтоксикації.

Аналіз стану прооксидантно-антиоксидантної системи у тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця щурів при введенні вітаміну Е на тлі щодобової інтоксикації AFB₁ свідчить, що активність антиоксидантних ензимів (СОД, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-трансфераза) та вміст відновленого глутатіону не значно знижується на 7-му добу експерименту (порівняно з показниками щурів з експериментальною інтоксикацією) та різко знижується на 14-ту добу у всіх досліджуваних тканинах.

3.4. Прооксидантно-антиоксидантні зміни у тканинах щурів у разі введення препарату «Е-Селен» на тлі гострої інтоксикації афлатоксином В₁

Розповсюдження афлатоксинів завдає господарствам значних економічних збитків через втрати кормів, зниження їхньої кормової цінності, погіршення здоров'я тварин і птиці та підвищення чутливості до мікозних, бактеріальних і вірусних захворювань, загибель тварин, витрати на проведення лікувальних і профілактичних заходів [22, 24]. Тому профілактика і подолання цих наслідків має важливе значення для збереження агропромислового комплексу України.

Аналіз результатів модельних досліджень на білих щурах, наведених вище, свідчить, що афлатоксин B₁ порушує метаболізм у тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця.

Пошук ефективних протекторів, здатних протидіяти метаболічним розладам та розвитку оксидативного стресу в організмі тварин, які зазнають впливу AFB₁ та інших афлатоксинів є актуальною проблемою сьогодення [83, 102, 135, 152, 239, 240, 272, 293].

У низці досліджень [40, 68, 96] встановлено, що введення в раціон тварин антиоксидантів зумовлює зменшення загальної інтоксикації організму. Серед антиоксидантів привертає увагу й препарат «Е-Селен» – комплекс вітаміну Е та селену. Цей препарат нині широко застосовують у тваринництві й ветеринарній медицині. Однак для зменшення метаболічних порушень спричинених AFB₁ його дотепер не застосовували. Тому, з метою зменшення негативних наслідків спричинених щодобовим введенням AFB₁ ми вирішили дослідити можливу коригувальну дію препарату «Е-Селен» (ЗАТ «Ніта-Фарм»). Це воднодисперсна форма вітаміну Е (5% токоферолу ацетату) з додаванням до нього Селену в формі селеніту натрію (0,5% в перерахунку на елементарний Селен). Нами проведено дослідження впливу препарату «Е-Селен» на показники, які дають можливість охарактеризувати прооксидантно-антиоксидантний стан тканин печінки, головного мозку, нирок і серця тварин за умов щодобового введення афлатоксину B₁.

3.4.1. Вплив препарату «Е-Селен» на процеси пероксидного окиснення ліпідів у тканинах щурів за щодобового введення афлатоксину B₁

Одним із механізмів патогенної дії афлатоксинів може бути індукція процесу утворення вільних радикалів та ініціація реакції пероксидного окиснення ліпідів. У багатьох випадках утворення вільних радикалів може

являти собою одну з ланок у механізмах токсичності, суттєвішу, ніж пряме пошкодження тканин. Тому, наступним етапом нашої роботи було вивчення впливу препарату «Е-Селен» на процеси пероксидного окиснення ліпідів у тканинах органів.

Результати аналізу концентрації продуктів ПОЛ за умов введення тваринам препарату «Е-Селен» свідчать, що даний комплекс сприяє зменшенню стимулювального впливу AFB₁ на процеси ліпопероксидації в досліджуваних тканинах (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

Вміст ТБК-активних продуктів в тканинах щурів, яким вводили афлатоксин В₁ та препарат «Е-Селен», (M±m, n=5-7)

Контроль	Е-Селен	7-ма доба		14-та доба	
		AFB ₁	AFB ₁ + Е-Селен	AFB ₁	AFB ₁ + Е-Селен
Тканина печінки (нмоль/г тканини)					
44,60±3,63	43,44±1,99	68,51±5,81*	59,89±4,51*	86,30±7,60**	81,44±5,62
Тканина головного мозку (нмоль/г тканини)					
28,91±2,74	28,10±1,49	44,33±3,25*	37,37±2,78	55,50±4,70**	52,56±3,86**
Тканина нирок (нмоль/г тканини)					
31,22±2,51	29,70±2,22	47,16±3,15**	37,31±2,39 [#]	53,90±3,87**	48,22±2,78**
Тканина серця (нмоль/г тканини)					
28,10±2,02	26,76±1,46	40,29±2,92*	33,33±1,72	50,14±3,45**	47,70±2,12**

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - p<0,05; ## - p<0,01)

Установлено, що одноразове введення «Е-Селену» тваринам, які зазнавали щодобового впливу AFB₁, зумовлює зменшення вмісту ТБК-активних продуктів в досліджуваних тканинах щурів на 7-ту добу ($p<0,05$), але на 14-ту добу експерименту цей показник збільшується в усіх досліджуваних тканинах ($p<0,01$).

3.4.2. Стан системи антиоксидантного захисту у тканинах щурів за дії препарату «Е-Селен» на тлі гострої інтоксикації афлатоксином В₁

Підвищення рівня утворення в інтоксикованих афлатоксином щурів продуктів пероксидації ліпідів призводить до зниження антиоксидантного захисту. Одночасно, зменшення інтенсивності процесів ПОЛ у досліджуваних тканинах під впливом препарату «Е-Селен», ймовірно пов'язане із зростанням активності антиоксидантних ензимів.

За умов одноразового введення «Е-Селен» на тлі інтоксикації AFB₁, в досліджуваних тканинах щурів на 7-му добу зростає супероксиддисмутазна активність порівняно з дослідною групою щурів, яким вводили тільки AFB₁ (табл. 3.20). Так, у тканинах печінки активність СОД на 7-му добу знижувалася на 2,6 % ($p<0,05$), головного мозку – 9,0 % ($p<0,05$), нирок – 12,7 %, серця – 10,5 % ($p<0,05$). Проте, при щодобовому введенні AFB₁, активність СОД значно знижується на 14-ту добу у всіх досліджуваних тканинах щурів на 39,2 %, 36,3 %, 33,0 %, 64,7 % відповідно ($p<0,01-0,001$). Найвиразніше, за введення препарату «Е-Селен» на тлі інтоксикації AFB₁, активність СОД пригнічується у тканині серця на 64,7 % ($p<0,001$) на 14-ту добу експерименту. У тварин зі щодобовим введенням AFB₁, активність ензиму знижується на 25,3 % ($p<0,05$).

Таблиця 3.20

Супероксиддисмутазна активність в тканинах щурів, яким вводили AFB₁,
«Е-Селен» (M±m, n=5-7)

Контроль	Е-Селен	7-ма доба		14-та доба	
		AFB ₁	AFB ₁ + Е-Селен	AFB ₁	AFB ₁ + Е-Селен
Тканина печінки (ум. од./хв·на 1 мг тканини)					
6,84±0,47	8,32±0,51*	4,79±0,38*	6,66±0,51 [#]	4,09 ±0,32**	4,16±0,28**
Тканина головного мозку (ум. од./хв·на 1 мг тканини)					
6,47±0,39	7,13±0,59	4,89±0,39*	5,89±0,35 [#]	4,17±0,34**	4,12±0,31**
Тканина нирок (ум. од./хв·на 1 мг тканини)					
4,71±0,24	4,91±0,14	3,69±0,29*	4,11±0,28	3,25±0,21**	3,16±0,18**
Тканина серця (ум. од./хв·на 1 мг тканини)					
5,89±0,36	6,24±0,39	4,55±0,23*	5,27±0,20*	4,40±0,26*	2,08±0,19 ^{###}

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001); [#], ^{##}, ^{###} - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ ([#] - p<0,05; ^{###} - p<0,001)

Згідно з результатами наших досліджень, застосування препарату «Е-Селен» впливає на функціональний стан ензимів системи глутатіону та вміст GSH в досліджуваних тканинах щурів (табл. 3.21).

Слід відзначити, що введення препарату «Е-Селен» щурам, які не зазнавали впливу афлатоксину, зумовлює збільшення активності глутатіонпероксидази у всіх досліджуваних тканинах порівняно з дослідною групою інтоксикованих AFB₁ тварин. Це зумовлено тим, що глутатіонпероксидаза – селен-залежний фермент.

Таблиця 3.21

Глутатіонпероксидазна і глутатіонредуктазна активність в тканинах щурів,
яким вводили AFB₁ та препарат «Е-Селен» (M±m, n=5-7)

Дослідні групи	Глутатіонпероксидаза, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	Глутатіонредуктаза, нмоль NADPH/хв·мг білка
Тканина печінки		
Контроль	158,5±9,21	29,45±1,89
Е-Селен	186,9±17,81*	31,71±1,41
AFB ₁ , 7 доба	110,6±5,51**	10,07±0,47***
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	131,6±9,17 [#]	19,40±1,12 ^{##}
AFB ₁ , 14 доба	99,6 ±6,33**	11,27±0,86**
AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	137,0±11,73 ^{##}	10,20±0,82***
Тканина головного мозку		
Контроль	136,9±5,94	23,14±1,51
Е-Селен	161,2±9,75*	25,11±1,38
AFB ₁ , 7 доба	108,6±5,43*	7,38±0,57
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	124,8±10,62 [#]	16,11±0,82 ^{##}
AFB ₁ , 14 доба	98,5±4,93**	8,14±0,76***
AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	118,1±10,34 ^{##}	9,53±0,83**
Тканина нирок		
Контроль	332,9±17,54	12,51±0,75
Е-Селен	347,1±27,73	14,11±0,46
AFB ₁ , 7 доба	217,4±11,90**	10,40±0,60*
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	294,7±20,51 [#]	11,50±0,55
AFB ₁ , 14 доба	165,2±9,84**	7,86±0,69**
AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	287,8±18,90 ^{##}	9,10±0,95*
Тканина серця		
Контроль	121,8±5,91	17,75±10,15
Е-Селен	156,7±9,95*	22,53±0,96**
AFB ₁ , 7 доба	104,4±4,05*	6,81±0,43**
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	118,4±9,16 [#]	18,42±1,16 ^{###}
AFB ₁ , 14 доба	97,1±3,90*	8,23±0,59**
AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	121,9±9,68 [#]	11,74±0,84 ^{##}

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - p<0,05; ## - p<0,01; ### - p<0,001)

Результати досліджень свідчать, що у щурів, яким вводили AFB₁ впродовж 7-ми і 14-ти діб, застосування «Е-Селен» сприяє нормалізації активності ГПО в тканині серця ($p<0,05$) (табл. 3.21).

Результати досліджень свідчать, що одноразове введення препарату «Е-Селен» призводить до підвищення глутатіонредуктазної активності на 7-му введення щурам AFB₁ порівняно з інтоксикованими AFB₁ тваринами. Проте, на 14 добу експерименту, активність ензиму вірогідно пригнічується у всіх досліджуваних тканинах.

Динаміка зменшення активності Г-S-T подібна до глутатіонредуктазної активності в досліджуваних тканинах за умов одноразового введення препарату „Е-Селен” (табл. 3.22, рис. 3.6).

Таблиця 3.22

Активність глутатіон-S-трансферази та вміст відновленого глутатіону в тканинах щурів, яким вводили AFB₁ та препарат «Е-Селен» ($M\pm m$, $n=5-7$)

Дослідні групи	Г-S-T, мкмоль/хв. на 1 г білка	GSH, мкмоль/г тканини
Тканина печінки		
Контроль	482,4±27,21	2,33±0,16
Е-Селен	492,2±25,78	2,27±0,09
AFB ₁ , 7 доба	227,5±10,43**	1,45±0,12**
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	368,1±21,20 ^{##}	1,62±0,07**
AFB ₁ , 14 доба	201,9±11,12***	0,99±0,08**
AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	251,2±9,93**	1,47±0,11**
Тканина головного мозку		
Контроль	214,7±11,16	1,19±0,08
Е-Селен	219,2±11,93	1,19±0,06
AFB ₁ , 7 доба	105,5±7,27**	0,76±0,07*
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	198,4±10,77 ^{##}	0,88±0,04*
AFB ₁ , 14 доба	98,2±7,96**	0,69±0,06**
AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	115,7±7,28 [#]	0,81±0,08 [#]
Тканина нирок		
Контроль	571,7±28,58	2,39±0,16
Е-Селен	574, 8±31,42	2,33±0,18
AFB ₁ , 7 доба	445,8±23,91*	1,50±0,10**
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	501,8±25,71	1,99±0,11 [#]
AFB ₁ , 14 доба	374,7±20,87**	1,20±0,08**

AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	327,6±16,75	1,53±0,11 ^{##}
Тканина серця		
Контроль	201,6±11,56	1,45±0,08
Е-Селен	203,4±14,66	1,45±0,06
AFB ₁ , 7 доба	121,6±8,71 ^{**}	0,99±0,11 [*]
AFB ₁ + Е-Селен, 7 доба	199,6±11,35 ^{##}	0,99±0,06 ^{**}
AFB ₁ , 14 доба	109,6±7,78 ^{**}	0,81±0,08 ^{**}
AFB ₁ + Е-Селен, 14 доба	124,6±9,19 ^{**}	1,11±0,09 [*]

Примітка: *, **, *** - вірогідність різниць порівняно з контролем (* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$); #, ##, ### - вірогідність різниць порівняно з групою тварин, яким вводили AFB₁ (# - $p<0,05$; ## - $p<0,01$)

Аналіз результатів досліджень вказує на позитивний вплив одноразового введення препарату «Е-Селен» на рівень відновленого глутатіону у тканинах щурів, які зазнавали впливу афлатоксину В₁. Зокрема, рівень GSH в тканинах печінки на 14-ту добу при введенні AFB₁ зменшився на 37,8 % ($p<0,001$), а при додаванні препарату «Е-Селен» – на 30,5 % ($p<0,01$).

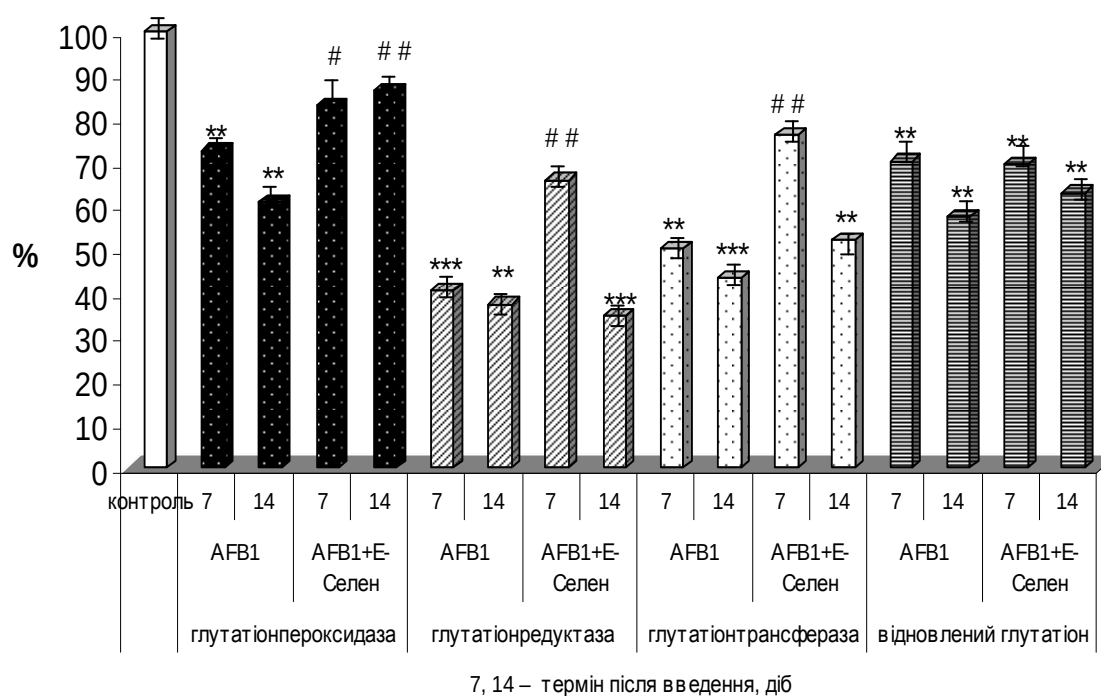


Рис. 3.6. Вплив AFB₁ і препарату Е-Селен на стан глутатіонової системи у печінці щурів

Отже, на 7 добу після введення препарату «Е-Селен» на тлі AFB₁-інтоксикації, активність ензимів антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза) зростає порівняно зі щурами інтоксикованими AFB₁, зокрема глутатіонпероксидази. Проте, відмічено, що на 14 добу експерименту активність усіх ензимів знижується.

3.4.3. Висновки

Отримані результати дають підставу стверджувати, що введення тваринам препарату «Е-Селен» гальмує розвиток оксидативного стресу, зумовленого афлатоксином B₁, активізує процеси знешкодження продуктів пероксидного окиснення ліпідів в результаті реакції нуклеофільного заміщення та приєднання, що забезпечує локальний захист організму, збільшуючи стійкість тканин організму в цілому.

Введення препарату «Е-Селен» щурам, інтоксикованим AFB₁, сприяє нормалізації рівня глутатіону на 7-му добу, збільшує глутатіонредуктазну і глутатіонтрансферазну активність, нормалізує глутатіонпероксидазу на 7-му добу експерименту. Проте активність ензимів і рівень відновленого глутатіону значно знижується на 14-ту добу.

Таким чином, згідно результатів, у досліджуваних тканинах тварин, яким вводили AFB₁, застосування препарату «Е-Селен» сприяє покращенню показників функціонального стану системи глутатіону.

Коригувальна дія препарату «Е-Селен» зумовлюється, перш за все, антиоксидантним впливом компонентів препарату. Отримані результати свідчать про можливість використання препарату «Е-Селен» з метою профілактики та зменшення метаболічних наслідків афлатоксикозів.

Результати, представлені в роботі, опубліковані в таких працях:

1. Антоняк Г. Л. Афлатоксини: біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, О. М. Стефанишин, **Н. К. Коваль**, Р. О. Федяков // Біологія тварин. – 2009. – Т.11, № 1–2. – С. 17–28.
2. Антоняк Г. Л. Вплив мікотоксинів на здоров'я тварин / Г. Л. Антоняк, Р. О. Федяков, **Н. К. Коваль**, О. М. Стефанишин // Науковий вісник ветеринарної медицини. – Біла-Церква, 2010. – Вип. 5(78). – С. 10–13.
3. Антоняк Г. Л. Вплив афлатоксину В1 на стан антиоксидантної системи в клітинах органів та еритроцитах крові білих щурів / Г. Л. Антоняк, **Н. К. Коваль**, М. Р. Досвідчинська, Х. М. Головчак // Науковий часопис Національного педагогічного університету імені М. П. Драгоманова. – Серія № 20: біологія. – Київ, 2013. – Вип. 5. – С. 112–117.
4. Antonyak H. Effects of aflatoxin B1 on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in rat organs and erythrocytes / H. Antonyak, Cl. Olijnyk, **N. Koval**, R. Fedyakov, M. Dosviadchynska, I. Panchuk, B. Chekh // Вісник Львівського університету. Серія: біологічна. – Львів, 2015. – Вип. 69. – С. 41–48.
5. **Гойванович Н. К.** Вплив афлатоксину В1 на прооксидантно-антиоксидантний баланс в клітинах білих щурів / Н. К. Гойванович // Біологія тварин. – 2016. – № 3. – С. 17–23.
6. **Гойванович Н. К.** Вплив біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на стан антиоксидантної системи в тканинах білих щурів за щодобового введення афлатоксину В1 / Н. К. Гойванович, Г. Л. Антоняк // Вісник проблем біології та медицини. – 2017. – Вип. 2(136). – С. 52–57.
7. **Гойванович Н. К.** Вплив біомаси *Phaffia rhodozyma* й антиоксидантів на ензими системи глутатіону у тканинах білих щурів за дії афлатоксину В1 / Н. К. Гойванович, Г. Л. Антоняк // Наукові доповіді НУБіП

України. – 2017. – №3(67). – 12 с. – Режим доступу до журн.: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/8725/8063>

8. **Koval N.** Mycotoxins in forages / N. Koval, H. Antonyak // *Materialy Jubileuszowej V Ogolnopolskiej Młodzieżowej Konferencji Naukowej „Nauki rolnicze w rzeczywistosci społeczno-gospodarczej w wspolczesnych obszarow wiejskich”* (21–23 kwietnia 2009 r., Rzeszow). – Rzeszow, 2009. – S. 57–61.

9. **Koval N.** Acute toxicity of aflatoxin B1 / N. Koval, R. Fedyakow // *Materialy VI Ogolnopolskiej konferencji naukowych młodych pracowników nauki i studentow “Nowe tendencje rozwoju rolnictwa i obszarów wiejskich”* (20–22 kwietnia 2010 r., Rzeszow) – Rzeszow, 2010. – S. 10–13.

10. **Коваль Н. К.** Афлатоксини та їх вплив на організм тварин / **Н. К. Коваль**, Р. О. Федяков, Г. Л. Антоняк // *Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів „Сучасний стан та перспективи розвитку біо- і агроценозів в умовах постійного техногенного забруднення* (3–4 листопада 2010 р., Трускавець). – Трускавець, 2010. – С. 33–35.

11. **Коваль Н. К.** Стан процесів ПОЛ і антиоксидантної системи клітин білих щурів за умов гострої інтоксикації афлатоксином В1 / **Н. К. Коваль**, Р. О. Федяков, Г. Л. Антоняк // *Біологія: від молекули до біосфери. Матеріали III Міжнародної конференції молодих науковців* (25–26 листопада 2010 р., Харків). – Харків, 2010. – С. 36–37.

12. **Коваль Н. К.** Афлатоксини – природні канцерогени / **Н. К. Коваль**, Р. О. Федяков, Г. Л. Антоняк // *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Захист навколишнього середовища. Збалансоване природо-користування»* (16–17 листопада 2010 р. Львів). – Львів, 2010. – С. 55

13. **Коваль Н. К.** Забруднення кормів мікотоксинами роду *Aspergillus* / **Н. К. Коваль**, Г. Л. Антоняк // *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції „Роль науки у підвищенні технологічного рівня і ефективності*

АПК України” (18–20 травня 2011 р., Тернопіль). – Тернопіль, 2011. – С. 107–109.

14. **Коваль Н. К.** Афлатоксини: хімічна будова та метаболізм / **Н. К. Коваль**, Г. Л. Антоняк // Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених „Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук” (20 травня 2011 р., Запоріжжя). – Запоріжжя, 2011. – С. 173–175.

15. **Koval N.** Process of lipid peroxidation and activities of antioxidant system enzymes in cells liver, brain and lung of white rats in conditions of aflatoxin B1 injection / **N. Koval**, H. Antonyak // VIII Konferencja Młodych Badaczy p.t. „Fizjologia i biochemia w żywieniu zwierząt” (19–20 września 2011 r., Warszawa). – Warszawa, 2011. – S. 13–16.

16. **Koval N.** Process of lipid peroxidation and activity of antioxidant system in the cells of white rats under aflatoxin B1 injection / **N. Koval**, H. Antonyak // Materiały I Międzynarodowej i VII Ogólnopolskiej Młodzieżowej Konferencji Naukowej nt. «Nauki o człowieku w środowisku na początku XXI w.» (23 maja 2011 r., Rzeszow). – Rzeszow, 2011. – S. 47–49.

17. **Коваль Н. К.** Вплив афлатоксину В1 на активність ферментів-антиоксидантів в гепатоцитах щурів / **Н. К. Коваль**, Г. Л. Антоняк // Матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених „Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва” (21 – 24 червня 2011 р., Яремче). – Київ–Яремче, 2011. – С. 203–204.

18. **Коваль Н. К.** Динаміка показників системи глутатіону в клітинах щурів за щодобового введення афлатоксину В1 / **Н. К. Коваль**, Г. Л. Антоняк // Вісник Степу: науковий збірник. – Кіровоград, 2012. – Част. 2. – С. 210–213.

19. **Коваль Н. К.** Мікотоксини грибів роду *Aspergillus* / Збірник наукових праць молодих учених Дрогобицького державного педагогічного

університету імені Івана Франка (Пам'яті Валерія Григоровича Скотного). – Дрогобич : Посвіт, 2012. – С. 448–456.

20. Кузів Н. Мікотоксикози – важлива проблема тваринництва / Н. Кузів, **Н. Коваль** // Acta Carpathica. – 2013 – № 1. – С. 79–84.

21. **Коваль Н. К.** Токсичні ефекти афлатоксинів / **Н. К. Коваль** / Матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції „Розвиток сучасної освіти і науки: результати, проблеми, перспективи”. – Дрогобич : Посвіт, 2013. – С. 23–26.

22. **Коваль Н. К.** Вплив гострого афлатоксикозу на процес пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи в клітинах білих щурів / **Н. К. Коваль** / Актуальні питання суспільно-природничих наук : міжвуз. зб. наук. праць молодих вчених Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка. – Дрогобич : Посвіт, 2013. – С. 60–66.

23. **Коваль Н. К.** Активність ферментів глутатіонової системи в клітинах білих щурів під впливом афлатоксину / **Н. К. Коваль**, М. Р. Досвідчинська, Г. Л. Антоняк // Acta Carpathica. – 2013. – № 7. – С. 233–238.

24. **Коваль Н. К.** Біологічні ефекти афлатоксинів в організмі тварин і людини / **Н. К. Коваль** // Матеріали II Міжнародного Форуму нафтовиків „Шляхи подолання екологічних проблем на досвіді міст Західної Європи та України від тривалого використання надр”. – Борислав, 2013. – С. 85–90.

25. Антоняк Г. Дія біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на окремі показники метаболізму щурів за умов інтоксикації афлатоксином В1 / Г. Антоняк, **Н. Гойванович** // Acta Carpathica. – 2014. – № 16. – С. 103–108.

26. **Гойванович Н.** Вплив препарату «Е-Селен» на вміст продуктів ПОЛ та стан антиоксидантної системи в клітинах щурів за експериментального афлатоксикозу / **Н. Гойванович**, Г. Антоняк // Acta Carpathica. – 2015. – № 23. – С. 127–132.

27. **Гойванович Н.** Гриби-продуценти та джерела надходження афлатоксинів в організм тварин / **Н. Гойванович**, М. Гункевич / Розвиток сучасної освіти і науки: результати, проблеми, перспективи: тези III Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених (26–27 березня 2015 р.). – Дрогобич : Посвіт, 2015. – С. 15–16.

28. **Гойванович Н. К.** Вміст афлатоксинів у харчових продуктах та їх вплив на здоров'я людини / **Н. К. Гойванович**, О. О. Волошанська / Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку: тези доповідей XIV міжнародної науково-практичної конференції. – Харків : ХНУ ім. В. Каразіна, 2016. – С. 279–281.

29. Антоняк Г. Л. Вплив афлатоксинів на здоров'я людини / Г. Л. Антоняк, **Н. К. Гойванович**, О. О. Волошанська. – Promoting healthy lifestyle: realities and prospects : monographic series. Volume 1; under the editorship of prof. N. V. Skotna – Drohobych : Publication Department at Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University, 2016. – P. 241–250.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження біохімічних механізмів впливу афлатоксинів – продуктів вторинного метаболізму грибів роду *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* та деякі інші) – на організм тварин і людини є важливою проблемою біологічних і ветеринарних наук [2, 23, 24, 55, 62, 180, 234]. Як відомо, афлатоксини належать до гепатотропних отрут, бо основним органом-мішенню є печінка [23, 24, 251, 252]. Головним у патогенезі афлатоксикозу є порушення синтезу нуклеїнових кислот та білків. Одночасно відбувається пригнічення активності ключових ензимів синтезу білка, що призводить до порушення клітинного метаболізму та некрозу гепатоцитів [2, 7, 211]. Наслідком такої дії є зниження синтезу жовчних кислот, яке супроводжується сповільненням всмоктування жирів та каротиноїдів. Також відомо, що афлатоксини та продукти їхнього метаболізму можуть нагромаджуватись у тканинах і органах, а через деякий час – спричинити розвиток у клітинах, головним чином гепатоцитах, канцерогенного процесу [79, 101, 199].

Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених вивченню впливу афлатоксинів на організм тварин та розвитку в них оксидативного стресу, дотепер немає цілісного уявлення про механізми впливу AFB₁ на внутрішньоклітинний метаболізм, зокрема метаболізм у головному мозку, серці та нирках. Важливо зрозуміти характер регуляції метаболізму за екстремальних умов при гострій інтоксикації AFB₁, формування антиоксидантного захисту організму, спрямованого на детоксикацію AFB₁ й активацію метаболітичних механізмів відновлення гомеостазу. Тому важливим є дослідження впливу афлатоксину B₁ на окремі ланки метаболічних процесів в органах, пов'язаних з процесами детоксикації, порушень роботи нервової, видільної та кровоносної систем. З метою з'ясування впливу AFB₁ на стан процесів пероксидного окиснення ліпідів та

антиоксидантної системи, а також деякі ланки енергетичного метаболізму в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця проводили дослідження на білих лабораторних щурах, у яких вивчали вплив афлатоксину В₁ за умов введення цього токсину парентеральним та внутрішньошлунковим способом.

Постійне утворення прооксидантів у клітинах живих організмів врівноважено їхньою дезактивацією за участю антиоксидантної системи, тому для підтримання гомеостазу необхідна безперервна регенерація антиоксидантів. Порушення функціональної активності цієї системи призводить до розвитку оксидативного стресу, і як наслідок, нагромадженню продуктів пероксидного окиснення ліпідів і розвитку оксидативних пошкоджень біологічних молекул, що супроводжується патологічними процесами [85, 143]. Наявні дані про те, що афлатоксини здатні перетинати гематоенцифалічний бар'єр [192, 243, 279], можуть метаболізуватися не лише в гепатоцитах, а й у клітинах нирок та деяких інших органів з утворенням реакційно активних форм кисню.

Згідно з результатами досліджень, за різних доз і способів введення (одноразова внутрішньочеревна ін'єкція (0,5 мг/кг) та внутрішньошлункове введення (0,025 мг/кг щодоби впродовж 14-ти діб)) в організм тварин афлатоксину В₁ відбувається інтенсивне утворення АФО, що супроводжується активацією процесів ПОЛ у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця. Установлено, що продукти ПОЛ (ТБК-активні продукти) інтенсивно накопичуються в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця. Загалом, одержані експериментальні дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які показали, що в гепатоцитах різних видів ссавців, птиці та риби активація процесів ПОЛ лежить в основі цитотоксичної дії афлатоксинів [106, 138, 174, 182].

У процесі еволюції в клітинах виробилися спеціалізовані системи ензимних антиоксидантів для захисту від активних форм Оксигену. Вони характеризуються високою специфічністю дії, скерованої проти певних форм

прооксидантів, специфічністю клітинної та органної локалізації [21, 29, 138, 184, 213, 215, 251].

Ензим супероксидисмутаза каталізує початкову стадію детоксикації вільних радикалів кисню і, таким чином, обриває ланцюг вільнорадикальних реакцій у тканинах. Аналізуючи динаміку активності цього ензиму в тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця піддослідних щурів встановлено, що за умов одноразової внутрішньочеревної ін'єкції AFB₁ дозою 0,5 мг/кг, активність знижується на 7-му і 14 доби після введення токсину ($p < 0,05-0,01$). За щодобового внутрішньошлункового надходження афлатоксину B₁ в організм щурів активність СОД також інгібується на всіх етапах експерименту. У тканинах печінки, нирок і головного мозку зміни активності цього ензиму були подібними, а саме: ензимна активність пригнічувалась під впливом AFB₁ майже на всіх стадіях досліджень.

Разом із тим, отримані результати свідчать, що в тканинах серця, на відміну від інших досліджуваних тканин, активність СОД у тварин, яким вводили афлатоксин B₁ парентеральним та внутрішньошлунковим способами, меншою мірою знижувалась упродовж експериментів. Натомість печінка і головний мозок є високометаболітними органами й деструктивні зміни під впливом афлатоксину є виразнішими.

Глутатіонова система має ключове значення у реалізації антирадикального та антипероксидного захисту клітин [67, 69, 184]. Узгоджена дія всіх її компонентів (відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза, глутатіон-редуктаза) сприяє збереженню балансу прооксиданти-антиоксиданти у клітинах. Система глутатіону бере як безпосередню участь у детоксикації афлатоксину шляхом кон'югації його метаболітів [149], так і опосередковану, захищаючи тканини від пошкоджувальної дії вільних радикалів [69, 85, 146]. В наших експериментах встановлено, що одноразове внутрішньочеревне введення афлатоксину B₁ дозою 0,5 мг/кг спричиняє зниження вмісту відновленого

глутатіону у тканинах печінки та головного мозку на 7-му добу експерименту, а на 14-ту добу встановлене зростання його вмісту порівняно з 7-мою добою. У тканинах нирок і серця за одноразового введення AFB₁ вміст GSH зменшується впродовж усього дослідного періоду.

За щодобового внутрішньошлункового введення афлатоксину B₁ в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця прослідковувалось дозозалежне зниження вмісту відновленого глутатіону впродовж 14-добового терміну досліджень, причому в печінці та нирках ця тенденція була найвиразнішою. Однією з причин зменшення вмісту GSH у тварин дослідних груп може бути кон'югація трипептиду з проміжним продуктом метаболізму афлатоксину – AFB₁-епоксидом [90].

Ензимами, які істотно впливають на вмість відновленого глутатіону в клітинах, є глутатіонредуктаза, яка бере участь у відновленні глутатіону із окисненої форми; глутатіонпероксидаза, яка використовує відновлений глутатіон як кофактор під час каталітичної активності; глутатіон-S-трансфераза, задіяна у процесах окиснення GSH під час функціонування цього трипептиду в клітинах [16, 85, 251, 273]. Дані, отримані в наших дослідженнях, свідчать про зниження активності глутатіонредуктази в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця піддослідних тварин за одноразової ін'єкції афлатоксину B₁. За щодобового внутрішньошлункового введення афлатоксину B₁, у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця активність ензиму знижувалась дозозалежно протягом усього періоду. Динаміка глутатіонредуктазної активності в досліджуваних тканинах щурів, яким вводили AFB₁, свідчить про виснаження резервів системи глутатіону.

Експериментально встановлено, що під час інтоксикації тварин афлатоксином B₁ динаміка активності ГПО в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця неоднакова, що може свідчити про різну чутливість метаболізму досліджуваних клітин до порушень, зумовлених впливом афлатоксину на організм тварин.

У процесі експериментальних досліджень встановлено, що за умов гострої інтоксикації афлатоксином B_1 активність ГПО в тканинах нирок і серця знижується на 7-му добу ($p < 0,05-0,001$), а на 14-ту добу встановлене зростання активності, порівняно з 7-мою добою. Глутатіонпероксидазна активність у досліджуваних тканинах знижувалась впродовж усього дослідного періоду ($p < 0,05-0,01$) і за щодобового введення AFB_1 , причому зі збільшенням тривалості надходження токсину в організм тварин рівень інгібування ГПО в тканинах посилюється.

Потрібно зазначити, що за різних способів введення тваринам AFB_1 найістотніші зміни активності ГПО відбувалися в тканинах печінки, нирок і головного мозку. Такі результати узгоджується з наявними в наукових джерелах даними щодо значної токсичності афлатоксинів [146, 211, 275].

За умов пригнічувального впливу афлатоксину B_1 на активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази, привертає увагу динаміка активності глутатіон-S-трансферази. Цей ензим відіграє важливе значення в детоксикації AFB_1 та проміжних сполук, які утворюються у процесах метаболізму цього токсину. Аналіз наукових джерел свідчить про вплив AFB_1 на активність Г-S-T в печінці щурів і мишей [37, 167, 214]. У наших дослідженнях встановлено зміни активності цього ензиму в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця щурів, яким вводили афлатоксин B_1 .

За умов інтоксикації щурів афлатоксином B_1 динаміка глутатіон-S-трансферазної активності в досліджуваних тканинах подібна, а саме: активність ензиму значно знижується на 7-му добу експерименту, а на 14-ту добу зростає порівняно з 7-мою добою. У тканинах печінки активність Г-S-T після пригнічення на 7-му добу експерименту ($p < 0,001$), зростає на наступній стадії досліджень ($p < 0,01$), вірогідно, внаслідок адапційного механізму активації синтезу ензимного білка. У тканинах нирок ензимна активність

зростає впродовж 14-ти діб ($p < 0,05$), і такий ефект, ймовірно, відіграє компенсаторну роль, сприяючи зменшенню токсичних ефектів афлатоксину.

У тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця за умов щодобового введення тваринам AFB_1 глутатіон-S-трансферазна активність зменшується впродовж експерименту ($p < 0,05-0,001$).

Глутатіон-S-трансфераза протидіє руйнуванню клітинних структур, а також бере участь у початкових стадіях процесів, які забезпечують виведення афлатоксину B_1 з клітин [90, 127, 167, 284]. Як відомо, у процесі метаболічних перетворень у гепатоцитах афлатоксин B_1 перетворюється на канцерогенний метаболіт з високою реакційною здатністю – 2,3-епоксид афлатоксину B_1 . Він може підлягати детоксикації шляхом кон'югації з SH-глутатіоном, утворюючи AFB_1 -8,9-епоксид-глутатіон-кон'югат, що транспортується через клітинну мембрану у міжклітинний простір за допомогою АТФ-залежних механізмів, які на сьогодні залишаються не вивченими [39, 66, 127]. Цю реакцію каталізує глутатіонтрансфераза. У низці наукових праць є дані про те, що цей процес здійснюється за участю клітинних білків: білка MRP або ж неідентифікованого на даний час Р-глікопротеїну [89, 90, 238]. При цьому глутатіон є єдиною низькомолекулярною сполукою, з якою епоксид активно реагує з утворенням 2,3-дигідро-2-(S-глутатіопіл)-3-гідрокси-афлатоксин B_1 [36, 90].

За умов інтоксикації тварин афлатоксином B_1 глутатіон-S-трансфераза відіграє важливу роль у зменшенні токсичних ефектів токсину, і ці результати узгоджуються із даними експериментальних досліджень інших авторів [39, 66, 127, 90]. Зниження активності Г-S-Т в тканинах печінки, головного мозку та серця в разі надходження афлатоксину B_1 в організм тварин, вірогідно, відбувається внаслідок інактивації молекул ензиму шляхом його зв'язування із продуктами біотрансформації афлатоксину. У тканинах нирок спостерігається зворотня динаміка – збільшення активності ензиму. Вочевидь, це відіграє компенсаторну роль і забезпечує

функціонування тканин за умов пригнічення інших ензимів антиоксидантної системи, сприяє захисту від дії активних форм кисню і продуктів ліпопероксидації [110, 127, 140].

Зниження резервів глутатіонової біохімічної системи є наслідком детоксикації афлатоксину антиоксидантною системою організму. Загалом, отримані дані свідчать про значну гепато-, нейро- і нефротоксичність афлатоксину B_1 і, відповідно, про порушення метаболізму в печінці, функціонуванні видільної та нервової систем у процесі інтоксикації афлатоксином B_1 . Отримані в наших дослідженнях результати вказують на те, що в тканинах печінки, нирок і головного мозку активація оксидативного стресу є важливою ланкою токсичної дії афлатоксину B_1 . Розвиток оксидативного стресу відіграє важливу роль і в порушеннях метаболізму та функцій печінки, нирок і головного мозку під час експериментальної інтоксикації тварин афлатоксином B_1 .

Важливе значення має функціонування в клітинах організму пентозофосфатного шляху, який бере участь у постачанні молекул NADPH, необхідних для функціонування глутатіонредуктази [61]. Тому активність ензимів цієї ділянки енергетичного обміну забезпечує підтримання антиоксидантного статусу клітин.

Результати наших досліджень свідчать, що активність лактатдегідрогенази, яка каталізує кінцеву стадію гліколізу, в досліджуваних тканинах зменшувалась і за умов одноразового, і за щодобового введення AFB_1 . Така динаміка чітко виявляється в тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця за одноразової дози AFB_1 ($p < 0,01-0,001$). Привертає увагу динаміка активності ЛДГ у тканинах серця, в якому спостерігали виразніше зменшення цього показника за щодобового введення – на 60,3 % ($p < 0,01$), ніж за одноразового – на 51,2 % ($p < 0,01$).

Проведені нами дослідження показали, що активність NADPH-генерувального ензиму – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, який каталізує початкову стадію пентозофосфатного шляху, в тканинах тварин дослідних груп була нижча, порівняно з тваринами контрольної групи.

Аналіз результатів досліджень показує, що за умов одноразового і щодобового введення тваринам AFB₁ відбувається різке зниження активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в тканинах печінки, нирок та головного мозку. Однак, як свідчать отримані результати, в тканинах серця глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність пригнічується меншою мірою – на 19,7–24,4 % ($p < 0,05$) за різних умов експерименту.

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа є ключовим ензимом, що визначає рівень перетворення моносахаридів у пентозофосфатному шунті [61], її інгібування під впливом афлатоксину B₁ зумовлює пригнічення відновлення нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату, який необхідний для функціонування глутатіонредуктази. Відповідно, зниження активності глутатіонредуктази та рівня відновленого глутатіону у досліджуваних тканинах призводить до зниження глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності. Цей взаємозв'язок, доведений експериментальними даними, може бути однією з ланок у механізмах пригнічення глутатіонредуктази і, відповідно, у зменшенні вмісту відновленого глутатіону в досліджуваних тканинах тварин, інтоксикованих афлатоксином B₁.

Порушення функціонування органів та систем організму за дії афлатоксину B₁ призводять до змін показників метаболізму у тканинах піддослідних тварин. Установлене в наших експериментах зниження активності аміотрансфераз (АлАТ, АсАТ) та зміна коефіцієнту Де Рітиса (АсАТ/АлАТ) за умов щодобового введення афлатоксину впродовж усіх етапів досліджень дозволяє стверджувати про пошкодження досліджуваних тканин при надходженні AFB₁ в організм. Особливо виразною є динаміка зниження активності АлАТ у тканинах печінки (у 1,85 разу ($p < 0,01$)) і нирок

(у 2,09 разу ($p < 0,01$) щурів, яким вводили AFB_1 протягом 14 діб. Активність АсАТ знижується у 1,76-2,33 разу ($p < 0,05-0,001$) у всіх досліджуваних тканинах щурів інтоксикованих афлатоксином B_1 . За змінами коефіцієнта Де Рітіса визначають глибину ураження тканин, у разі пошкодження гепатоцитів цей показник знижується, а при цитолізі клітин міокарду – зростає [29]. Результати досліджень свідчать, що щодобове введення AFB_1 знижує коефіцієнт Де Рітіса у тканинах печінки і нирок щурів. Це може бути свідченням пошкодження плазматичних мембран або руйнування клітин.

Окрім того, за введення AFB_1 відбувається зростання активності трансаміназ у плазмі крові щурів на 14-ту добу: АлАТ – у 4,3 разу ($p < 0,001$), АсАТ – у 2,59 разу ($p < 0,05$). Ці результати свідчать про порушення функцій досліджуваних органів, насамперед, про пошкодження цілісності плазматичних мембран під впливом афлатоксину B_1 .

Встановлені в наших дослідженнях та експериментальних роботах інших авторів негативні ефекти впливу афлатоксину B_1 на здоров'я тварин [3, 4, 18, 20, 46, 55, 77, 164, 171] стимулюють пошук ефективних способів запобігання і профілактики афлатоксикозів. Використання антиоксидантів, пробіотичних препаратів та сорбентів може бути одним із методів зниження токсичної дії AFB_1 , сприятиме попередженню формування та розвитку афлатоксикозів в організмі тварин [1, 8, 13, 24, 32, 162, 224, 252].

Сьогодні триває пошук протекторів для запобігання та корекції метаболічних порушень і розвитку розвитку оксидативного стресу в організмі тварин, які зазнають впливу AFB_1 та інших афлатоксинів. В умовах недостатньої активності ендогенної антиоксидантної системи ефективним способом захисту клітин від пошкоджувальної дії вільнорадикального окиснення є введення екзогенних антиоксидантів, які попереджають негативні зміни в організмі. Це зумовлює необхідність пошуку препаратів з антиоксидантними властивостями, які послаблюють токсичну дію продуктів ПОЛ. Використання синтетичних антиоксидантів обмежується побічними

ефектами та низьким коефіцієнтом засвоєння. Це зумовлює пошук природних антиоксидантів, які послаблюють дію вільних радикалів. У науковій літературі наявні дані щодо використання дріжджів (головним чином, *Saccharomyces cerevisiae*, а також *Phaffia rhodozyma*) з метою коригування метаболічних порушень за умов експериментальних мікотоксикозів у тварин [96, 111, 114, 238, 264]. Передумовою для використання дріжджів є адсорбція їхніми зовнішньоклітинними компонентами деяких мікотоксинів.

Тому серед можливих протекторів, що сприятимуть подоланню шкідливих ефектів афлатоксину В₁, привертає увагу використання біомаси культивованих дріжджів *Phaffia rhodozyma*, які не лише здатні адсорбувати своїми клітинними стінками і детоксикувати мікотоксини, а й синтезують каротиноїд астаксантин, який має важливе значення для підвищення антиоксидантного статусу організму [56, 70, 158, 188, 197, 231, 253, 258, 264, 265].

Аналіз концентрації продуктів ПОЛ за умов щодобового введення тваринам *P. rhodozyma* свідчить, що цей чинник сприяє зменшенню стимулювального впливу АFB₁ на процеси пероксидного окиснення ліпідів в тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця. Необхідно відзначити, що введення біомаси *P. rhodozyma* позитивно впливає на зменшення продуктів ПОЛ у тканинах печінки, проте не нормалізує повністю цей показник. Ймовірно це пов'язано з особливостями метаболізму АFB₁ у гепатоцитах. Зниження вмісту кінцевих продуктів ПОЛ у досліджуваних органах щурів може свідчити про те, що наявні в дріжджах каротиноїди пригнічують вільнорадикальне окислення ліпідів.

Зменшення інтенсивності процесів ПОЛ в інтоксикованих афлатоксином щурів може бути пов'язане із впливом біомаси дріжджів *P. rhodozyma* на активність ензимів антиоксидантної системи в тканинах. Згідно з результатами дослідження, щоденне введення біомаси дріжджів

P. rhodozyma сприяє нормалізації супероксиддисмутазної активності на 14-ту добу у всіх досліджуваних тканинах ($p < 0,01$).

Результати досліджень свідчать, що в тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця тварин, яким вводили афлатоксин B_1 , застосування дріжджів *P. rhodozyma* сприяє нормалізації показників функціонального стану системи глутатіону внаслідок збільшення вмісту відновленого глутатіону ($p < 0,05-0,001$), підвищення активності глутатіонредуктази ($p < 0,01-0,001$) і глутатіонпероксидази ($p < 0,01-0,001$). У тканинах нирок і серця, за умов введення інтоксикованим AFB_1 щурам, *P. rhodozyma*, нормалізується активність Γ -S-T. Однак, у тканинах печінки і головного мозку відмічене лише збільшення активності цього ензиму ($p < 0,05-0,001$).

Ефективність дії біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* характеризується такими особливостями: клітинна стінка *P. rhodozyma* діє як адсорбент; як клітинний метаболіт продукується антиоксидант астаксантин і його дія виявляється у місці всмоктування афлатоксинів – кишково-шлунковому тракті. З метою отримання стійкого позитивного ефекту у застосуванні *P. rhodozyma*, важливим є щодобове введення біомаси дріжджів *P. rhodozyma*, адже при такому застосуванні відбувається зменшення ризику розвитку метаболічних порушень у тварин, інтоксикованих афлатоксином B_1 та профілактика розвитку афлатоксикозу.

Ефективність ензимної ланки антиоксидантної системи має вирішальне значення у підтриманні прооксидантно-антиоксидантного балансу в організмі. Вітаміни А, Е, а також мікроелемент селен є ефективними природними антиоксидантами, які здатні підтримувати рівновагу окисно-відновних реакцій в організмі тварин [40, 104, 126, 146].

Одним із етапів нашої роботи було дослідження впливу одноразової дози вітаміну Е на тлі інтоксикації афлатоксином B_1 на процеси ПОЛ і стан системи прооксиданти-антиоксиданти в тканинах печінки, головного мозку, нирок і серця тварин.

Результати досліджень свідчать, що за одноразового введення вітаміну Е при щодобовій інтоксикації AFB₁ відбувається зниження концентрація продуктів ПОЛ у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця тварин порівняно з тваринами дослідних груп, яким вводили AFB₁. Введення вітаміну Е щурам, інтоксикованим AFB₁, перешкоджає накопиченню продуктів ліпопероксидації на 7-му добу експерименту у всіх досліджуваних тканинах, проте на 14-ту добу протекторний ефект вітаміну Е втрачається. Найвиразніше ця тенденція прослідковується у тканинах печінки і нирок ($p < 0,05-0,01$).

Встановлено, одноразове введення вітаміну Е, на тлі інтоксикації AFB₁, нормалізує глутатіонредуктазну активність у тканинах нирок і міокарду, глутатіонтрансферазну активність у тканинах серця на 7-му добу експерименту. У тканинах печінки і головного мозку активність СОД, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази підвищується на 7-му добу, проте, при щодобовому введенні AFB₁, активність ензимів значно знижується на 14-ту добу у всіх досліджуваних тканинах щурів порівняно з контролем ($p < 0,05-0,001$).

Аналіз результатів досліджень показав, що введення вітаміну Е щурам інтоксикованим афлатоксином В₁, сприяє покращенню показників функціонального стану системи глутатіону внаслідок збільшення вмісту відновленого глутатіону, збільшення активності глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферазної у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця тварин порівняно з показниками у тварин, яким вводили AFB₁.

Препарат «Е-Селен» є одним із можливих протекторів з коригувальним ефектом, який поєднує антиоксидантну дію вітаміну Е та мікроелемента Селену. Препарат «Е-Селен» (ЗАТ «Ніта-Фарм») – це водорозчинний комплекс вітаміну Е та Селену. Вітамін Е – біологічний антиоксидант, який захищає клітини від пошкодження вільними радикалами, бере участь в

жировому обміні, формуванні клітинних мембран, укріплює стінки кровоносних судин, а також забезпечує клітинне дихання, підвищує загальну опірність організму, стимулює репродуктивну функцію тварин [40, 41]. Селен – мікроелемент антиоксидантного захисту організму, є коферментом ензиму глутатіонпероксидази, яка захищає мембранні структури, мітохондрії від перекисного окислення ліпідів, має сильну імуностимулювальну дію, входить до складу ензимів селенопротеїнів, гормонів, значною мірою сприяє засвоєнню вітаміну Е [26]. Комбінована дія вітаміну Е та селену посилює антиоксидантні властивості препарату, впливає на обмін білків, жирів, вуглеводів [17].

Проведено дослідження впливу препарату «Е-Селен» на показники, які дають можливість охарактеризувати прооксидантно-антиоксидантний стан тканин печінки, головного мозку, нирок і серця тварин за умов щодобового надходження афлатоксину В₁.

У результаті дослідження коригувальної дії препарату «Е-Селен» на концентрацію продуктів ПОЛ за умов щодобового введення тваринам АFB₁ виявлено, що цей комплекс сприяє зменшенню стимулювального впливу АFB₁ на процеси ліпопероксидації в досліджуваних тканинах.

Важливе значення в механізмах такого ефекту має коригувальний вплив препарату «Е-Селен» на активність ензимів антиоксидантної системи, перш за все, глутатіонпероксидази. Введення «Е-Селену» позитивно впливає й на інші ензими антиоксидантної системи. Зокрема, за умов одноразового введення «Е-Селену» на тлі інтоксикації АFB₁ в досліджуваних тканинах щурів на 7-му добу зростає супероксиддисмутазна активність ($p < 0,05-0,01$) порівняно з групою щурів, яким вводили тільки АFB₁. Проте за умов щодобового введення АFB₁ активність СОД значно знижується на 14-ту добу у всіх досліджуваних тканинах щурів ($p < 0,05-0,001$).

Аналіз результатів досліджень показує, що при одноразовому введенні щурам препарату «Е-Селен» на тлі АFB₁-інтоксикації глутатіонредуктазна

активність знижується на 7-му і 14-ту доби введення. Проте, в порівнянні з щурами інтоксикованими AFB₁ протягом 14-ти діб, зменшення активності ензиму не таке виражене.

Результати досліджень свідчать, що у щурів, яким вводили AFB₁ впродовж 7-ми і 14-ти діб, застосування «Е-Селену» сприяє нормалізації активності ГПО в тканині серця ($p < 0,05$). У тканинах печінки, нирок та головного мозку, за додавання препарату «Е-Селен», активність ензиму знижувалась значно менше, в порівнянні з дослідною групою під дією AFB₁. Це зумовлено тим, що глутатіонпероксидаза – селен-залежний фермент [Кулинский та ін., 1993].

Динаміка зменшення активності Г-S-T подібна до глутатіонредуктазної активності в досліджуваних тканинах за умов одноразового введення препарату «Е-Селен».

Аналіз результатів досліджень вказує на позитивний вплив одноразового введення препарату «Е-Селен» на вміст відновленого глутатіону у тканинах щурів, які зазнавали впливу афлатоксину. Зокрема, вміст GSH в тканинах печінки на 14-ту добу при введенні AFB₁ зменшився на 37,8 % ($p < 0,001$), а при додаванні препарату «Е-Селен» – на 30,5 % ($p < 0,01$).

Таким чином, згідно з результатами досліджень, у тканинах печінки, головного мозку, нирок та серця тварин, яким вводили афлатоксин B₁, застосування препарату «Е-Селен» сприяє покращенню показників функціонального стану системи глутатіону внаслідок збільшення вмісту відновленого глутатіону, активності глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази порівняно зі значеннями, притаманними тваринам, які зазнавали впливу AFB₁.

Після введення тваринам антиоксидантного препарату «Е-Селен» для зменшення токсичної дії афлатоксину B₁, тканини отримують опосередкований захист, завдяки підвищенню вмісту GSH, але не

інгібуванню метаболізму AFB₁. Тому після одноразової ін'єкції препарату «Е-Селен», за подальшої щодобової інтоксикації AFB₁, підвищення антиоксидантної активності у тканинах має нетривалий ефект.

Отже, одноразове введення антиоксидантів (вітамін Е, препарат «Е-Селен») підвищує активність ензимів антиоксидантної системи. Недоліком цих препаратів є їхня недовготривала дія за щодобової інтоксикації AFB₁, оскільки на 14-ту добу не відбувається нормалізації активності ензимів антиоксидантної системи.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано комплекс даних про біохімічні механізми порушень окремих ланок метаболізму (активація процесів ПОЛ, зниження активності антиоксидантних і енергетичних ензимів, зростання активності трансаміназ у плазмі крові) у тканинах білих щурів за різних доз та способів введення афлатоксину В₁ (AFB₁). Показано можливість коригування метаболічних порушень введенням біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* та антиоксидантів (вітамін Е і препарат «Е-Селен»).

1. Афлатоксин В₁ є активатором процесів ПОЛ у тканинах печінки, нирок, головного мозку та серця. Розвиток AFB₁-інтоксикації призводить до збільшення концентрації продуктів ліпопероксидації. Експериментально доведено, що концентрація ТБК-активних продуктів зростає на 14-ту добу в тканинах печінки у 2,18 разу ($p < 0,01$), головного мозку – в 3,28 разу ($p < 0,001$), серця – в 2,45 разу, нирок – у 1,44 разу ($p < 0,05$) за одноразового введення афлатоксину В₁. Поступове збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у досліджуваних тканинах за щодобового введення AFB₁ пов'язане з тривалістю надходження токсину в організм тварин, на 14-ту добу концентрація продуктів ПОЛ у тканинах збільшується в 1,72–1,93 разу ($p < 0,01$).

2. Встановлено особливості змін у компонентах антиоксидантної системи залежно від тканин і способів інтоксикації тварин. У тканинах печінки та головного мозку на тлі гострої інтоксикації одноразовим введенням AFB₁ активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази знижується на 14-ту добу ($p < 0,05$ – $0,001$); вміст відновленого глутатіону й активність глутатіонтрансферази знижується на 7-му добу ($p < 0,01$ – $0,001$) й підвищується на 14-ту добу ($p < 0,05$ – $0,01$). Щодобове введення AFB₁ інгібує активність усіх ензимів-антиоксидантів у тканинах печінки і головного мозку, починаючи з 7-мої доби.

3. Доведено, що нирки відіграють важливу роль у детоксикації AFB₁ за умов одноразового введення внаслідок активації глутатіонтрансферази в 1,22 разу впродовж 14 діб після надходження токсину ($p < 0,05$). Однак активність ензимів антиоксидантної системи у тканинах цього органа знижувалась: супероксиддисмутази на 43,7 % ($p < 0,01$); глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази і вміст відновленого глутатіону – впродовж 14 діб після введення токсину ($p < 0,05$ – $0,001$). За щодобового його введення відбувається дозозалежне зниження активності всіх ензимів антиоксидантної системи, із найбільш вираженими змінами на 7-му добу ($p < 0,05$ – $0,001$).

4. За умов одноразового введення AFB₁ у серці відбувається зниження активності супероксиддисмутази, глутатіонредуктази і вмісту відновленого глутатіону на 14 добу ($p < 0,05$ – $0,01$), глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази – на 7-му добу. Водночас на 14-ту добу активність глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази зростає порівняно з рівнем встановленим на 7-му добу експерименту, проте вона не досягає контрольного рівня. За щодобового введення AFB₁ відбувається зниження активності ензимів антиоксидантної системи впродовж 14 діб експерименту ($p < 0,05$ – $0,01$).

5. Введення AFB₁ призводить до змін активності ензимів катаболізму моносахаридів. За одноразової інтоксикації лактатдегідрогеназна активність знижувалася на 14-добу в усіх досліджуваних тканинах на 51,2–60,2 % ($p < 0,01$ – $0,001$), а за щодобового – найвиразніше у тканинах головного мозку і серця на 50,2–60,3 % ($p < 0,01$). Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність за гострої одноразової інтоксикації пригнічувалась на 34,4–59,0 % ($p < 0,05$ – $0,01$) у тканинах печінки, нирок і головного мозку, за щодобового введення токсину в досліджуваних тканинах дозозалежно зменшувалась на 37,2–51,2 % ($p < 0,05$ – $0,01$). У тканині серця активність ензиму зменшувалась як за одноразового, так і за щодобового введення на 19,7–24,4 % ($p < 0,05$).

6. Під впливом афлатоксину B_1 відмічено зниження активності амінотрансфераз і зміну коефіцієнта Де Рітиса. Зниження активності АлАТ найбільш виражене у тканинах печінки та нирок щурів порівняно з іншими органами, показник знижувався на 14-ту добу в 2,1 і 2,26 разу ($p < 0,01$) відповідно. Активність АсАТ знижувалась у всіх досліджуваних тканинах у 1,76–2,33 разу ($p < 0,05$ – $0,001$). Встановлені зміни активності трансаміназ у плазмі крові білих щурів, зокрема, збільшення АлАТ у 4,3 разу ($p < 0,001$), АсАТ – у 2,59 разу ($p < 0,05$). Коефіцієнт Де Рітиса зменшується у тканинах печінки і нирок як свідчення порушення проникності клітинних мембран на тлі AFB₁-інтоксикації.

7. Щодобове введення біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на тлі гострої AFB₁-інтоксикації зумовлює зменшення концентрації продуктів ПОЛ в тканинах печінки білих щурів і нормалізацію в тканинах нирок, головного мозку та серця. Після застосування біомаси *P. rhodozyma* на 14-ту добу дослідження відбувається нормалізація активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і вмісту відновленого глутатіону в тканинах нирок, головного мозку та серця щурів, інтоксикованих афлатоксином B_1 . Активність глутатіонредуктази і глутатіонтрансферази нормалізується впродовж дослідного періоду у тканинах нирок і серця, у тканинах печінки і головного мозку активність глутатіонредуктази знизилася на 17,7 і 10,8 %, глутатіон-трансферази – на 17,5 і 7,6 % порівняно з контролем.

8. Одноразове введення щурам вітаміну Е на тлі AFB₁-інтоксикації зумовлювало зниження інтенсивності процесів ПОЛ, підвищувало активність ензимів антиоксидантної системи на 7-му добу експерименту у всіх досліджуваних тканинах. На 14-ту добу експерименту активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіон-трансферази і вміст відновленого глутатіону зменшувалась.

9. Одноразове введення препарату «Е-Селен» білим щурам на тлі AFB₁-інтоксикації, сприяло зниженню процесів ліпопероксидації, підвищувало активність ензимів антиоксидантної системи на 7-му добу експерименту в усіх досліджуваних тканинах. На 14-ту добу експерименту активність супероксиддисмутази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази і вміст відновленого глутатіону зменшувалися, активність глутатіонпероксидази – нормалізувалась.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. З метою корекції порушень метаболізму у тварин за інтоксикації афлатоксином В₁ рекомендовано щодобове згодовування дріжджів *Phaffia rhodozyma* дозою 1,5 г/кг маси тіла.

2. Для усунення метаболічних порушень, спричинених афлатоксином В₁, ефективним є введення антиоксидантів: вітамін Е (дозою 100 мг/кг маси тіла) і комплекс вітаміну Е з Селеном (дозою 2,5 мг вітаміну Е та 2,5 мкг натрію селеніту на 1 кг маси тіла).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антоняк Г. Дія біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на окремі показники метаболізму щурів за умов інтоксикації афлатоксином В1 / Г. Антоняк, Н. Гойванович // Acta Carpathica. – 2014. – № 16. – С. 103–108.
2. Антоняк Г. Л. Афлатоксини: біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, О. М. Стефанишин, Н. К. Коваль, Р. О. Федяков // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1 – 2. – С. 16–26.
3. Антоняк Г. Л. Вплив афлатоксину В1 на процеси пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантну систему еритроцитів і гепатоцитів щурів / Г. Л. Антоняк, Н. К. Коваль, Р. О. Федяков // Вісник Одеського національного університету. Серія Біологія. – 2011. – Т.16, Вип. 6. – С. 5–11.
4. Антоняк Г. Л. Вплив афлатоксину В1 на стан антиоксидантної системи в клітинах органів та еритроцитах крові білих щурів / Г. Л. Антоняк, Н. К. Коваль, М. Р. Досвідчинська, Х. М. Головчак // Науковий часопис Національного педагогічного університету імені М.П.Драгоманова. – Серія № 20. Біологія. – 2013. – Випуск 5. – С. 112–117.
5. Антоняк Г.Л. Вплив мікотоксинів на здоров'я тварин / Г.Л. Антоняк, Р.О. Федяков, Н.К. Коваль, О.М. Стефанишин // Науковий вісник ветеринарної медицини. – 2010. – Вип. 5(78). – С. 10–13.
6. Брезвін О.М. Контроль мікотоксинів та їх знешкодження : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.04 / О.М. Брезвін. – Л. : Львів. нац. ун-т вет. медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, 2012. – 36 с.
7. Волков М. Системний мікотоксикологічний контроль кормів – гарантія профілактик мікотоксикозів тварин та птиці / Волков М. //

- Вет. медицина України. – 2005. – № 3 – С. 20.
8. Гойванович Н. К. Вплив біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* на стан антиоксидантної системи в тканинах білих щурів за щодобового введення афлатоксину В1 / Н. К. Гойванович, Г. Л. Антоняк // Вісник проблем біології та медицини. – 2017. – Вип. 2(136). – С. 52–57.
 9. Гойванович Н.К. Вміст афлатоксинів у харчових продуктах та їх вплив на здоров'я людини / Н.К. Гойванович, О.О. Волошанська // Тези доповідей XIV міжнародної науково-практичної конференції «Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку». – Харків: ХНУ ім. В. Каразіна, 2016. – С. 279–281.
 10. Головчак Н. Структура і вплив мікотоксинів на живі організми / Н. Головчак // Вісник Львівського університету. – 2007. – Вип. 43. – С. 33–47.
 11. Горячковский А. М. Клиническая биохимия / А. М. Горячковский – Одесса: Астропринт, 1998. – 608 с.
 12. Дубинина Е. Е. Активность и изоферментный спектр супероксид-дисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е. Е. Дубинина, Л. А. Сальникова, Л. Ф. Ефимова // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30–33.
 13. Духницький В.Б. Ветеринарна мікотоксикологія: навчальний посібник / В. Б. Духницький, Г. О. Хмельницький, Г. В. Бойко, В. Д. Іщенко. – Київ, 2010. – 203с.
 14. Зенков Н. К. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Панкин, Е. Б. Меньщикова. – М.: МАИК. Наука / Интерпериодика, 2001. – 343 с.
 15. Казимирко В.К. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В. К. Казимирко, В. И. Мальцев, В. Ю. Бутылин, Н. И. Горобец. – К.: Морион, 2004. – 160 с.

16. Камінська М. В. Порівняльна дія селенізованої біомаси дріжджів *Phaffia rhodozyma* та селеніту натрію на окремі показники метаболізму щурів за умов оксидативного стресу / М. В. Камінська, Н. І. Борецька, Г. І. Нечай, С. В. Гураль, Г. В. Колісник // Біологія тварин. – 2010. – Том 12. – №2. – С. 440–444.
17. Кения М. В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.П. Гуськов // Успехи соврем. биологии. – 1993. – №4. – С. 456–470.
18. Коваль Н. Активність ферментів глутатіонової системи в клітинах білих щурів під впливом афлатоксину / Н. Коваль, М. Досвідчинська, Г. Антоняк // Acta Carpathica. – 2013. – № 7. – С. 233–238.
19. Коваль Н. К. Афлатоксини: хімічна будова та метаболізм / Н.К. Коваль, Г.Л. Антоняк // Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених „Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук” (20 травня 2011 р., Запоріжжя). – С.173–175.
20. Коваль Н. К. Вплив гострого афлатоксикозу на процес пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи в клітинах білих щурів / Коваль Н. К. // Міжвузівський збірник наукових праць молодих вчених Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка «Актуальні питання суспільно природничих наук». – Дрогобич: Посвіт, 2013. – С.60–66.
21. Колісник М. І. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин / М. Колісник, Г. Колісник, Є. Нідзюлка, В. Влізло // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1–2. – С. 59–70.
22. Коляденко В. Г. Мікотоксини плісневих грибів: гепатотоксична, нефротоксична, канцерогенна, мутагенна та ембріотоксична дія / В. Г. Коляденко, В. І. Степаненко, В. А. Кравченко // Мікологія. – 2002. – № 1. – С. 47–50.

23. Котик А. М. Ефективність препарату «Мікосорб» (Alltech) в умовах періодичної контамінації кормів мікотоксинами / А. М. Котик, В. О. Труфанова, О. Л. Леднева, О. М. Андрієнко // Ефективне тваринництво і птахівництво. – 2004. – № 1. – С. 46–49.
24. Котик А. Н. Мікотоксикози птиці: етіологія, діагностика, профілактичні засоби і методи [Текст] / А. М. Котик, В. О. Труфанова. – Харків : НТМТ, 2005. – 124 с.
25. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 110, № 1(4). – С.20–33.
26. Кулинский В.И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы / Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 1. – С. 107–121.
27. Паламарчук Л. Безопасность корма – залог здоров'я (Код доступу <http://zoobusiness.kiev.ua/veterinarymedicine/40/>)
28. Погребняк Л.І. Профілактика мікотоксикозів сільськогосподарських тварин / Погребняк Л.І., Корзуненко О.Ф., Ображей А.Ф., Грачов С.О. // Вісник аграрної науки. – 2000. – № 10. – С. 25–27.
29. Подколзин А. А. Система антиоксидантной защиты организма / А. А. Подколзин, А. Г. Мегреладзе, В. И. Донцов и др. // Профилактика старения. – 2000. – Вып. 3. – С. 9–23.
30. Потатуркина-Нестерова Н.И. Выявление афлатоксина В1 у клинических изолятов микромицетов *Aspergillus flavus* / Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестерова А.В., Нестеров А.С., Немова И.С., Юхлимова М.Н., Зеленцова Ю.В. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4; URL: www.science-education.ru/104-6485
31. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований / М. И. Прохорова // Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.

32. Пузир А.П. Нейтралізація афлатоксину В1 озонуванням і адсорбцією наноалмазами / А.П. Пузир, А.Є. Буров, В.С. Бондар, Ю.М. Трусів // Російські нанотехнології. – 2009. – Том 4, № 11–12. – С. 76–88.
33. Руда М. Є. Вивчення детоксикаційної дії сорбентних препаратів *in vitro* відносно культури грибів-продуцентів мікотоксинів / М. Є. Руда, О. М. Васянович // Ветеринарна біотехнологія. – 2012. – № 21. – С. 115–121.
34. Сімонова М. Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія / Сімонова М. // Біологічні студії. – 2010 – Том 4. – №2. – С. 159–170.
35. Смирнов В. В. Микотоксини: фундаментальные и прикладные аспекты / В. В. Смирнов, А. М. Зайченко, И. Г. Рубежнюк // Совр. проблемы токсикологии. – 2000. – №1 (Код доступу http://medved.kiev.ua/arhiv_mg/1_2000.htm.)
36. Тутельян В.А. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты) / В. А. Тутельян, Л.В. Кравченко. – М.: Медицина, 1985. – 320 с.
37. Adedara I. Aflatoxin B1 and ethanol co-exposure induces hepatic oxidative damage in mice / I. A. Adedara, S. E. Owumi, A. O. Uwaifo, E. O. Farombi // Toxicol. Ind. Health. – 2010. – Vol.26. – N10. – P. 717–724.
38. Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation / O. Gursoy, H. Yuzugullu, M. Yuzugullu, [et al.] // Liver Int. 2011. – Vol. 31. – N4. – P. 561–571.
39. Allameh A. Kinetic studies of aflatoxin B1-glutathione conjugate formation in liver and kidneys of adult and weanling rats / A. Allameh, M. Farahani, A. Zarghi // Mech Ageing Dev. – 2000. – Vol. 115(1-2). – P. 73–83.
40. Alpsoy L. Key roles of vitamins A, C, and E in aflatoxin B1-induced oxidative stress / L. Alpsoy, ME. Yalvac // Vitam Horm. – 2011. – Vol. 86. – P. 287–305.

- 41.Alpsoy L. The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes / L. Alpsoy, A. Yildirim, G. Agar // *Toxicol. Ind. Health.* – 2009. – Vol. 25. – N2. – P. 121–127.
- 42.Aly S. Fate of aflatoxin B1 in contaminated corn gluten during acid hydrolysis / S. E. Aly, A. S. Hathout // *J. Sci. Food. Agric.* 2011. – Vol. 91. – N3. – P. 421–427.
- 43.An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia / M. S. Lye, A. A. Ghazali, J. Mohan [et al.] // *Am. L. Trop. Med. Hyg.* – 1995. – 53. – P. 68–72.
- 44.An Y. Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-mediated autophagy and extracellular trap formation in macrophages /Y. An, X. Shi, X. Tang, Y. Wang [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – Vol.7 – P.53
- 45.Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B1-induced liver carcinogenesis in rats / M. Kumar, V. Verma, R. Nagpal [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2011. –Vol. 5. – P. 1–11.
- 46.Antonyak H. Effects of aflatoxin B1 on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in rat organs and erythrocytes / H. Antonyak, Cl.Olijnyk, N. Koval et.al. // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* – 2015. – Випуск 69. – С. 41–48.
- 47.Aravind K. L. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers / K. L. Aravind, V. S. Patil, G. Devegowda [et al.] // *Poult Sci.* – 2003 – Vol. 82. – N 4. – P. 571–576.
- 48.Asim M. Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population / M. Asim, M. P. Sarma, L. Thayumanavan, P. Kar // *Clin. Biochem.* – 2011. – Vol. 44 . – N. 14–15. – P.1235–1240.

49. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section Flavi // S. S. Gonçalves, A. M. Stchigel, J. F. Cano, [et al.] // Med Mycol. – 2012. – 50(2). – P. 152–160.
50. *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products / A. Riba, N. Bouras, S. Mokrane [et al.] // Food Chem Toxicol. – 2010. – 48(10). – P. 2772–2777.
51. Azziz-Baumgartner E. Aflatoxin Investigative Group. Casecontrol study of an acute aflatoxicosis outbreak / E. Azziz-Baumgartner, K. Lindblade, K. Gieseke. – Kenya, 2004. – Vol. 113. – P. 1779–1783.
52. Babu D. Sensitive quantification of aflatoxin B₁ in animal feeds, corn feed grain, and yellow corn meal using immunomagnetic bead-based recovery and real-time immunoquantitative-PCR / D. Babu, P. M. Muriana // Toxins (Basel). – 2014. – 6(12). – P. 3223–3237
53. Battacone G. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates / G. Battacone, A. Nudda, M. Palomba [et al.] // J Dairy Sci. – 2005. – Vol. 88. – N9. – P. 3063–3069.
54. Bedard L. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair / L. L. Bedard, T. E. Massey // Cancer Lett. – 2007. – Vol. 241. – P. 174–183.
55. Bedard L. Susceptibility to aflatoxin B1-induced carcinogenesis correlates with tissue-specific differences in DNA repair activity in mouse and in rat. / L. L. Bedard, M. Alessi, S. Davey, T. E. Massey // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – N4. – P. 1265–1270.
56. Bejaoui H. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces strains* / H. Bejaoui, F. Mathieu, P. Taillandier, A. Lebrihi. // J. Appl. Microbiol. – 2004. – Vol 97. – N 5. – P. 1038–1044.
57. Bennett J. W. Mycotoxins / J. W. Bennett, M. Klich // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – Vol.16. – P. 497–516.

58. Berg T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? / T. Berg // Food Contr. – 2003. – Vol. 14. – P. 219–224.
59. Bernhardt I. Red cell membrane transport in health and disease / I. Bernhardt, J. C. Ellory. – Springer, 2003. – 748 p.
60. Besaratinia A. In vitro recapitulating of TP53 mutagenesis in hepatocellular carcinoma associated with dietary aflatoxin B1 exposure / A. Besaratinia, S. I. Kim, P. Hainaut, G. P. Pfeifer. // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 137. – N3. – P. 1127–1137.
61. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective / E. Beutler // Blood. – 2008. – Vol. 111. – N 1. – P. 16–24.
62. Bhatnagar D. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development / D. Bhatnagar, J. W. Cary, K. Ehrlich [et al] // Mycopathologia. – 2006. – Vol. 162. – N3. – P. 155–166.
63. Bhatti S. A. Protective role of bentonite against aflatoxin B1 and ochratoxin A-induced immunotoxicity in broilers / S. A. Bhatti, M. Z. Khan, M. K. Saleemi, M. Saqib, A. Khan, Z. Ul-Hassan // J Immunotoxicol. – 2017. – Vol. 14(1). – P.66–76.
64. Biological degradation of aflatoxins / Q. Wu, A. Jezkova, Z. Yuan [et al.] // Drug. Metab. Rev. – 2009. – Vol. 41. – N 1. – P. 1–7.
65. Blount W. P. Turkey «X» disease / W. P. Blount // J. Br. Turk. Fed. – 1961. – 9. – P. 52–54.
66. Boesch-Saadatmandi C. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells / C. Boesch-Saadatmandi, A. Loboda, A. Jozkowicz [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2008. – Vol. 46. – N8. – P. 2665–2671.

67. Bonsi P. Aflatoxin B1 is an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity / P. Bonsi, G. Augusti-Tocco, M. Palmery, M. Giorgi. // *Gen. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 32. – N 5. – P. 615–619.
68. Boosalis M. G. The role of selenium in chronic disease / M.G. Boosalis // *Nutr. Clin. Pract.* – 2008. – Vol. 23, № 2. – P.152–160.
69. Botta D. Modulating GSH synthesis using glutamate cysteine ligase transgenic and gene-targeted mice / D. Botta, C. C. White, P. Vliet-Gregg [et al.] // *Drug Metab Rev.* – 2008. – Vol.40. – N3. – P. 465–477.
70. Bovo F. *In vitro* ability of beer fermentation residue and yeast-based products to bind aflatoxin B₁ / F. Bovo, L. T. Franco, R. E. Rosim, R. Barbalho, C. A. Fernandes de Oliveira // *Braz. J Microbiol.* – 2015. – 46(2). – P. 577–581.
71. Bryden W.L. Mycotoxins in the food chain: human health implications / W.L. Bryden // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* – 2007. – Vol. 16 (Suppl. 1). – P. 95–101.
72. Bursian S. J. Efficacy of a commercial mycotoxin binder in alleviating effects of ochratoxin A, fumonisin B1, moniliformin and zearalenone in adult mink / S. J. Bursian, R. R. Mitchell, B. Yamini [et al.] // *Vet. Hum. Toxicol.* – 2004. – Vol. 46. – N 3. – P. 122–129.
73. Caloni F. Toxicological effects of aflatoxins in horses / F. Caloni, C. Cortinovis // *Vet J.* – 2011. – 88(3). – P. 270–273.
74. Cardoso V. Antigenotoxic effect of piperine in broiler chickens intoxicated with aflatoxin B1 / Cardoso V, Vermelho AB, Ribeiro de Lima CA, [et al.] // *Toxins (Basel)*. – 2016 – 8(11). – P. E316.
75. Caridi A. New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity / A. Caridi // *Int. J. Food Microbiol.* – 2007. – Vol.120. – N1. – P.167–172.

76. Carlberg I. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver / I. Carlberg, B. Mannervik // J. Biol. Chem. – 1975. – Vol. 250. – P. 5475–5480.
77. CAST. Mycotoxins: Risk in plant, animal, and human systems. Task Force Report No. 139. Ames, IA. – 2003. – P.12–19.
78. CDC (Center for Disease Control and Prevention). Outbreak of aflatoxin poisoning – eastern and central province, Kenya. – MMWR Morb Mortal Weekly Report. – 2004. – Vol. 53. – P. 790–792.
79. Chan H. Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B₁-induced cytotoxicity in hepatoma cells / H. T. Chan, C. J. Chan, J. W. Ho // Toxicology. – 2003. – Vol. 188. – N 2–3. – P. 211–217.
80. Chance B. Reactive oxygen intermediates in biochemistry / B. Chance, E. Cadenas // Ann. Rev. Biochem. – 1986. – Vol. 55. – P. 137 – 166.
81. Chang P. K. Effects of laeA deletion on *Aspergillus flavus* conidial development and hydrophobicity may contribute to loss of aflatoxin production / P. K. Chang, L. L. Scharfenstein, K. C. Ehrlich [et al.] // Fungal Biol. – 2012. – Vol.116. – N2. – 298–307.
82. Chemoprevention of a flavonoid fraction from *Rhus verniciflua* stokes on aflatoxin B₁-induced hepatic damage in mice / K. C. Choi, W. T. Chung, J. K. Kwon, [et al.] / J. Appl. Toxicol. – 2011. – Vol. 150. – N6. – P.1021–1023.
83. Chen K. Effects of dietary selenium on histopathological changes and T-cells of spleen in broilers exposed to aflatoxin B₁ / K. Chen, X. Peng, J. Fang, H. Cui, [et al.] // Int. J Environ. Res. Public. Health. – 2014. –11(2). – P. 1904–1913
84. Chen T. Differential mutagenicity of aflatoxin B₁ in the liver of neonatal and adult mice / T. Chen, R. H. Heflich, M. M. Moore, N. Mei // Environ Mol. Mutagen. – 2010. – Vol. 51. – N2. – P. 156–163.

85. Choi K. C. Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B1-induced hepatic damage in mice / K. C. Choi, W. T. Chung, J. K. Kwon [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2010. – Vol. 48. – N10. – P. 2747–2753.
86. Chulze S. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review / S. N. Chulze // Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2010. – Vol. 27. – N5. – P. 651–657.
87. Ciegler A. Mycotoxins: occurrence, chemistry and biological activity / A. Ciegler // Liodyia, 2007. – Vol.38. – P.21–35.
88. Colak H. Determination of mould and aflatoxin contamination in Tarhana, a turkish fermented food / H. Colak, H. Hampikyan, E. B. Bingol, O. Cetin, M. Akhan, S. I. Turgay // Scientific World Journal. – 2012. – P. 218679.
89. Cole S. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein_MRP / S. P. Cole, R. G. Deeley // Bioessays. – 1998. – Vol. 20. – N11. – P. 931–940.
90. Commandeur J. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione-S-conjugates: role of bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics nutritional carcinogenesis / J. Commandeur // Acta Med. Indones. – 2010. – Vol.42. – N1. – P. 36–42.
91. Coppola S. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signaling / S. Coppola, L. Ghibelli // Biochemical Society Transactions. – 2000. – Vol. 28, (part 2). – P. 56–61.
92. Cotty P. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination / P. J. Cotty, R. Jaime–Garcia // Int J Food Microbiol. – 2007. – 119(1–2). – P. 109–115.
93. Coulombe R. A. Biological action of mycotoxins / R. A. Coulombe // J. Dairy Sci. – 1993. – 76, № 3. – P. 880–891.

94. Degradation of aflatoxin B₁ during the fermentation of alcoholic beverages / T. Inoue, Y. Nagatomi, A. Uyama, N. Mochizuki // *Toxins (Basel)*. – 2013. – 5(7). – P. 1219–1229.
95. Degola F. Structural modification of cuminaldehyde thiosemicarbazone increases inhibition specificity toward aflatoxin biosynthesis and sclerotia development in *Aspergillus flavus* / F. Degola, F. Bisceglie, M. Pioli, S. Palmano [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2017. – doi: 10.1007/s00253-017-8426-y.
96. Dogi C. A. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B₁ binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation / C. A. Dogi, R. Armando [et al.] // *Food Addit. Contam. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. – 2011. – Vol. 28. – N 12. – P. 1705–1711.
97. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // *Physiol. Rev*. – 2002. – Vol. 82. – N 1. – P. 47–95.
98. Dual effects of phloretin on aflatoxin B₁ metabolism: activation and detoxification of aflatoxin B₁ / S. S. Gao, X. Y. Chen, R. Z. Zhu [et al.] // *Biofactors*. – 2012. – 38(1). – P. 34–43.
99. Eaton D. L. The toxicology of aflatoxins / D. L. Eaton, J. D. Groopman // New York: Acad. Press. – 1994. – P. 383 – 426.
100. Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB₁-induced hepatocellular carcinoma / M. Kumar, V. Verma, R. Nagpal [et al.] – *Gene*. – 2011. – Vol. 490. – N 1–2. – P. 54–59.
101. Effects of maize naturally contaminated with aflatoxin B₁ on growth performance, intestinal morphology, and digestive physiology in ducks / Feng G. D., He J., Ao X., Chen D. W. / *Poult Sci*. – 2016 – P. pew420.

102. El-Agamy D. S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats / D. S. El-Agamy // Arch. Toxicol. – 2010. – Vol. 84. – N 5. – P. 389–396.
103. El-Zawahri M. M. Mutagenic effect of aflatoxin G1 in comparison with B1 / M. M. el-Zawahri, M. M. Morad, A. F. Khishin // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. – 1990. – Vol. 10. – N1–2. – P. 45–51.
104. Ellis E.M. Protection against aflatoxin B1 in rat – a new look at the link between toxicity, carcinogenicity, and metabolism / E.M. Ellis // Toxicol Sci. – 2009. – 109(1). – P. 1–3.
105. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – Vol. 82. – P. 70–77.
106. El-Sayed Y. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B(1) in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) / Y. S. El-Sayed, R. H. Khalil // Food Chem. Toxicol. – 2009. – Vol.47. – N7. – P.1606–1609.
107. Escartin C. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression / C. Escartin, S. J. Won, C. Malgorn, [et al.] // J. Neurosci. – 2011. – Vol. 31. – N20. – P. 7392–7401.
108. Eshelli M. Metabolomics of the bio-degradation process of aflatoxin B1 by actinomycetes at an initial pH of 6.0 / M. Eshelli, L. Harvey, R. Edrada-Ebel, B. McNeil // Toxins (Basel). – 2015. – 7(2). – P. 439–456.
109. Esper R. H. Potential of essential oils for protection of grains contaminated by aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* / R. H. Esper, E. Gonçalves, M. O. Marques, R. C. Felicio, J.D. Felicio // Front. Microbiol. – 2014. – 5. – P. 269.
110. Farombi E. The effect of modulation of glutathione levels on markers for aflatoxin B1-induced cell damage / E. O. Farombi, J. O. Nwankwo, G. O. Emerole // Afr. J. Med. Med. Sci. – 2005. – Vol. 34. – N1. – P. 37–43.

111. Fasullo M. Activation of aflatoxin B₁ by expression of human CYP1A2 polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae* / M. Fasullo, A. Smith, P. Egner, C. Cera // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* – 2014. – 761. – P. 18–26.
112. Fernández-Checa J. C. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models // J. C. Fernández-Checa, A. Fernández, A. Morales [et al.] // *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* – 2010. – Vol. 9. – N 4. – P. 439–454.
113. Fiala J.A. Sulforaphane-mediated reduction of aflatoxin B₁-N⁷-guanine in rat liver DNA: impacts of strain and sex / J.A. Fiala, P. A. Egner, N. Wiriychan, G.N. Wogan [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2011. – 121(1). – P. 57–62.
114. Firmin S. Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation / S. Firmin, P. Gandia, [et al.] // *Dairy Sci.* – 2011. – Vol. 94. – N 11. – P. 5611–5619.
115. Food and Agricultural Organization/World Health Organization, author. Standards Programme Codex Alimentarius Commission. – 1992. – Alinorm 93/12. – 218 p.
116. Fountain J. C. Effects of hydrogen peroxide on different toxigenic and atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* / J. C. Fountain, B. T. Scully, Z. Chen, S. E. Gold, A. E. Glenn, H. K. Abbas, R. D. Lee, R.C. Kemerait, B. Guo // *Toxins (Basel).* – 2015. – 7(8). – P. 2985–2999.
117. Fountain J.C. Responses of *Aspergillus flavus* to oxidative stress are related to fungal development regulator, antioxidant enzyme, and secondary metabolite biosynthetic gene expression / J. C. Fountain, P. Bajaj [et al.] // *Front Microbiol.* 2016. –Vol.7. – P.2048.
118. Fowler J. Effects of a calcium bentonite clay in diets containing aflatoxin when measuring liver residues of aflatoxin B₁ in starter broiler chicks /

- J. Fowler, Wei Li, Ch. Bailey // *Toxins* (Basel). – 2015. – 7(9). – P. 3455–3464.
119. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases / I. Fridovich // *Annu Rev. Biochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 97–112.
 120. Friedman M. Review of the inhibition of biological activities of food-related selected toxins by natural compounds / M. Friedman, R. Rasooly // *Toxins* (Basel). – 2013. – 5(4). – P. 743–775.
 121. Frisvad J. Important mycotoxins and the fungi which produce them / J. Frisvad, U. Thrane, R. Samson, J. Pitt // *Adv Exp Med Biol.* – 2006. – Vol. 31. – N3 – P. 571–573.
 122. Fritz K. Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation / K. Fritz, D. R. Petersen // *Chem. Res. Toxicol.* – 2011. – Vol. 24. – N9. – P.1411–1419.
 123. Fumonisin B1 promotes aflatoxin B1 and N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine-initiated liver tumors in rainbow trout / D. Carlson, D. E. Williams, J. M. Spitsbergen [et al.] – *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 172 – N 1. – P. 29–36.
 124. Gabal M. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases in poultry. II. Effect on one-day-old layer chicks simultaneously vaccinated against Newcastle disease, infectious bronchitis and infectious bursal disease / M. A. Gabal, A. H. Azzam // *Avian Pathol.* – 1998. – Vol. 27. – N3. – P. 290–295.
 125. Gallagher E.P. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1 / E. P. Gallagher, L. C. Wienkers, P. L. Stapleton // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54, N 1. – P. 101–108.
 126. Gallo A. Effect of the inclusion of adsorbents on aflatoxin B1 quantification in animal feedstuffs / A. Gallo, F. Masoero, T. Bertuzzi //

- Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. – 2010. – Vol.27. – N1. – P.54–63.
127. Gao S. Sulforaphane induces glutathione S-transferase isozymes which detoxify aflatoxin B(1)-8,9-epoxide in AML 12 cells / S. S. Gao, X. Y. Chen, R. Z. Zhu // *Biofactors*. – 2010. – Vol. 36. – N4. – P.289–296.
 128. Garcia S. Mycotoxins in Mexico: epidemiology, management, and control strategies / S. Garcia, N. Heredia. // *Mycopathologia*. – 2006. – Vol.162. – N3. – P. 255–264.
 129. Gardiner S. A. Transcriptome analysis of the barley-deoxynivalenol interaction: evidence for a role of glutathione indeoxynivalenol detoxification / S. A. Gardiner, J. Boddu, F. Berthiller, [et al.] // *Mol. Plant Microbe Interact*. – 2010. – Vol.23. – N7. – P. 962–976.
 130. Goldberg D.M. Glutathione reductase / D.M. Goldberg, R.J. Spooner // *Methods of enzymatic analysis*, 3rded. // Weinheim, 1983. – Vol. 111. – P. 258–265.
 131. Gratz S. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B₁ transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells / S. Gratz, Q. K. Wu, [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007 – 73(12). – P. 3958–3964.
 132. Gray M. Molds and mycotoxins: beyond allergies and asthma / M. Gray // *Altern. Ther. Health Med.* – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. S146- S152.
 133. Grintzalis K. Role of oxidative stress in sclerotial differentiation and aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus flavus* / K. Grintzalis, S. I. Vernardis, M. I. Klapa, D. Christos // *Georgiou Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – 80(18). – P. 5561–5571.
 134. Gross-Steinmeyer K. Modulation of aflatoxin B₁-mediated genotoxicity in primary cultures of human hepatocytes by diindolylmethane, curcumin, and xanthohumols / K. Gross-Steinmeyer, P. L. Stapleton, J. H. Tracy // *Toxicol Sci.* – 2009. – Vol. 112. – N 2. – P. 303–310.

135. Gupta R. Ameliorative effects of *Tinospora cordifolia* root extract on histopathological and biochemical changes induced by aflatoxin-B₁ in mice kidney / Rekha Gupta, Veena Sharma // *Toxicol. Int.* – 2011. – 18(2). – P. 94–98.
136. Guzman-de-Pena D. Regulatory considerations of aflatoxin contamination of food in Mexico / D. Guzman-de-Pena, J. J. Pena-Cabriaes // *Rev. Latinoam. Microbiol.* – 2005. – 47(3–4). – P. 160–164.
137. Habig W. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. H. Habig M. J. Pabst, W. B. Jakoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249. – N 22. – P. 7130–7139.
138. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // Oxford: University Press, 2007. – 851 p.
139. Hamid A. S. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention / A. S. Hamid, I. G. Tesfamariam, Y. Zhang, Z. G. Zhang // *Oncol. Lett.* – 2013. – 5(4). – P. 1087–1092.
140. Hayes J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance / J. Hayes // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 30. – N 6. – P. 445–600.
141. Higgins L. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents / L. G. Higgins, J. D. Hayes // *Drug. Metab. Rev.* – 2011. – Vol. 43. – N 2. – P. 92–137.
142. Horton J. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy / J.W. Horton // *Toxicology.* – 2003. – Vol. 189. – N 1–2. – P. 75–88.
143. Huang J. Q. Ethylene inhibited aflatoxin biosynthesis is due to oxidative stress alleviation and related to glutathione redox state changes in

- Aspergillus flavus* / J. Q. Huang, H. F. Jiang, Y. Q. [et al.] // Trop. Med. Hyg. – 2010. – Vol.83. – N5. – P. 1077–1083.
144. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions / J. H. Williams, T. D. Phillips, P. E. Jolly [et al.] // Am J Clin Nutr. 2004. – 80. – p. 1106–1122.
 145. Human variability in hepatic glutathione S-transferase-mediated conjugation of aflatoxin B1-epoxide and other substrates / D. H. Slone, E. P. Gallagher, H. S. Ramsdell [et al.] // Pharmacogenetics. – 1995. – Vol. 5. – N4. – P. 224–233.
 146. Hussein S. H. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals / S. H. Hussein, J. M. Brasel // Toxicology. – 2001. – 167. – P. 101–134.
 147. Ibrahim I. Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis / I. K. Ibrahim, A. M. Shareef, K. M. Al-Joubory / Res. Vet. Sci. – 2000. – 69(2). – P. 119–122.
 148. Identification of early target genes of aflatoxin B1 in human hepatocytes, inter-individual variability and comparison with other genotoxic compounds / R. Josse, J. Dumont, A. Fautrel [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2011. – Vol.3. – N 1. – P. 234–245.
 149. Ilic Z. Glutathione-S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B1 / Z. Ilic, D. Crawford, D. Vakharia [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2010. – Vol. 242. – N3. – P. 241–246.
 150. Investigation of aflatoxin M1 levels in raw and market milks in Mersin Province, Turkey / N. Delialioğlu, F. Otağ, N. D. Ocal [et al.] // Mikrobiyol Bul. – 2010. – 44(1). – P. 87–91.

151. Ismaiel A. Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* / A. A. Ismaiel, M. F. Ghaly, A. K. El-Naggar // Curr. Microbiol. – 2011. – Vol. 62. – N5. – P. 1602–1609.
152. Ismaiel A.A. Efficacy of aqueous garlic extract on growth, aflatoxin B1 production, and cyto-morphological aberrations of *Aspergillus flavus*, causing human ophthalmic infection: topical treatment of *A. flavus* keratitis / A. A. Ismaiel, G. H. Rabie, S. E. Kenawey, M. A. Abd El-Aal // Braz. J Microbiol. – 2012 – 43(4). – P. 1355–1364.
153. Jantapan K. Inhibitory effects of thai essential oils on potentially aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* / K. Jantapan, A. Poapolathep, [et al.] // Biocontrol Sci. – 2017. – 22(1). – P. 31–40.
154. Jardon-Xicotencatl S. Detoxification of aflatoxin-contaminated maize by neutral electrolyzed oxidizing water / S. Jardon-Xicotencatl, R. Díaz-Torres, A. Marroquín-Cardona, T. Villarreal-Barajas, A. Méndez-Albores // Toxins (Basel). – 2015. – 7(10). – P. 4294–4314.
155. Jaynes W. F. Aflatoxin toxicity reduction in feed by enhanced binding to surface-modified clay additives / W. F. Jaynes, R. E. Zartman // Toxins (Basel). – 2011. – 3(6). – P. 551–565.
156. Jeannot E. Increased incidence of aflatoxin B1-induced liver tumors in hepatitis virus C transgenic mice / E. Jeannot, G. A. Boorman, O. Kosyk, B.U. Bradford, S. Shymoniak [et al.] // Int. J Cancer. – 2012. – 130(6). – P.1347–1356.
157. Johansson K. Multiple roles of microsomal glutathione transferase 1 in cellular protection: a mechanistic study / K. Johansson, J. Järvliden, V. Gogvadze // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – Vol.49. – N 11. – P. 1638–1645.
158. Johnson E. A. *Phaffia rhodozyma*: Colorful odyssey / E. A. Johnson // Int. Microbiol. – 2003. – Vol. 6, N 3. – P. 169–174.

159. Johnson N. M. Complete protection against aflatoxin B₁-induced liver cancer with a triterpenoid: DNA adduct dosimetry, molecular signature and genotoxicity threshold / N. M. Johnson, P. A. Egner, V. K. Baxter, [et al.] // *Cancer Prev. Res. (Phila)*. – 2014. – 7(7). – P. 658–665.
160. Kabak B. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins / B. Kabak, A. D. Dobson // *J. Food Prot.* – 2009. – Vol. 72. – N9. – P. 2006–2016.
161. Kang'ethe E. Aflatoxin B₁ and M₁ contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya / E. K. Kang'ethe. K. A. Lang'a // *Afr Health Sci.* – 2009. – Vol. 9. – N 4. – P. 218–226.
162. Karaman M. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology / M. Karaman, H. Basmacioglu, M. Ortatatli, H. Oguz // *Br. Poult. Sci.* – 2005. – 46(3). – P. 394–400.
163. Keller-Seitz M. U. Transcriptional response of yeast to aflatoxin B₁: recombinational repair involving RAD51 and RAD1 / M. U. Keller-Seitz, U. Certa, Ch. Sengstag, [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2004. – 15(9). – P. 4321–4336.
164. Kensler T.W. Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology / T. W. Kensler, B. D. Roebuck, G. N. Wogan, J. D. Groopman // *Toxicological sciences.* – 2011. – Vol. 120 (S1). – P. S28 – S48.
165. Khlangwiset P. Aflatoxins and growth impairment: a review / P. Khlangwiset, G. S. Shephard, F. Wu // *Crit Rev Toxicol.* 2011. – 41(9). – P. 740–755.
166. Kim H. A novel mycotoxin purification system using magnetic nanoparticles for the recovery of aflatoxin B₁ and zearalenone from feed / H. Kim, S. Kim, J. Lee, Ch. Choi, H. Lee, H. Kang, S. Cha // *J Vet. Sci.* – 2012. – 13(4). – P. 363–369.

167. Kim J. E. Alpha-class glutathione S-transferases in wild turkeys (*Meleagris gallopavo*): characterization and role in resistance to the carcinogenic mycotoxin aflatoxin B₁ / J. E. Kim, B. R. Bunderson, [et al.] // PLoS One. – 2013. – 8(4). – P. e60662.
168. Kim J. Interference with mutagenic aflatoxin B₁-induced checkpoints through antagonistic action of ochratoxin A in intestinal cancer cells: a molecular explanation on potential risk of crosstalk between carcinogens / Kim J., Park S. H., Do K. H., Kim D., Moon Y. // Oncotarget – 2016 – 7(26). – P. 39627–39639.
169. Kornberg A. Methods in enzymology / A. Kornberg, B. L. Horecker, N. O. Kaplan . – 1955. – New York: Academic Press. – P. 323.
170. Koser P. L. The genetics of aflatoxin B₁ metabolism. Association of the induction of aflatoxin B₁-4-hydroxylase with the transcriptional activation of cytochrome P3-450 gene / P. L. Koser, M. B. Faletto, A. E. Maccubbia // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 263, N 25. – P. 12584–12595.
171. Koval N. Process of lipid peroxidation and activities of antioxidant system enzymes in cells liver, brain and lung of white rats in conditions of aflatoxin B₁ injection / N. Koval, H. Antonyak // Materiały VIII Konferencji Młodych Badaczy p.t. „Fizjologia i biochemia w żywieniu zwierząt” (19 - 20 września 2011 r., Warszawa). – Warszawa, 2011. – P. 13-16.
172. Koval N. Acute toxicity of aflatoxin B₁ / N. Koval, R. Fedyakow // Materiały VI Ogólnopolskiej konferencji naukowych młodych pracowników nauki i studentów “Nowe tendencje rozwoju rolnictwa i obszarów wiejskich” – Rzeszów, 2010. – C. 167 – 171.
173. Koval N. Mycotoxins in forages / N. Koval, H. Antonyak // Materiały Jubileuszowej V Ogólnopolskiej Młodzieżowej Konferencji Naukowej ›Młodzi naukowcy – praktyce rolniczej‹ „Nauki rolnicze w rzeczywistości społeczno-gospodarczej w współczesnych obszarach wiejskich” (21–23 kwietnia 2009). – Uniwersytet Rzeszowski, 2009. – C. 57 – 61.

174. Kumar P. Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management / P. Kumar, D. K. Mahato, M. Kamle, T. K. Mohanta, S. G. Kang // *Front Microbiol.* – 2017. – Vol.7. – P. 2170.
175. Lai H. Association between aflatoxin B₁ occupational airway exposure and risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study / H. Lai, X. Mo, Y. Yang, K. He, [et al.] // *Tumour Biol.* – 2014. – 35(10). – P. 9577–9584.
176. Lai X. Potential for aflatoxin B₁ and B₂ production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples / X. Lai, H. Zhang, R. Liu, C. Liu // *Saudi J Biol. Sci.* – 2015. – 22(2). – P. 176–180.
177. Lawlor P. Mycotoxins in pig feeds: clinical aspects / P. G. Lawlor, B. P. Lynch // *Irish Veterinary Journal.* – 2001. – №54. – P.172–176.
178. Leal M. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin *in vivo* / M. Leal, A Shimada, F. Ruíz, E. González de Mejía // *Toxicol Lett.* – 1999. – Vol. 109. – N1–2. – P.1–10.
179. Leger R. J. Lack of host ipecialization in *Aspergillus flavus* / R. J. St. Leger, S. E. Screen, B. Shams–Pirzadeh // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – 66. – P. 320–324.
180. Lewis L. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya, Kenya Aflatoxicosis Investigation Group / L. Lewis, M. Onsongo, H. Njapau // *Res.* – 2005. – 113. – P. 1763–1767.
181. Lipid peroxidation, DNA damage and coenzyme Q10 in lung cancer patients - markers for risk assessment? / U. Cobanoglu, H. Demir, A. Cebi [et al.] // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2011. – Vol. 12. – N6. – P. 1399–1403.
182. Liu S. P. Higher susceptibility to aflatoxin B(1)-related hepatocellular carcinoma in glycine N-methyltransferase knockout mice / S. P. Liu, Y. S. Li, C. M. Lee [et al.] // *Toxicology.* – 2002. – Vol. 178. – N1. – P. 201-207.

183. Loi M. Aflatoxin B₁ and M₁ Degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* and Redox Mediators / Loi M, Fanelli F, Zucca P, Liuzzi VC, [et al.]. // *Toxins (Basel)*. – 2016 – 8(9). – P. E245.
184. Lu S. Regulation of glutathione synthesis / S. Lu // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30. N1–2. – P. 42–59.
185. Luchese C. Diphenyl diselenide in its selenol form has dehydroascorbate reductase and glutathione S-transferase-like activity dependent on the glutathione content / C. Luchese, C. W. Nogueira // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 62. – N9. – P. 1146–1151.
186. Luchese C. Oxidative damage and gene expression profile of antioxidant enzymes after T-2 toxin exposure in mice / M. Chaudhari, R. Jayaraj, S. R. Santhosh, P. V. Rao // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2009. – Vol. 23. – N3. – P. 212–221.
187. Ma Q. Molecular mechanisms of lipoic acid protection against aflatoxin B₁-induced liver oxidative damage and inflammatory responses in broilers / Q. Ma, Y. Li, Y. Fan, L. Zhao, [et al.] // *Toxins (Basel)*. – 2015. – 7(12). – P. 5435–5447.
188. Madrigal-Santillán E. Antigenotoxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B(1) contaminated corn / E. Madrigal-Santillán, E. Madrigal-Bujaidar, R. Márquez-Márquez, A. Reyes // *Food Chem. Toxicol.* – 2006. – Vol. 44. – N12. – P. 2058–2063.
189. Madrigal-Santillán E. Antigenotoxic studies of different substances to reduce the DNA damage induced by aflatoxin B(1) and ochratoxin A / E. Madrigal-Santillán, JA. Morales-González, N. Vargas-Mendoza, P. Reyes-Ramírez, S. Cruz-Jaime // *Toxins (Basel)*. – 2010. – Vol. 2(4). – P. 738–757.
190. Mannaa F. A. Prevention of cardiotoxicity of aflatoxin B₁ via dietary supplementation of papaya fruit extracts in rats / F. A. Mannaa, K. G. Abdel-Wahhab, M. A. Abdel-Wahhab // *Cytotechnology*. – 2014. – 66(2). – P. 327–334.

191. Marai I. Aflatoxins in rabbit production: hazards and control / I. F. M. Marai, A. A. Asker // Tropical and subtropical agroecosystems. – V. 8. – N1. – 2008 – P. 3–6.
192. Maresca M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol / M. Maresca // Toxins (Basel). – 2013. – Vol. 5(4). – P. 784–820.
193. Marin D. E. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin / D. E. Marin, I. Taranu, R. Bunaciu // Journal of Animal Science.– 2002.– Vol. 80. – P. 1250–1257.
194. Mary V. S. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells / V. S. Mary, M. G. Theumer, S. L. Arias, H. R. Rubinstein // Toxicology. – 2012. – Vol. 302(2-3). – P. 299–307.
195. Mateo E. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR–based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. / E. M. Mateo, J. Gil–Serna, B. Patiño, M. Jiménez // Int J Food Microbiol. – 2011. – 149(2). – P.118–126.
196. Mathuria N. Aflatoxin induced hemolysis and its amelioration by turmeric extracts and curcumin in vitro / N. Mathuria, R. J. Verma // Acta Pol. Pharm. – 2007. – Vol. 64. – N2. – P. 165–168.
197. Matur E. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* extract on haematological parameters, immune function and the antioxidant defence system in breeder hens fed aflatoxin contaminated diets / E. Matur, E. Ergul, I. Akyazi [et al.] // Br. Poult. Sci. – 2011. – Vol. 52. – N5. – P. 541–550.
198. Maurya B. K. Fisetin modulates antioxidant enzymes and inflammatory factors to inhibit aflatoxin-B1 induced hepatocellular carcinoma in rats / B. K. Maurya, S. K. Trigun // Oxid. Med. Cell Longev. – 2016. – P. 1972793.

199. Mazur L.J. Spectrum of noninfectious health effects from molds / L.J. Mazur, J. Kim // *Pediatrics*. – 2006. – Vol. 118, N 6. – P. e1909-1926.
200. McLean M. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update / M. McLean, M. F. Dutton // *Pharmacol. Ther.* – 1995. – Vol. 65. – N2. – P.163–192.
201. Medina-Navarro R. Protein conjugated with aldehydes derived from lipid peroxidation as an independent parameter of the carbonyl stress in the kidney damage / R. Medina-Navarro, R. Nieto-Aguilar, C. Alvarez-Aguilar // *Lipids Health Dis.* – 2011. – Vol. 10. – N 1. – P. 201.
202. Meissonnier G. M. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression / G. M. Meissonnier, P. Pinton, J. Laffitte [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 231. – N2. – P. 142–149.
203. Meki A.R. Aflatoxin B1 induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin / A.R. Meki, S.K. Abdel-Ghaffar, I. El-Gibaly // *Neuro Endocrinol Lett.* – 2001. – 22(6). – P. 417–426.
204. Millán Trujillo F. Efficacy and stability of ammoniation process as aflatoxin B1 decontamination technology in rice / F. R. Millán Trujillo, A. J. Martinez Yépez // *Arch. Latinoam. Nutr.* – 2003. – Vol. 53. – N3. – P. 287–292.
205. Mogilnaya O. A. Hematological parameters and the state of liver cells of rats after oral administration of aflatoxin B1 alone and together with nanodiamonds / O. A. Mogilnaya, A. P. Puzyr, A. V. Baron, V. S. Bondar // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – 5(5). – P. 908–912.
206. Mohd-Redzwan S. A mini review on aflatoxin exposure in Malaysia: past, present and future / S. Mohd-Redzwan, R. Jamaluddin, M.Abd.-Mutalib, Z.Ahmad // *Front. Microbiol.* – 2013. – 4. – P. 334.

207. Mongkon W. Aflatoxin B₁ contamination of dairy feeds after storage in farm practice in tropical environmen / W. Mongkon, Y. Sugita-Konishi, [et al.] // *Biocontrol Sci.* – 2017. – 22(1). – P. 41–45.
208. Moreau M. Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation / M. Moreau, G. Lescure, A. Agoulon // *J. Appl. Toxicol.* – 2011 – Vol. 25. – N10. – P. 234–239
209. Mousavi S. A. Inhibitory effects of silver nanoparticles on growth and aflatoxin B₁ production by *Aspergillus parasiticus* / S. A. Mousavi, S. Pourtalebi // *Iran J Med. Sci.* – 2015. – 40(6). – P. 501–506.
210. Mughal M. J. Aflatoxin B₁ induced systemic toxicity in poultry and rescue effects of selenium and zinc / M. J. Mughal, X. Peng, A. A. Kamboh, Y. Zhou, J. Fang // *Biol Trace Elem Res.* – 2017. – P.1007.
211. Neal G. Genetic implications in the metabolism and toxicity of mycotoxins / G. E. Neal / *Toxicol. Lett.* – 1995. – Vol. 82–83. – P.861–867.
212. Nierman H. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* / H. Nierman // *Nature.* – 2005. – V.438 (7071). – P. 1151–1156.
213. Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects /E. Niki / *Free Radic Biol Med.* – 2009. – P. 469–484.
214. Nili-Ahmadabadi A. Protective effect of pretreatment with thymoquinone against aflatoxin B₁ induced liver toxicity in mice / A. Nili-Ahmadabadi, F. Tavakoli, G.R. Hasanzadeh, H.R. Rahimi, O. Sabzevari // *Daru.* – 2011. – 19(4). – P. 282–287.
215. Noh H. Reactive oxygen species and oxidative stress / H. Noh, H. Ha // *Contrib. Nephrol.* – 2011. – Vol. 170. – N .102. – P. 12.
216. Nurul Adilah Z. Effect of dietary macronutrients on aflatoxicosis: a mini-review / Z. Nurul Adilah, S. Mohd Redzwan // *J Sci Food Agric.* – 2017. – P.3845

217. Obuseh F. Aflatoxin B1 albumin adducts in plasma and aflatoxin M1 in urine are associated with plasma concentrations of vitamins A and E / F. A. Obuseh, P. E. Jolly, Y. Jiang [et al.] // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* – 2010. – Vol. 80. – N. 6. – P. 355–368.
218. Odewumi C. Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells / C. O. Odewumi, V. L. Badisa, U. T. Le [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2011. – Vol. 27. – N2. – P.243–248.
219. Offiah N. Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk, and animal feed in Trinidad / N. Offiah, A. Adesiyun // *J. Food Prot.* – 2007. – 70(3). – P.771–775.
220. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95. – P. 351–358.
221. Oskoueian E. Cytoprotective effect of palm kernel cake phenolics against aflatoxin B1-induced cell damage and its underlying mechanism of action / E. Oskoueian, N. Abdullah, [et al.] // *BMC Complement Altern. Med.* – 2015. – 15. – P. 392.
222. Owens B. A comparison of the effects of different yeast products and antibiotic on broiler performance / B. Owens, K. J. McCracken // *Br. Poult. Sci.* – 2007. – Vol. 48. – P. 49–54.
223. Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart / M. Messarah, M. Saoudi, A. Boumendjel [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – Vol.117. – P. 469–484
224. Ozen H. Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks / H. Ozen // *Res. Vet. Sci.* – 2009 – Vol. 86. – P. 485–489.
225. Pandey I. Studies on production performance and toxin residues in tissues and eggs of layer chickens fed on diets with various concentrations of

- aflatoxin B1 / I. Pandey, S. S. Chauhan // Br. Poult. Sci. – 2007. – Vol. 48. – N 6. – P. 713–723.
226. Paterson R. R. Thermophilic fungi to dominate aflatoxigenic/mycotoxigenic fungi on food under global warming / R.R. Paterson, N. Lima // Int J Environ Res Public Health. – 2017. – Vol.14(2). – P. E199.
227. Payne G. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis / G. A. Payne, M. P. Brown // Annu Rev. Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – P. 329–362.
228. Peng Xi. Protective roles of sodium selenite against aflatoxin B₁-induced apoptosis of jejunum in broilers / X. Peng, S. Zhang, J. Fang, H. Cui, Z. Zuo, J. Deng // Int. J Environ. Res. Public. Health. – 2014. – 11(12). – P. 13130–13143.
229. Perrone G. Aspergillus species and their associated mycotoxins / G. Perrone, A. Gallo // Methods Mol. Biol. – 2017. – Vol.1542. – P.33–49.
230. Perrone G. Aspergillus species and their associated mycotoxins / Perrone G, Gallo A. // Methods Mol Biol. – 2017. – 1542 – P. 33–49.
231. Péteri Z. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts / Z. Péteri, J. Téren, C. Vágvölgyi, J. Varga // Food Microbiol. – 2007. – Vol. 24. – N3. – P.205–210.
232. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model / D. J. Bueno, Casale C. H. R. P. Pizzolitto [et al.] // J. Food Prot. – 2007 – Vol. 70. – N9. – P. 2148–2154.
233. Pier A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production / A.C. Pier // J. Anim. Sci. – 1992. – Vol. 70, N 12. – P. 3964–3967.
234. Pitt J.I. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts / J.I. Pitt, A.D. Hocking // Mycopathologia. – 2006. – Vol. 162, N 3. – P. 233–243.

235. Polonelli L. Vaccination of lactating dairy cows for the prevention of aflatoxin B(1) carry over in milk / L. Polonelli, L. Giovati, G. Magliani [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – N10. – P. 267–277.
236. Prado G. Occurrence of aflatoxin B₁ in natural products / G. Prado, A. F. Altoé, T. C. Gomes, A. S. Leal, V. A. Morais [et al.] // Braz. J Microbiol. – 2012 – 43(4). – P. 1428–1436.
237. Prandini A. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products / A. Prandini, G. Tansini, S. Sigolo [et al.] // Food Chem Toxicol. – 2009. – 47(5). – P. 984–991.
238. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1 / A. Siritantikorn, K. Johansson, K. Ahlen [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – Vol. 355, N 2. – P. 592–596.
239. Protective effects of melatonin in reduction of oxidative damage and immunosuppression induced by aflatoxin B1-contaminated diets in young chicks / M. Sirajudeen, K. Gopi, J. S. Tyagi [et al.] // Environ Toxicol. – 2011. – Vol. 26. N 2. – P. 153–160.
240. Punvittayagul C. Effect of pinocembrin isolated from *Boesenbergia pandurata* on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver / C. Punvittayagul, R. Wongpoomchai, S. Taya, W. Pompimon // Drug Metab Lett. – 2011. – Vol. 5. – N1. – P. 1–5.
241. Qin H. Effect of superoxide and inflammatory factor on aflatoxin B1 triggered hepatocellular carcinoma / Qin H, Li H, Zhou X, Peng C, Tan H, Wang M. // Am J Transl Res. –2016 – 8(9) – P. 4003–4008.
242. Quezada T. Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development / T. Quezada, H. Cuellar, F. Jaramillo-Juarez [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. – 2002. – 125. – P. 265–272.
243. Qureshi H. Cytotoxic effects of aflatoxin B1 on human brain microvascular endothelial cells of the blood-brain barrier / H. Qureshi, S. S. Hamid, S. S. Ali, [et al.] // Med Mycol. – 2015. – 53(4). – P. 409–416.

244. Raisuddin S. et al. Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats / S. Raisuddin, K.P. Singh, S.I. Zaidi // *Mycopathologia*. – 1993. – Vol. 124. – P. 189–194.
245. Raisuddin S. Immunostimulating effects of protein A in immunosuppressed aflatoxin-intoxicated rats / S Raisuddin , K. P. Singh., S. I. Zaidi., P. K. Ray. // *Int J Immunopharmacol*. – 1994. – Vol. 16 – N 12. – P. 977–984.
246. Raju M. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin) / M. V. Raju, G. Devegowda // *Br. Poult. Sci*. – 2000. – Vol. 41. – N 5. – P.640–650.
247. Rasooly R. Non-linear relationships between aflatoxin B₁ levels and the biological response of monkey kidney vero cells / R. Rasooly, B. Hernlem, X. He, M. Friedman // *Toxins (Basel)*. – 2013. –5(8). – P.1447–1461.
248. Rastogi R. Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B₁-treated male wistar rats: preventive effect of picroliv / R. Rastogi, A.K. Srivastava, A.K. Rastogi // *Pharmacol Toxicol*. – 2001. – 88(2). – P. 53–58.
249. Rattan SIS. Theories of biological aging: Genes, proteins and free radicals // SIS Rattan // *Free Radic. Res*. – 2006. – Vol. 40. – N. 10–12.
250. Rawal S. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolism and prevention / S. Rawal, J. Kim, R. Jr Coulombe // *Res. Vet. Sci*. – 2010. – Vol.89. – N3. – P. 325–331.
251. Razygraev A. V. Pineal gland glutathione peroxidase activity in rats and its age-associated change / A. V. Razygraev // *Adv. Gerontol*. – 2010. – Vol.23. – N3. – P. 392–395.

252. Reddy S. Properties of aflatoxin and it producing fungi / S. V. Reddy, F. Waliyar // International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. – 2009.
253. Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae* / G. Prado, J. E. Madeira, V. A. Morais [et al.] // J. Food Prot. – 2011. – Vol.74. – N6. – P.1003–1006.
254. Reed T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease / T. T. Reed // Free Radic. Biol. Med. – 2011. – Vol. 51. – N 7. – P. 1302–1319.
255. Richard J. L. Mycotoxins, risks in plant, animal and human systems / J. L. Richard, G. A. Payne, A. E Desjardin [et al.] // CAST Task Force Report 139. Council for Agricultural Science and Technology. – Ames, Iowa, USA, 2003. – P. 101–103.
256. Rizzo A.F. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin / A.F. Rizzo, F. Atroshi, M. Ahotupa [et al.] // Zentralbl. Veterinarmed A. – 1994. – Vol. 41(2). – P. 81–90.
257. Robens J.F. Aflatoxins in animal and human health / J.F. Robens, J.L. Richard // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 1992. – Vol. 127. – P. 69 – 94.
258. Rodríguez-Sáiz M. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin / M. Rodríguez-Sáiz, J. L. de la Fuente, J. L. Barredo // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 88, N 3. – P. 645–658.
259. Roze L. V. Aflatoxin biosynthesis is a novel source of reactive oxygen species – a potential redox signal to initiate resistance to oxidative stress? / L. V. Roze, M. Laivenieks, S. Hong, J. Wee [et al.] // Toxins (Basel). – 2015. – 7(5). – P. 1411–1430.
260. Sabater-Vilar M. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses / M. Sabater-Vilar, H.

- Malekinejad, M. H. Selman [et al.] // *Mycopathologia*. – 2007. – 163. – N 2. – P. 81–90.
261. Sabet F. S. FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of aflatoxin B1 in peanut and rice / F. S. Sabet, M. Hosseini, H. Khabbaz, M. Dadmehr, M. R. Ganjali // *Food Chem.* – 2017. – Vol. 220. – P. 527–532
262. Sabourin P. J. Evaluation of acute immunotoxicity of aerosolized aflatoxin B(1) in female C57BL/6N mice / P. J. Sabourin, J. A. Price, S. L. Casbohm [et al.] // *J. Immunotoxicol.* – 2006. – Vol.3. – N1. – P.11–20.
263. Sangare L. Aflatoxin B₁ Degradation by a *Pseudomonas* Strain / Lancine Sangare, Yueju Zhao, Yan Wang, Yang Liu [et al.] // *Toxins (Basel)*. – 2015. – 7(9). – P. 3028–3040.
264. Schatzmayr G. Microbiologicals for deactivating mycotoxins / G. Schatzmayr, F. Zehner, M. Täubel [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2006. – Vol. 50. – N6. – P. 543–551.
265. Schmidt I. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma* *Xanthophyllomyces dendrorhous* / Schmidt I., Schewe H., Gassel S., [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 89, N 3. – P. 555–571.
266. Shaikh Z. A. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants / Z. A. Shaikh, T. T. Vu, K. Zaman // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 154. – N 1. – P. 130–137.
267. Shao S. Comparative metabolomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during the degradation of patulin using gas chromatography-mass spectrometry / S. Shao, T. Zhou, B. D. McGarvey // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol 10. – P. 1223–1229.

268. Shen H. M. Detection of elevated reactive oxygenspecies level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1 / H. M. Shen, C. Y. Shi, Y. Shen, C. N. Ong // Free Rad. Biol. Med. – 1996. – Vol. 21. – P. 139–146.
269. Shetty P. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods / P. H. Shetty, B. Hald, L. Jespersen // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 113. – N1. – P. 41–46.
270. Sheveleva S.A. The microbiological safety of food products, and environmental factors // Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. – 2006. – Vol. 5. – P. 43–52.
271. Sies H. Oxidative stress: introduction / H. Sies // Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. – 1991. – P. 15–22.
272. Sirajudeen M. Protective effects of melatonin in reduction of oxidative damage and immunosuppression induced by aflatoxin B1-contaminated diets in young chicks / M. Sirajudeen, K. Gopi, [et al.] // Environ Toxicol. – 2011. – Apr 26(2). – P. 153–160.
273. Smith G. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) genotype but not GSTT1 or MC1R genotype influences erythematous sensitivity to narrow band (TL-01) UVB phototherapy / G. Smith, S. Weidlich, R. S. Dawe, S. H. Ibbotson // Pharmacogenet Genomics. – 2011. – Vol. 21. – N4. – P.217–224.
274. Stewart RK. Glutathione S-transferase-catalyzed conjugation of bioactivated aflatoxin B1 in rabbit lung and liver / RK. Stewart, CJ. Serabjit-Singh, TE. Massey // Toxicol Appl Pharmacol. – 1996. – Oct 140(2). – P. 499–507.
275. Stocker P. Aminoacylase 1-catalysed deacetylation of bioactives epoxides mycotoxin-derived mercapturates; 3,4-epoxyprococenes as models of cytotoxic epoxides / P. Stocker, J. M. Brunel, L. de Rezende [et al.] // Biochimie. – 2012. – Vol 45. – N2. – P. 1421–1423.

276. Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B₁, and oxidative stress biomarkers status / M. G. Theumer, M. C. Cánepa, A. G. López [et al.] // Toxicology. – 2010. – Vol. 268. – N1–2. – P.104–110.
277. Subclinical doses of T-2 toxin impair acquired immune response and liver cytochrome P450 in pigs / G. M. Meissonnier, J. Laffitte, I. Raymond, [et al.] // Toxicology. – 2008. – Vol. 247. – N1. – P. 46–54.
278. Sulforaphane, a cancer chemopreventive agent, induces pathways associated with membrane biosynthesis in response to tissue damage by aflatoxin B₁ / N. Techapiesancharoenkij, J. A. Fiala, P. Navasumrit, [et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. – 2015. – 282(1). – P. 52–60.
279. Taevernier L. Blood-brain barrier transport kinetics of the cyclic depsipeptide mycotoxins beauvericin and enniatins / L. Taevernier, [et al.] // Toxicol Lett. – 2016 –Vol. 258 – P. 175–184.
280. Thanissery R. Evaluation of the efficacy of yeast extract in reducing intestinal *Clostridium perfringens* levels in broiler chickens / R. Thanissery, J. L. McReynolds, D. E. Conner // Poult. Sci. – 2010. – Vol. 89, N 11. – P. 2380–2388.
281. Tian J. Investigations on the antifungal effect of nerol against *Aspergillus flavus* causing food spoilage / J. Tian, X. Zeng, H. Zeng, [et al.] // Scientific World Journal. – 2013. – P. 230795.
282. Tosun H. Determination of Aflatoxin B₁ levels in organic spices and herbs / H. Tosun, R. Arslan // Scientific World Journal. – 2013. – P. 874093.
283. Towner R. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile / R. A. Towner, S. Y. Qian, M. B. Kadiiska, R. P. Mason // Free Radic. Biol. – 2003. – Vol. 35. – P. 1330 – 1340.
284. Tulayakul P. Comparative activities of glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B₁ in livers of experimental and farm

- animals / P. Tulayakul, S. Sakuda, K. Dong, S. Kumagai // *Toxicon*. – 2005. – Vol. 46. – N2. – P.204–209.
285. Ueno Y. The toxicology of mycotoxins / Y. Ueno // *CRC Crit. Rev. Toxicol.* – 1985. – Vol. 14. – P. 99–132.
286. Umesha S. Aflatoxins and food pathogens: impact of biologically active aflatoxins and their control strategies / S. Umesha, H. M. Manukumar, B. Chandrasekhar, P. Shivakumara [et al.] // *J Sci Food Agric.* – 2017. – Vol. 97(6) – P.1698–1707
287. Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyl-transferase from barley by heterologous expression in yeast / W. Schweiger, J. Boddu, S. Shin, [et al.] // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – 2010. – Vol. 23. – N 7. – P. 977–986.
288. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, MT. Cronin, M. Mazur, J. Telser // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39(1). – P. 44–84.
289. Varga J. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi* / J. Varga, J.C. Frisvad, R.A. Samson // *Stud. Mycol.* – 2011. – 69(1). – P. 57–80.
290. Velayutham M. Removal of H₂O₂ and generation of superoxide radical: role of cytochrome c and NADH / M. Velayutham, C. Hemann, J. L. Zweier // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51. – N 1. – P. 160–170.
291. Verheecke C. Microbial degradation of aflatoxin B1: Current status and future advances / Verheecke C., Liboz T., Mathieu F. // *Int J Food Microbiol.* 2016 – 237. – P. 1–9.
292. Vita V. Aflatoxin B1 contamination in feed from Puglia and Basilicata regions (Italy): 5 years monitoring data / Vita V., Clausi M. T., Franchino C., De Pace R. // *Mycotoxin Res.* – 2016. – 32(4). – P. 229–236.
293. Wang F. Protective effects of sodium selenite against aflatoxin B₁-induced oxidative stress and apoptosis in broiler spleen / F. Wang, G. Shu, X. Peng,

- J. Fang [et al.] // *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* – 2013. – 10(7). – P.2834–2844.
294. Watson S. Interventions targeting child undernutrition in developing countries may be undermined by dietary exposure to aflatoxin / S. Watson, Y. Y. Gong, M. Routledge // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2017. – Vol. 57(9). – P.1963–1975.
295. Wayne L. B. Mycotoxins in food chain: human health implications / B. L. Wayne // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* – 2007. – N16.(Supl.1). – P.95 –101.
296. Williams J. DNA damage in fetal liver cells of turkey and chicken eggs dosed with aflatoxin B1 / J. G. Williams, U. Deschl, G. M. Williams // *Arch Toxicol.* – 2011. – 85(9). – P. 1167–1172.
297. Williams J. H. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions / J. H. Williams, T. D. Phillips, [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 80. – P. 1106–1122.
298. Wogan G. N. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review / G. N. Wogan, Th. W. Kensler, J. D. Groopman // *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* – 2012. – 29(2). – P. 249–257.
299. Wogan G. Aflatoxin as a human carcinogen / G. N. Wogan // *Hepatology.* – 1999. – Vol. 30. – N2. – P.573-575.
300. Wood G.E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States / G.E. Wood // *J. Anim. Sci.* – 1992. – Vol. 70, N 12. – P. 3941–3949.
301. Wu F. Evaluating the technical feasibility of aflatoxin risk reduction strategies in Africa / F. Wu, P. Khlangwiset // *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* – 2010. – 27(5). P. 658–676.
302. Wu F. Global risk assessment of aflatoxins in maize and peanuts: are regulatory standards adequately protective? / F. Wu, S. L. Stacy, Th. W. Kensler // *Toxicol. Sci.* – 2013. –135(1). – P. 251–259.

303. Yao H. Developments in detection and determination of aflatoxins / H. Yao, Z. Hruska, J. D. Di Mavungu // World Mycotoxin Journal. – 2015. – 8 (2). – P. 181–191
304. Yazdani D. Molecular identification of *Aspergillus* and *Eurotium* species isolated from rice and their toxin – producing ability / D. Yazdani, M. A. Zainal Abidin, Y. H. Tan, S. Kamaruzaman // Mikrobiologiya. – 2011. – 80(5). – P.707–713.
305. Yu J. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases // J. Yu, T. E. Cleveland, [et al.] // Rev. Iberoam. Micol. – 2005. – 22(4). – P. 194–202.
306. Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination / Jiujiang Yu // Toxins (Basel). – 2012. – 4(11). – P. 1024–1057.
307. Yu J. Genetics and biochemistry of mycotoxin synthesis / J. Yu // Handbook of fungal biotechnology (2nd Ed.). – Arora DK (Ed.). – New York: Marcel Dekker, 2003. – P. 120–126.
308. Yunus A.W. Aflatoxin B₁ in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues / A.W. Yunus, E. Razzazi-Fazeli, J. Bohm // Toxins (Basel). – 2011. – 3(6). – P. 566–590.
309. Zhou G. Detoxification of aflatoxin B₁ by *Zygosaccharomyces rouxii* with solid state fermentation in peanut meal / G. Zhou, Y. Chen, Q. Kong, Y. Ma, Y. Liu // Toxins (Basel). – 2017. Vol. 9(1). – P. E42
310. Zychowski K. E. The effect of aflatoxin-B₁ on red drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of novasil for the prevention of aflatoxicosis / K. E. Zychowski, A. R. Hoffmann, [et al.] // Toxins (Basel). – 2013. – 5(9). – P.1555–1573.

Додаток А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Дрогобицького державного педагогічного
університету імені Івана Франка
канд. фіз.-мат. наук, доцент



Шаран В.Л.

4» грудня 2016 р.

КАРТА ЗВОРОТНОГО ЗВ'ЯЗКУ

1. Викладені в інформаційному листі дані викладача кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка Гойванович Наталії Костянтинівни, отримані при виконанні дисертаційної роботи на тему: «Біохімічні механізми порушень метаболізму в тканинах тварин під впливом афлатоксину В₁ та їх корекція введенням антиоксидантів» використовуються у навчальному процесі кафедри біології та хімії біолого-природничого факультету Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка при викладанні нормативного курсу «Мікробіологія з основами вірусології та імунології».
2. Інформаційний лист щодо результатів досліджень за темою дисертаційної роботи викладача кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка Гойванович Наталії Костянтинівни розглянуто і схвалено на засіданні кафедри біології та хімії (протокол № 13 від 13.12.2016 р.)

Завідувач кафедри біології та хімії
Дрогобицького державного педагогічного
університету імені Івана Франка
доктор біологічних наук,
професор

М.І. Кузьмак



Додаток В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Дрогобицького державного педагогічного
університету імені Івана Франка
канд. фіз.-мат. наук, доцент



В.Шаран
Шаран В.Л.
«10» квітня 2017р.

КАРТА ЗВОРОТНОГО ЗВ'ЯЗКУ

1. Викладені в інформаційному листі дані викладача кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка Гойванович Наталії Костянтинівни, отримані при виконанні дисертаційної роботи на тему: «Біохімічні механізми порушень метаболізму в тканинах тварин під впливом афлатоксину В₁ та їх корекція введенням антиоксидантів» використовуються у навчальному процесі кафедри біології та хімії біолого-природничого факультету Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка при викладанні нормативного курсу «Біохімія».
2. Інформаційний лист щодо результатів досліджень за темою дисертаційної роботи викладача кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка Гойванович Наталії Костянтинівни розглянуто і схвалено на засіданні кафедри біології та хімії (протокол №4 від 06.04.2017 р.)

Завідувач кафедри біології та хімії
Дрогобицького державного педагогічного
університету імені Івана Франка
доктор біологічних наук,
професор

М.І. Кузьмак

