

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ХАТІБ ІХАБ

УДК: 502/504:(597.551:591.1)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АДАПТАЦІЇ
КОРОПОВИХ РИБ НА ПРИКЛАДІ *DANIO RERIO* ДО ВПЛИВУ
ОРГАНОФОСФАТНИХ ТА ТРИАЗИНОВИХ ПЕСТИЦИДІВ**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ Хатіб Іхаб

Науковий керівник (консультант): доктор біологічних наук, професор
Боднар Оксана Ігорівна

Тернопіль 2024

АНОТАЦІЯ

Хатіб І. Фізіолого-біохімічні механізми адаптації коропових риб на прикладі *Danio rerio* до впливу органофосфатних та триазинових пестицидів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Тернопіль, 2024.

Органофосфатні та триазинові пестициди (включаючи інсектициди хлорпірифос, та гербіциди раундап та тербутилизин) є широко використовуваними агрохімікатами, глобальні ринки яких швидко зростають (Yang et al., 2020a). Відтак, хлорпірифос, гліфосат та тербутилазин, а також їх метаболіти, все частіше виявляються у зразках поверхневих вод, як поокремо так і в суміші, що ускладнює передбачення ефектів їх впливу на живі організми, адже більшість стандартизованих критеріїв якості води та протоколів оцінки ризику зосереджуються на токсичності окремих хімічних речовин (Albuquerque et al., 2016; Alvarez et al., 2019; Barata et al., 2006).

Вважається, що риби є ефективними біоіндикаторами довготривалих токсичних впливів та різноманітних умов середовища існування завдяки своїй рухливості, здатності до акумуляції токсикантів та відносно тривалому періоду життя. Маючи здатність до акумуляції у живих організмах, пестициди, перебуваючи навіть у незначних концентраціях у товщі води або донних відкладеннях, можуть накопичуватися в тканинах риб (Olsvik et al., 2019), викликаючи при цьому істотні порушення молекулярних та біохімічних процесів з подальшою їх проекцією на організменний та популяційний рівень, що, у віддаленій перспективі, може викликати зменшення чисельності і порушення структури популяцій, а відтак, зменшення біорізноманіття в цілому.

Риба даніо *Danio rerio* (Hamilton, 1822) широко використовується як модель у біомедичних та екотоксикологічних дослідженнях (Hollert and Keiter, 2015), у зв'язку з чим її генетика, фізіологія та розвиток добре вивчені. Багато критичних шляхів, які регулюють метаболізм, розмноження та розвиток, є висококонсервативними серед хребетних. Тому, оскільки ~ 70% генів людини мають принаймні один ортолог у геномі риби даніо (Howe et al., 2013), вона є перспективною гіпотетичною моделлю для вивчення ризиків, спричинених пестицидами, для здоров'я людини та навколишнього середовища (Hollert and Keiter, 2015). Саме це спонукало нас використати *D. rerio* як модельний вид для оцінки біологічних ефектів і молекулярних механізмів токсичності широко використовуваних та детектованих у середовищі пестицидів (раундапу, хлорпірифосу, малатіону та тербутилазину) та їх сумішей.

Незважаючи на те, що використані нами концентрації органофосфатних (раундап: 15 мкг/л та 500 мкг/л; хлорпірифос: 0,1 мкг/л та 3,0 мкг/л; малатіон: 5,0 мкг/л та 50,0 мкг/л) та триазинового (тербутилазин: 2,0 мкг/л та 30,0 мкг/л) гербіцидів та інсектицидів були значно нижчі, ніж зазвичай використовують в екотоксикологічних експериментах, вони відповідали їх фоновому вмісту у водоймах. Як результат, ми виявили палітру деструктивних змін на молекулярному та клітинному рівнях у коропоної риби даніо, дотичних до окисного стресу, ендокринних порушень, імунно- та цитотоксичності, які за умов хронічного впливу можуть мати незворотні наслідки на стан функціональних систем організму та призводити до загибелі особин.

Показано роль окисного стресу як важливого токсичного механізму та клітинної відповіді за впливу раундапу (гліфосат), хлорпірифосу та їх сумішей в екологічно реальних концентраціях. Досліджувані пестициди та їх суміші викликали у даніо пригнічення антиоксидантів, надлишкове вироблення активних форм кисню, накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів і підвищений рівень фрагментації ДНК. Хлорпірифос був значно токсичнішим, ніж раундап, і додатково викликав нітрозативний і

карбонільний стрес. У групах тербутилазину і малатіону ознаки окисного стресу поєднувалися із порівняно більш інтенсивними процесами апоптозу та аутофагії, що, водночас, забезпечувало в експонованих тварин більш ефективне виведення продуктів окисного ушкодження, зокрема фрагментованих молекул ДНК. Прояви окисного стресу, особливо активні за впливу хлорпиріфосу та тебутилазину, зумовлювали на рівні організму розвиток ознак гепато- та нейротоксичності.

За сумою ознак, раундап продемонстрував стимуляцію клітинних захисних механізмів за впливу низьких концентрацій, які, однак, були нівельовані за комбінованого впливу пестицидів, зокрема у присутності хлорпиріфосу. Це означає, що індукований раундапом гормезис малоімовірний під час типового впливу агрохімічних сумішей на навколишнє середовище.

Досліджувані нами пестициди проявляли помірні ознаки ендокрин-дизруптивної дії. Найбільш істотні докази ендокринних порушень спостерігалися за сумісного впливу тербутилазину і малатіону, однак обмежувалися інтенсивністю вітелогенезу та функціонуванням гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковою осі, з незначним впливом або його відсутністю на гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову та гіпоталамо-гіпофізарно-щитоподібну осі. Зважаючи на приналежність тербутилазину до класу хлоротриазинів, до яких належить атразин (відомий ендокрин-дизраптор) відсутність істотних розладів гормонального дзеркала вказує на його потенційні переваги використання, як замісника атразину.

Пошкодження мітохондрій і лізосом можна віднести до неспецифічних ознак впливу досліджуваних органофосфатних пестицидів та тербутилазину, які, у свою чергу, формують умови для розвитку метаболічних розладів та енергодефіциту. Зважаючи на те, що мобілізація захисних механізмів в умовах стресу є енергоємним процесом, енергодефіцит може бути лімітуючим фактором виживання особин в умовах зростаючого антропогенного стресу.

Зазначимо, що комбіновані ефекти досліджуваних пестицидів для смугастого даніо мали характер антагонізму. Логічно припустити, що в таких випадках ефекти поокремих пестицидів, які входять до складу сумішей, можна спрогнозувати на основі окремих ефектів більш токсичного пестициду. Для хлорпірифосу це відповідає дійсності, однак у випадку тербутилазину та його поєднання з малатіоном призводить до виникнення ознак, які не були характерні для індивідуальної їх дії. Кілька нещодавніх робіт щодо адитивних або синергічних ефектів сумішей пестицидів, включаючи суміші фосфорорганічних кислот / карбаматів і фосфорорганічних кислот / купрум сульфатів (Heys et al., 2016; Laetz et al., 2009; Weeks Santos et al, 2021) показали, що антагоністичні взаємодії не можна поширювати на всі пестициди та, з іншого боку, варто передбачати очікувані ефекти сумішей за більш токсичним компонентом. Тому, навіть, якщо моніторинг більш токсичних пестицидів (таких як хлорпірифос) може бути виправданим, коли ресурси обмежені, то майбутні оцінки токсичності пестицидних сумішей на основі біологічного аналізу є необхідними для визначення рівня ризиків для навколишнього середовища і здоров'я, та повинні зосереджуватися на найбільш релевантних біомаркерах, такі як окислювальний стрес, гепато- та нейротоксичність.

Таким чином, на підставі застосування методів машинного навчання нами визначено мінімальний набір показників для оцінки ризиків пестицидного забруднення для нецільових організмів, який включає на першому етапі показники імунної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін Vtg), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (LDH), з подальшою деталізацією оцінки функціонального стану організму на підставі визначення показників окисного стресу (ТБК-АП, Nrf2, загальної антиоксидантної здатності, GSSG), стрес-гормону кортизолу та ключового ензиму апоптозу Cas3.

Ключові слова: гідробіонти, коропові риби, *Danio rerio*, біохімічні показники, метаболізм, окисний стрес, цитотоксичність, водні полютанти,

органофосфатні та триазинові пестициди, якість та безпечність гідроекосистем, математичне моделювання, багатофакторний аналіз.

ABSTRACT

Khatib I. Physiological and biochemical adaptation mechanisms of cyprinids to the effects of organophosphate and triazine pesticides on the example of *Danio rerio* – Qualifying scientific work, rights as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology. – Ternopil Volodymyr Hnatyuk National Pedagogical University, Ternopil, 2024.

Organophosphate and triazine pesticides (including insecticides such as chlorpyrifos and herbicides such as roundup and terbuthylazine) are widely used agrochemicals, the share of which on global markets is rapidly growing (Yang et al., 2020). Consequently, chlorpyrifos, glyphosate, terbuthylazine and their metabolites are being increasingly detected in surface water samples, both separately and in mixtures, making it difficult to predict the exposure effect for living organisms, hence most standardised water quality criteria and risk assessment protocols focus on toxicity of each chemical individually (Albuquerque et al., 2016; Alvarez et al., 2019; Barata et al., 2006).

Fish are believed to be fine bioindicators of long-term toxic effects and diverse habitat conditions due to their mobility, ability to accumulate toxicants, and relatively long life span. Pesticides, given their ability to stockpile in living organisms, can accumulate in fish tissues even when being in low concentrations in the water column or sediments (Olsvik et al., 2019), which causes significant disruption of molecular and biochemical processes in fish. Subsequently, this projects on the organism and population levels, which in the long term can cause a decrease in population size and, consequently, shrink biodiversity in general.

Danio rerio fish (Hamilton, 1822) is widely used as a model organism in biomedical and ecotoxicological research (Hollert and Keiter, 2015), hence its genetics, physiology and development are well understood. As many critical metabolic, reproductive and developmental pathways are highly conserved among

vertebrates (e.g., ~70% of human genes have at least one ortholog in *D. rerio* genome (Howe et al., 2013)), this fish can be used to study pesticide risks to human health and environment (Hollert and Keiter, 2015). Therefore, we use *D. rerio* as a model organism to assess the biological effects and molecular mechanisms of toxicity of commonly used and detected pesticides (roundup, chlorpyrifos, malathion and terbuthylazine) and their mixtures.

Despite the fact that the chosen concentrations (Roundup: 15 µg/L and 500 µg/L; chlorpyrifos: 0.1 µg/L and 3.0 µg/L; malathion: 5 µg/L and 50 µg/L) and triazine (terbutylazine: 2 µg/L and 30 µg/L) of organophosphate herbicides and insecticides were significantly lower than those commonly used in ecotoxicological experiments and corresponded to their background levels in water bodies, we found a palette of destructive changes at the molecular and cellular levels in the carp fish *Danio*, related to oxidative stress, endocrine disorders, immuno- and cytotoxicity, which, under conditions of chronic exposure, can obviously have irreversible effects on the body systems and lead even to death.

We established the role of oxidative stress as an important toxic mechanism and cellular response under the influence of Roundup (glyphosate), chlorpyrifos and their mixtures in ecologically real concentrations. The researched pesticides and their mixtures caused inhibition of antioxidants, excessive production of reactive oxygen species, accumulation of lipid peroxidation products and increased DNA fragmentation. Chlorpyrifos was significantly more toxic than Roundup and additionally caused nitrosative and carbonyl stress. In groups of terbutylazine and malathion, the signs of oxidative stress were combined with relatively more intensive processes of apoptosis and autophagy, which ensured more efficient removal of oxidative damage products, particularly of fragmented DNA molecules, in the animals exposed thereto. The manifestations of oxidative stress, especially significant under the influence of chlorpyrifos and terbuthylazine, at the organism level causes development of signs of hepatotoxicity and neurotoxicity.

In summary, Roundup demonstrated stimulation of cellular defence mechanisms at low concentrations, which was, however, levelled out by combined exposure to pesticides in presence of chlorpyrifos, meaning that Roundup-induced hormesis is unlikely to occur during typical environmental exposure to agrochemical mixtures.

The pesticides we studied demonstrated moderate signs of endocrine disrupting effects. The most significant evidence of pesticide-induced endocrine disruption was observed in the case of combined exposure to terbutylazine and malathion, but was limited to vitellogenesis and the HPA axis, with little or no effect on the HPI or HPT axis. Given terbutylazine's belonging to the chlorotriazine class, which includes atrazine, a known endocrine disruptor, the absence of significant hormone mirror disorders indicates the advantages of using terbutylazine as an atrazine substitute.

The damage to mitochondria and lysosomes can be attributed to nonspecific signs of exposure to organophosphate pesticides and terbutylazine, which, in turn, create prerequisites for metabolic partitioning and energy deficit. Given that the mobilisation of defence mechanisms under stress is an energy-intensive process, energy deficit may be a limiting factor in the survival of individuals under increasing anthropogenic pressure.

The combined effects of the studied pesticides on *D. rerio* were antagonistic. In such cases, the effects of individual pesticides in mixtures can be predicted on the basis of the individual effects of the more toxic pesticide. This is true for chlorpyrifos, but in the case of terbutylazine and its combination with malathion, the resulting symptoms are not characteristic of the individual effects of the chemicals. Several recent reports have shown additive or synergistic effects of pesticide mixtures, including mixtures of organophosphates/urea and organophosphates/copper sulphate (Heys et al., 2016; Laetz et al., 2009; Weeks Santos et al, 2021), which means that antagonistic interactions cannot be overgeneralised, and that the expected effects of a mixture cannot be predicted by the more toxic component. Even though monitoring of more toxic pesticides (such

as chlorpyrifos) might be justified in limitation of resources, future bioassays of toxicity of pesticide mixtures will improve environmental and health risk assessment by focusing on the most relevant biomarkers, such as oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity.

By using machine learning methods, we identified an optimal set of biomarkers, that includes immune indicators (IgM), indicators of endocrine disorders (vitellogenin Vtg), indicators of DNA repair (RAD51) and cytotoxicity indicators (LDH), to evaluate the risks of pesticide exposure of non-target organisms and to assess the organism through determination of oxidative stress indicators (TBA-AP, Nrf2, total antioxidant capacity, GSSG), stress hormone cortisol and the key apoptosis enzyme Cas3.

Keywords: hydrobionts, carp fish, *Danio rerio*, biochemical parameters, metabolism, oxidative stress, cytotoxicity, water pollutants, organophosphate and triazine pesticides, quality and safety of hydroecosystems, mathematical modeling, multivariate analysis.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Khatib, I.**; Horyn, O.; Bodnar, O.; Lushchak, O.; Rychter, P.; Falfushynska, H. Molecular and Biochemical Evidence of the Toxic Effects of Terbutylazine and Malathion in Zebrafish. *Animals*. **2023**, 13, pp 1029. <https://doi.org/10.3390/ani13061029>
2. **Khatib, I.**; Rychter, P.; Falfushynska, H. Pesticide Pollution: Detrimental Outcomes and Possible Mechanisms of Fish Exposure to Common Organophosphates and Triazines. *J. Xenobiot.* **2022**, 12, pp 236-265. <https://doi.org/10.3390/jox12030018>
3. Falfushynska, H.; **Khatib, I.**; Kasianchuk, N.; Lushchak, O.; Horyn, O.; Sokolova, I. M. Toxic Effects and Mechanisms of Common Pesticides (Roundup and Chlorpyrifos) and their Mixtures in a Zebrafish Model (*Danio Rerio*). *Sci Total Environ.* **2022**, 10 (833), pp 155236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155236>
4. Bodnar, O., Horyn, O., **Khatib, I.**; Falfushynska, H. Multibiomarker Assessment in Zebrafish *Danio Rerio* after the Effects of Malathion and Chlorpyrifos. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **2021**, 13, pp 165–174. <https://doi.org/10.1007/s13530-021-00099-1>
5. Боднар, О. І.; **Хатіб, І.**; Горин, О. І.; Сорока, О. В.; Німко, Х. І.; Чернік, І. В.; Ковальська, Г. Б.; Фальфушинська, Г. І. Прояви окисного стресу та метаболічних порушень у *Danio rerio* за дії фосфоорганічних пестицидів. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* **2021**, № 3-4 (82). С. 43-49. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.21.4.5>
6. Горин, О. І.; **Хатіб, І.**; Ковальська, Г.Б.; Познанський, Д. В.; Чернік, І. В.; Боднар, О. І. Вплив екологічно реальних та субтоксичних концентрацій малатіону на нетаргетні організми (на прикладі *Danio Rerio*). *Екологічні*

науки. **2022**, № 4 (43). С. 208-213. <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2022.eco.4-43.35>

7. Боднар, О. І.; Сенько, С. В.; Осипенко, І. О.; **Хатіб, І.**; Касянчук, Н. М.; Фальфушинська, Г. І. Вивчення ефективності хлорелищодо зменшення цитотоксичних проявів у смугастого данію за впливу органофосфатних пестицидів. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* **2020**, № 3-4 (80), С. 62–72. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.20.3-4.8>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Khatib, I.**; Zhuk, A. D.; Kovalska, H. B.; Chernik, I. V.; Horyn, O. I.; Bodnar, O. I. Lysosomal alterations in organophosphate-exposed (Roundup, chlorpyrifos and their mixtures) zebrafish. *All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*. Kyiv, June 15-17. **2022**, p 128.
2. Falfushynska, H.; Bodnar, O.; **Khatib, I.**; Kovalska, H.; Hulyk S. Zebrafish as a suitable model for studying the mode of action and harmfulness of organophosphate pesticides. *E3S Web of Conferences*. EDP Sciences, **2021**, 280. p 11005. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128011005>
3. Falfushynska, H.; **Khatib, I.**; Bodnar, O.; Horyn, O.; Kasianchuk, N. Oxidative damage in zebrafish exposed to environment realistic concentrations of roundup and chlorpyrifos. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management : 21st International Multidisciplinary Scientific Geoconference: Ecology, Economics, Education and Legislation, SGEM 2021 (Albena16 August 2021 through 22 August 2021)*. **2021**, 21 (5.1), pp 159-166. <https://doi.org/10.5593/sgem2021/5.1/s20.043>
4. Німко, Х. І.; **Хатіб, І.**; Горин, О. І.; Ковальська, Г. Б. Вплив фосфорорганічних пестицидів на стресочутливі системи смугастого Данію. *XI Всеукраїнська конференція «Молоді вчені 2021 – від теорії до*

практики» (25 березня 2021 р.), Національна металургійна академія України, м. Дніпро (Україна). 2021, С. 195-199.

5. Боднар, О. И.; Горин, О. И.; Сорока, О. В.; **Хатиб, И.**; Фальфушинская, Г. И. Оценка воздействия раундапа и малатиона на метаболический статус *Danio rerio*. *International Scientific and Practical Conference GLOBAL CHALLENGES OF THE 21ST CENTURY AND THE ENVIRONMENT* dedicated to the 10th anniversary of the UNESCO Chair for Sustainable Development within the framework of the 30th anniversary of independence of the Republic of Kazakhstan Almaty, Kazakhstan, 2-3 of December **2021**, С. 104-106.

Охоронні документи на об'єкти інтелектуальної власності

1. Деклараційний патент на корисну модель (заявка № u2021 02664) C02F 3/00, C02F 1/00, C02F 3/34 Спосіб оцінки коригуючої здатності мікрководоростей щодо забруднення середовища пестицидами / Горин О.І., Фальфушинська Г.І., Боднар О.І., Ковальська Г.Б., **Хатиб І.** №. UA 149979 U; заявл 05.05.2021; опубл. 22.12.2021. Бюл. № 51.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1 Просторове поширення широко використовуваних пестицидів у водоймах	25
1.2. Біоаккумуляція органофосфатних та триазинових пестицидів в організмі риб	31
1.3. Вплив органофосфатних та триазинових пестицидів на риб	36
1.3.1. Окисний стрес як основний неспецифічний негативний наслідок впливу органофосфатних та триазинових пестицидів на риб	38
1.3.2. Карбонільний стрес як одна з ознак впливу пестицидами у риб	43
1.3.3. Нітрозативний стрес у риб, спричинений пестицидами	45
1.3.4. Імуномодуючі та запальні ефекти органофосфатних та триазинових пестицидів	47
1.3.5. Мітохондріальна та лізосомальна токсичність досліджуваних пестицидів	50
1.3.6. Ендокринні розлади, спричинені пестицидами	53
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	61
2.1. Умови утримання тварин	61
2.2. Біохімічні методи дослідження	63
2.2.1. Показники антиоксидантно-прооксидантної системи	63
2.2.2. Цито- та нейротоксичність	65
2.2.3. Маркери апоптозу та аутофагії	67
2.2.4. Показники метаболічного стану та біотрансформації	68
2.2.5. Маркери ендокринних розладів	68
2.2.6. Полімеразна ланцюгова реакція (RT-PCR)	69
2.3. Математичні методи обробки даних	69
РОЗДІЛ III. АНАЛІЗ РЕАКЦІЙ МОЛЕКУЛЯРНИХ СТРЕСОРНИХ СИСТЕМ, ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА МЕТАБОЛІЧНОЇ ВІДПОВІДІ У ТКАНИНАХ ДАНІО ЗА ВПЛИВУ РАУНДАПУ ТА ХЛОРПІРИФОСУ	71
3.1. Стан системи антиоксидантного захисту печінки даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу	72
3.2. Стан лізосом та мітохондрій гепатоцитів даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу	77
3.3. Стан імунної, гормональної та біотрансформаційної систем даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу	81

3.4. Прояви цито- та генотоксичності у тканинах даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу	83
3.5. Експресія таргетних генів у печінці даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу	85
3.6. Інтегральний аналіз реакцій даніо до впливу раундапу та хлорпірифосу	89
РОЗДІЛ IV. МУЛЬТИБІОМАРКЕРНА ОЦІНКА СТРЕСОРНИХ СИСТЕМ, ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА МЕТАБОЛІЧНОЇ ВІДПОВІДІ У ТКАНИНАХ ДАНОЮ ЗА МАЛАТІОНУ ТА ТЕРБУТИЛАЗИНУ	93
4.1. Вплив тербутилазину та малатіону на систему антиоксидантного захисту даніо	94
4.2. Інтенсивність метаболічних процесів у печінці даніо за впливу тербутилазину та малатіону	101
4.3. Експресія таргетних генів печінки даніо за впливу тербутилазину та малатіону	103
4.4. Вплив тербутилазину та малатіону на морфологічні та функціональні характеристики лізосом гепатоцитів даніо	108
4.5. Прояви цито- та генотоксичності у даніо за впливу тербутилазину та малатіону	109
4.6. Інтегральний аналіз реакцій даніо до впливу тербутилазину та малатіону в екологічно-реальних та субтоксичних концентраціях	111
РОЗДІЛ V. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	115
5.1. Окисний стрес – як домінантна реакція коропової рибки даніо на вплив гербіцидів та інсектицидів класу орґанофосфатів та триазинів	117
5.2. Дегенеративні зміни мітохондрій та лізосом гепатоцитів даніо як ознаки впливу гербіцидів та інсектицидів класу орґанофосфатів та триазинів	128
5.3. Прояви цито- та генотоксичності даніо за впливу гербіцидів та інсектицидів класу орґанофосфатів та триазинів	139
ВИСНОВКИ	148
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	150

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- GR – глутатіонредуктаза
GSH – глутатіон
GSSG – окиснена форма глутатіону
GST – глутатіон-S-трансфераза
АФО / ROS – активні форми кисню
ДТНБ – 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота
КАТ – каталаза
КФ – кондиційний фактор
ОМП – окисні модифікації протеїнів
ПОЛ – Перекисне окиснення ліпідів
СОД – супероксиддисмутаза
ТБК-АП – ТБК-активні продукти
АХЕ / АСhE – ацетилхолінестераза
АСТ – аспартатамінотрансфераза
АЛТ – аланінамінотрансфераза
ГОТ – глутамат-оксалацетат-трансфераза
ГПТ – глутамат-піруват-трансфераза
ЛДГ – лактатдегідрогеназа
МДА – малоновий діальдегід
ЄС – Європейський союз
НОЕС – максимальна непошкоджуюча концентрація / No Observed Effect Concentration
ЛОЕС – мінімальна відзначена ефективна концентрація / Lowest Observed Effect Concentration
LC₅₀ – смертельна доза 50 % / Lethal Concentration, 50 %
ДДТ – дихлордифенілтрихлоретану ()
АМФК – аміно-метил-фосфонова кислота ()
BCF – коефіцієнта біоконцентрації ()
BAF – фактор
НРА – гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова вісь hypothalamic-pituitary-adrenal axis
НРІ – гіпоталамо-гіпофізарно-міжниркова вісь / hypothalamic-pituitary-interrenal axis
НРТ – вісь гіпоталамус-гіпофіз-щитовидна залоза / hypothalamus-pituitary-thyroid axis

ВСТУП

Забруднення водою набуває загрозливих масштабів і зумовлює небезпеку як для водних організмів так і для людей (Backhaus et al, 2019; Borgwardt та ін., 2019). Згідно даних порталу Statista (2023) щорічно від наслідків, спричинених забрудненням середовища, у тому числі і водного, помирає більше 8 мільйонів людей. Пестициди потрапляють у водне середовище через їх інтенсивне використання у сільському господарстві та побуті, і, як наслідок, вже сьогодні приблизно 64% сільськогосподарських вододілів у всьому світі знаходяться під загрозою забруднення пестицидами (Tang et al., 2021). Згідно з даними Worldometer (2022) наразі у світі щорічно використовується близько 4 млн тон пестицидів, а Китай, США, Бразилія, Аргентина, Канада, Україна, Франція, Малайзія, Австралія та Іспанія належать до ТОП-10 країн щодо їх використання.

Органофосфонатні та триазинові пестициди (включаючи інсектициди, такі як хлорпірифос, і гербіциди, такі як раундап та тербутилзин) є широко використовуваними агрохімікатами, глобальні ринки яких швидко зростають (Yang et al., 2020a). Відтак, хлорпірифос, гліфосат і тербутилазин та їх метаболіти все частіше виявляються у зразках поверхневих вод, особливо в сезони піку агротехнічної активності (Albuquerque et al., 2016; Alvarez et al., 2019; Bortoluzzi et al., 2007; Phillips et al., 2007). Так, хлорпірифос у кількості понад 0,05 мкг/л було виявлено в 97% зразків поверхневих вод центрального Техасу (США) (Banks et al., 2005) і в 42% проаналізованих зразків води в західному окрузі Дормаа в Гані (Fosu-Mensah et al., 2016). Типові концентрації хлорпірифосу у поверхневих водах регіонів з інтенсивним сільським господарством коливаються від 0,005 до 10,8 мкг/л (середні концентрації близько 0,2–0,6 мкг/л) (Alvarez et al., 2019; Bortoluzzi et al., 2007). Активну сполуку раундапу, гліфосат, також часто виявляють у поверхневих водах по всьому світу. Середня концентрація гліфосату у поверхневих водах коливається від 0,13 до 42,8 мкг/л в аграрних регіонах і може досягати >164

мкг/л у стічних водах (Rendon-von Osten and Dzul-Caamal, 2017; Carles et al., 2019; HoAM, 2022).

Зі збільшенням спектру використовуваних агрохімікатів забруднення води змінюється від домінування одного активного інгредієнта до комплексного забруднення кількома субстанціями. Багато хімічних і фізичних стресорів демонструють комбіновані ефекти, які можуть бути сильнішими (синергія) або слабшими/відміними (антагонізм), ніж сума ефектів, очікуваних для певного хімічного стресора (Liess et al., 2020). Незважаючи на важливість неадитивних взаємодій сумішей забруднюючих речовин, більшість стандартизованих критеріїв якості води та протоколів оцінки ризику зосереджуються на токсичності окремих хімічних речовин (Barata et al., 2006; Van Leeuwen et al., 1996). Хоча неможливо перевірити всі можливі комбінації агрохімікатів, дослідження інтерактивних ефектів типових забруднювачів, до яких належать ТОП-20 детектованих у водоймах пестицидів, зокрема хлорпірифос, гліфосат, малатіон та тербутилазин може надати важливу інформацію для покращення оцінки екологічного ризику прісноводних екосистем, які знаходяться під хронічним антропогенним пресом. Оцінка забруднювачів на основі біологічних параметрів є особливо важливою через її вищу чутливість, менші витрати та більш істотний прогностичний потенціал порівняно з хімічним моніторингом (Dalzochio et al., 2016; Lionetto et al., 2021). Використання біомаркерів і біоіндикаторних видів тварин та рослин дає пряме уявлення про біологічно релевантні реакції на забруднювачі та пов'язані з ними небезпеки для навколишнього середовища та здоров'я (Dalzochio et al., 2016; de la Torre et al., 2007).

Вважається, що риби є ефективними біоіндикаторами довготривалих токсичних впливів та різноманітних умов середовища існування завдяки своїй рухливості, здатності до акумуляції токсикантів та відносно тривалому періоду життя (Redondo-López et al., 2022). Згідно з повідомленнями, деякі види телеост і смугастого данію мають метаболічні риси, подібні до людських,

що робить їх потенційними альтернативними кандидатами для механістичного дослідження процесів, що відбуваються у клітині, викликаних фізичними і хімічними пошкоджуючими чинниками (Trimble et al., 2006; Stipičević et al., 2015).

Риба даніо *Danio rerio* (Hamilton, 1822) широко використовується як традиційна модель у біомедичних та екотоксикологічних дослідженнях (Hollert and Keiter, 2015), у зв'язку з чим її генетика, фізіологія та розвиток добре вивчені. Багато критичних шляхів, які регулюють метаболізм, розмноження та розвиток, є висококонсервативними серед усіх хребетних. Зазначимо, що ~70% генів людини мають принаймні один спільний з даніо ортолог у геномі (Howe et al., 2013), тому вона є чудовою моделлю для вивчення спричинених пестицидами ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища (Hollert and Keiter, 2015). Саме це спонукало нас використати *D. rerio* як модельний вид для оцінки біологічних ефектів і молекулярних механізмів токсичності широко використовуваних й детектованих у середовищі пестицидів (раундапу, хлорпірифосу, малатіону та тербутилазину) та їх сумішей.

Дослідження показують, що окисний стрес, спричинений дисбалансом між утворенням активних форм кисню та здатністю антиоксидантних систем знешкоджувати ці активні сполуки, є основним механізмом токсичності пестицидів (Liu et al., 2015; Pearson and Patel, 2016; Sulukan та ін., 2017). Окисний стрес, спричинений пестицидами, може викликати ушкодження мембран, ДНК і білків (Vodnar et al., 2021), що, в свою чергу, призводить до метаболічних порушень, накопичення продуктів деструкції і, зрештою, загибелі клітин. Відтак, ми висунули гіпотезу, що вплив пестицидів на даніо спричинить окисний стрес, який, за умови виснаження захисних систем організму, призведе до накопичення продуктів окисної деструкції білків, ліпідів і ДНК. Очікувалося, що накопичені продукти окисного ушкодження призведуть до ураження лізосом та ініціації апоптозу з негативними

наслідками для функцій організму, такими як нейротоксичність, гепатотоксичність та гормональні та імунні порушення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах проекту «Розробка методології інтегральної оцінки біобезпеки забруднення оточуючого середовища пестицидами для цільових та нецільових організмів» (10.2020–12.2022), конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих учених», НФДУ, керівник – Фальфушинська Г. І. №90/02/0270 0120U104364.

Метою роботи було дослідити відповідь стресочутливих систем рибки *Danio rerio* та встановити ліміти толерантності організму до впливу фосфорорганічних пестицидів та триазинів залежно від концентрації та поєднаного впливу суміші пестицидів.

Для досягнення мети у дисертаційному дослідженні розв'язували наступні **завдання:**

1. оцінити стан антиоксидантно-прооксидантної системи коропоної риби *Danio rerio* за впливу фосфорорганічних пестицидів (раундапу, хлорпірифосу та малатіону) та триазинових (тербутилазину) в екологічно реальних та субтоксичних концентраціях на організм за умов індивідуальної та поєднаної дії;

2. визначити вплив фосфорорганічних пестицидів і триазинів на показники імунної та ендокринної системи та енергетичного забезпечення у тканинах смугастого даніо;

3. дослідити морфо-функціональні характеристики мітохондрій і лізосом даніо за умов індивідуального та поєднаного впливу фосфорорганічних і триазинових пестицидів;

4. оцінити ефективність системи антиоксидантного захисту, детоксикації та репаративних процесів у клітинах даніо за впливу фосфорорганічних пестицидів та триазинів за показниками гено- та цитотоксичності та з'ясувати межі адаптивної здатності організму даніо до їх дії;

5. за допомогою загальних статистичних лінійних моделей та методів машинного навчання визначити мінімальний набір біомаркерів для оцінки ризиків забруднення довкілля фосфорорганічними та триазиновими пестицидами для нецільових організмів та обґрунтувати переваги комплексно аналізу перед визначеннями специфічних біомаркерів їх впливу.

Об'єкт дослідження: молекулярні та фізіолого-біохімічні процеси в організмі смугастого даніо.

Предмет дослідження: вплив фосфорорганічних і триазинових пестицидів на функціональний стан ключових параметрів окисного стресу, біотрансформації ксенобіотиків, нейро-ендокринної та імунної систем, а також морфо-функціональні характеристики мітохондрій та лізосом риби даніо.

Методи дослідження: спектрофотометричні (визначення активності ферментів, концентрації продуктів окисної деструкції, морфологічних порушень структури мітохондрій та лізосом), флуоресцентні (визначення утворення активних форм кисню, окисного ушкодження ДНК), імуноферментні (вміст IgM, кортизолу, трийодотироніну), полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (визначення експресії таргетних генів), статистичні методи та методи машинного навчання (кореляційний, дисперсійний, регресійний, теплова матриця (Heat map), Дискримінантний (Partial least squares – Discriminant Analysis, PLS-DA), рендом форест Random forest).

Наукова новизна отриманих результатів. Встановлено, що у *D. rerio* окисний і карбонільний стрес поряд із розладами ендокринної та імунної систем є важливими механізмами токсичності фосфорорганічних пестицидів та триазинів. Доведено, що хлорпірифос при значно нижчих тестових концентраціях є сильнішим прооксидантом для смугастого даніо у порівнянні з раундапом відповідно до вищого рівня накопичених продуктів окисної деструкції ліпідів та протеїнів, за низкою ознак цитотоксичності (напр. вихід

лактатдегідрогенази у кров) та ураження лізосомальних і мітохондріальних мембран. Також доведено, що раундап в екологічно реальній концентрації викликає у даніо гормезисну відповідь, спрямовану на активацію захисних сил організму, знешкодження активних форм радикалів, видалення продуктів окисного ушкодження та активацію детоксикаційних процесів. Виявлено, що поєднання тербутилазину і малатіону призводить до найбільш істотного карбонільного стресу у даніо. З'ясовано, що фосфорорганічні та триазиновий пестициди викликають у даніо ознаки морфо-функціональних порушень мітохондрій та лізосом, як універсальну відповідь, незалежну від природи діючого чинника, пов'язаних із порушеннями проникності мембран, розладами ланцюга транспорту електронів, розвитком псевдо-гіпоксичного стану та надмірною генерацією активних форм кисню, які в свою чергу на вищих рівнях біологічної організації можуть проявлятися як метаболічні та імунні розлади. На підставі застосування методів машинного навчання вперше визначено мінімальний набір показників для оцінки ризиків пестицидного забруднення для нецільових організмів, який включає на першому етапі показники імунної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін Vtg), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (LDH), з подальшою деталізацією оцінки стану організму на підставі визначення показників окисного стресу (ТБК-АП, Nrf2, загальної антиоксидантної здатності, GSSG), стрес-гормону кортизолу та ключового ензиму апоптозу Cas3.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано та апробовано мінімальний набір біомаркерів організму даніо для інтегральної оцінки біобезпеки забруднення середовища пестицидами, який включає показники імунної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін Vtg), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (LDH) у тканинах смугастого даніо. За результатами розробленої схеми використання набору біомаркерів отримано патент України на корисну модель способів оцінки якості води.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проаналізовано літературні джерела за тематикою дисертаційного дослідження, здійснено підготовку та проведення експериментальних досліджень. Біохімічні методи дослідження та аналіз води проведено спільно із співробітниками НДЛ, а саме: Фальфушинською Г. І., Горин О. І., Ковальською Г. Б.

Апробація результатів роботи. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 1 патент на корисну модель, основні тези доповідались на міжнародних та всеукраїнських конференціях, зокрема:

- 21st International Multidisciplinary Scientific GeoConference (SGEM 2021), 14 - 22 August, 2021, Albena, Bulgaria.
- Second International Conference on Sustainable Futures: Environmental, Technological, Social and Economic Matters (ICSF 2021), 19 - 21 May, 2021 / Kryvyi Rih, Ukraine.
- International Scientific and Practical Conference «Global Challenges of the 21st Century and The Environment» dedicated to the 10th anniversary of the UNESCO Chair for Sustainable Development within the framework of the 30th anniversary of independence of the Republic of Kazakhstan. Almaty, Kazakhstan, 2-3 December 2021.

Публікації. За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 7 праць, в тому числі 4 статті у фахових виданнях, які індексуються у наукометричних базах даних Scopus та/або WoS, 5 матеріалів і тези доповідей на з'їздах та конференціях, 1 патент на корисну модель.

Індекс Гірша згідно з наукометричною базою даних Scopus – 4 (author ID:57223683104).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 187 сторінках комп'ютерного набору, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, отриманих результатів (2 розділи), аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних

джерел. Робота містить 38 рисунків, 5 таблиць. Бібліографічний список складає 290 джерел, з них 288 – англійською мовою.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Просторове поширення широко використовуваних пестицидів у водоймах

У липні 2022 року База даних пестицидів Європейського Союзу налічувала 1471 активну речовину, 600 з яких не були погоджені до використання в межах ЄС (EU pesticide database, 2022). З іншого боку, у країнах Східної Європи перелік дозволених пестицидів є дещо довшим. Зокрема, перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні, станом на 2022 рік містив 2176 найменувань (MEPR, 2022).

Найбільш часто застосовуваними пестицидами у Центральній та Східній Європі є гербіциди. Як зазначено у Корпоративній статистичній базі даних Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН, гербіциди, а також фунгіциди та інсектициди (до 12%) складають більш ніж 95% загального обсягу використовуваних пестицидів у Європі (FAOSTAT, 2022). Найпопулярнішими пестицидами в Україні є хлорпірифос, імідаклоприд, гліфосат, тебуконазол і тербутилазин, які складають 18,1% від усіх використаних сполук цього ряду (MEPR, 2022). Це відповідає загальносвітовому рівню використання пестицидів, що на 50% складається із гербіцидів, на 22% із інсектицидів та на 15% із фунгіцидів. Винятком є лише Африка, де інсектициди та фунгіциди, зокрема пенконазол, манкозєб, 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) та хлорпірифос – складають більшість із усіх застосованих пестицидів (Curchod et al., 2019).

Інтенсивне застосування пестицидів у галузі сільського господарства та для запобігання хворобам рослин через їх витоки з полів з та міських зон може призвести до збільшення їх присутності у різних екосистемах, зокрема, у ґрунтах, поверхневих та ґрунтових водах. На жаль, поки справджується найгірший сценарій, до прикладу, у декількох польських річках виявили

значне забруднення пестицидами. Так, у р. Варта на заході Польщі виявили 22 пестициди, що належать до фенілсечовин, сульфонілсечовин, неонікотиноїдів, хлоротриазинів, триазинів і хлорацетанілідів (межа кількісного визначення: $LOQ > 0,005$ мкг/л). Переважну частину виявлених пестицидів склали гербіциди (60%), а також фунгіциди (24%) й інсектициди (16%). У найбільших концентраціях було знайдено ізопротурон, нікосульфурон, імідаклоприд, тербутилазин, хлоротолурон, S-метолахлор і прометрин. Проте, дорадним є той факт, що навіть їх присутність у найвищих концентраціях (0,472 мкг/л) та коефіцієнт небезпеки (HQ) не перевищували допустимі, відтак, не спричиняли серйозної загрози для життя людини (Kruc-Fijałkowska et al., 2022). 95% досліджених зразків річкових донних відкладів, взятих із таких польських річок, як Вісла, Варта, Західний Буг, Нарва та Одра, а також 95% досліджених озер були забруднені поліхлорованими дифенілами (Wojakowska et al., 2005, 2014). Пестициди α -НСН (ліндан) та сполуки групи дихлордифенілтрихлоретану (ДДТ) у концентрації до 8.51 мкг/кг траплялися найбільш часто. Найбільші концентрації ліндану в досліджених озерах становили 60,7 нг/г, ДДТ – 602,9 нг/г, поліхлорованих дифенілів (ПХД) – 50,7 нг/г, тоді як середні значення для цих речовин становлять 6,3, 19,2, та 2,8 нг/г відповідно (Wojakowska et al., 2014).

Подібна ситуація спостерігається і в Німеччині та Угорщині. Так, основними забруднювачами ріки Ельби є атразин, тербутилазин, метазахлор, метолахлор, ізопротурон та хлоротолурон (Karlsson et al., 2020). Атразин, який належить до гербіцидів, було знайдено у 669 зразках, що збиралися протягом значного періоду, при цьому його концентрації перевищували LOQ у 78% усіх зразків, узятих з Ельби. Максимальні рівні атразину становили 270 мкг/л, проте він був згодом заміщений тербутилазином, найвищі концентрації якого становили 340 мкг/л (Karlsson et al., 2020). У водоймах Угорщини виявлені рівні атразину були дещо нижчими, у переважній більшості випадків становивши 100 нг/л (Székács et al., 2015). Разом з тим, у промисловому регіоні

на північно-східному краю озера Балатон в окремих випадках рівні атразину у поверхневих водах досягали 8240 нг/л, а в підземних – 7540 нг/л (Székács et al., 2015).

Тербутилазин – це один із найбільш небезпечних забруднювачів у річках Угорщини. Пестициди тербутилазин, S-метолахлор і тебуконазол мали найвищі середньозважені за часом концентрації серед виявлених у річці Драва – одній із найбільших та найважливіших річок Центральної Європи у 2018-2021 роках, досягаючи рівнів 439,83 нг/зразок (~23.5 нг/л), 1140 та 19.7 нг/зразок відповідно. У менших концентраціях (8,8-18,2 нг/зразок) було виявлено 2,4-Д, мекопроп-П та 2-метил-4-хлорфеноксоцтову кислоти (Site-specific sediment quality, 2022).

Попри те, що в європейських річках та озерах подекуди виявляються пестициди та їх метаболіти, рівні забруднення там на порядок нижчі, ніж у Сполучених Штатах, Південній Африці та Південній Америці. Зокрема, у зразках із південноафриканських річок концентрації тербутилазину (71,8 – 717,0 нг/л), ацетаміприду (11,2 – 111,7 нг/л), хлорпірифосу (0,4 – 4,2 нг/л), тіаклоприду (11,5 – 115,2 нг/л) та імідаклоприду 726,0 -7249,4 нг/л перевищували стандарти якості навколишнього середовища у 3, 5, 9, 12 та 558 разів відповідно.

У прісноводних районах басейну Амазонки було виявлено 11 пестицидів, зокрема, фосфорорганічні препарати, бензимидазол і триазини. Хлорпірифос, карбендазим, діурон, атразин і тербутилазин мали найвищі показники поширеності. Серед гербіцидів малатіон виявлявся у найвищій концентрації (535 нг/л). Присутність гербіцидів була доволі помірною, за винятком метолахлору, атразину і тербутилазину, концентрації яких становили 25-28 нг/л у міському водотоці міста Манаус. Найвищі концентрації хлорпірифосу були виявлені у зразках із Амазонки, Ріу-Негру, а також із міських водотоків Макапи (186 нг/л) та Белема (100 нг/л), тоді як концентрація хлорпірифос-метилу була доволі невеликою (Rico et al., 2022). У 97%

досліджених бразильських муніципалітетів загальні рівні пестицидів у питній воді (189,84 ppb) були значно більшими, ніж межі, встановлені в рамках ЄС (0,5 ppb) (Panis et al., 2022).

У річках Південної Африки найнижчі рівні тербутилазину у три рази перевищували середньозважені за часом концентрації цієї речовини у басейні Дунаю (Curchod et al., 2019; Site-specific sediment quality, 2022). У 2010-2011 роках найвищі концентрації були виявлені у районі міста Смедерево (200 нг/л) та в притоках Дунаю: Тисі (180 нг/л) та Мораві (130 нг/л) (Antić et al., 2015).

Гліфосат та хлорпірифос нещодавно були заборонені до використання у декількох країнах, відтак, до них прикута щільна увага наукового співтовариства. США, ФРН та Сполучене Королівство, наприклад, задекларували своє бажання поступово згорнути застосування цих речовин у найближчому майбутньому (Agathokleous et al., 2022). Однак, за прогнозами, до кінця 2026 року світовий ринок гліфосатів збільшиться до 8,9 млрд. дол. США, не припиняючи зростати і у 2027 році (Glyphosate Market, 2022). Однак, попри те, що загальне зростання обсягів гліфосату у продажу можна спроєктувати, про обсяги присутності цієї речовини та амінометилфосфонові кислоти (АМФК) у водоймах ЦСЄ насправді відомо доволі мало.

Загальна концентрація гліфосату у довільно відібраних зразках із різних водоочисних станцій на території Великопольського воєводства Польщі варіювала від 0,07 до 0,31 мкг/л, що у тисячі разів нижче за максимально допустимі норми денного споживання цієї речовини (Kaszkowiak et al., 2021). Концентрація гліфосату в зразках із ріки Рейн варіювала від 25 до 55 нг/л, тоді як рівні метаболіту гліфосату АМФК коливалися від 55 до 65 нг/л (Hanke et al., 2008). Концентрація гліфосату в гіполімніоні озер Муртензес та Грайфензес становили 15 та 35 нг/л відповідно. В обох озерах концентрації АМФК були дещо вищими, приблизно 60 нг/л (Hanke et al., 2008).

Найнижчі концентрації гліфосату (0,025 – 0,042 мкг/л) у поверхневих водах були виявлені у Канаді та Швейцарії (Poiger et al., 2017; Van Stempvoort

et al., 2014, 2016). У той самий час, припускають, що у певних європейських країнах, на кшталт Франції та Італії, концентрація гліфосату у поверхневих водах є дещо вищою. Найвищі концентрації гліфосату у зразках води становили 260 нг/л, у річкових відкладах – 15 нг/л, та 7 нг/л – у суспендованих твердих частинках (Feltracco et al., 2022). Гліфосат та АМФК є одними з найбільш поширених забруднювачів у французьких річках, їхні обсяги досягають 164 та 558 мкг/л відповідно (Carles et al., 2019).

Із деякими винятками, відповідно до наявних даних, концентрації гліфосату та АМФК в Європі на порядок нижчі, ніж у США та Південній Америці. Зокрема, у 2015-2017 роках у Сполучених Штатах гліфосат був виявлений у 74% зразків із міських водотоків, АМФК – у 90% зразків, при цьому максимальні їх показники становили 6,08 та 5,07 мкг/л відповідно, що приблизно у 20 разів більше, ніж у Європі. Максимальні середньорічні середньозважені за часом концентрації становили 1,39 мкг/л для гліфосату та 2,55 мкг/л для АМФК (Medalie et al., 2020). Подібна ситуація спостерігається і в Аргентині, яку часто звинувачують у використанні значних кількостей пестицидів, зокрема, 240 тис. тонн гліфосату щорічно. Відтак, гліфосат та АМФК було знайдено у всіх досліджених зразках аргентинських водойм та ґрунтів (Avila-Vazquez et al., 2018). Концентрація гліфосату у воді варіювала від 0,1 до 0,7 мкг/л, тоді як у донних відкладах та седиментах – між 0,5 та 5 мг/кг. Концентрації гліфосату також були найвищими серед усіх досліджених сполук (3868 ppb), що на кілька порядків перевершує показники інших пестицидів: ендосульфану II (337,7 ppb) та хлорпірифосу (242 ppb) (Avila-Vazquez et al., 2018; Peruzzo et al., 2008). Найвищі рівні виявлення мали місце у зразках із донних відкладень у водотоках (гліфосат – 95%, АМФК – 100%), менше у поверхневих водах (гліфосат – 28%, АМФК – 50%), найменше – у ґрунтових водах (гліфосат – 24%, АМФК – 33%) (Okada et al., 2018).

Хлорпірифос часто можна знайти у фруктах, овочах та питній воді, проте його присутність у європейських водоймах дуже часто незаслужено

ігнорують. Це попри те, що в багатьох країнах уже прийнято законодавчі матеріали, що обмежують застосування цієї речовини. До прикладу, країни-члени ЄС були зобов'язані відкликати дозволи на використання пестицидів, що містять хлорпірифос або хлорпірифос-метил до 2020 року (Corrigendum to Commission Regulation, 2022). Нещодавно стало відомо, що вміст хлорпірифосу в донних відкладеннях річки Ебро (Іспанія) у концентраціях у межах 0,18-36,17 нг/г був найвищим серед усіх 9 виявлених пестицидів. Зразки води з суміжних ділянок також містили хлорпірифос у концентраціях до 16,4 нг/л (Ссанссара et al., 2022). Концентрація хлорпірифосу в річці Ебро відповідає такій у річці Святого Лаврентія (Канада), < 0,006 мкг/л (Canadian Water Quality, 2022). Проте, в інших частинах Канади, зокрема, у природничому Тихоокеансько-юконському регіоні та в районі Онтаріо, рівень хлорпірифосу був на порядок вищим. У приблизно 40% із 300 взятих зразків води було знайдено хлорпірифос. Концентрації варіювалися від межі виявлення до 0,205 мкг/л (Canadian Water Quality, 2022). Подібна ситуація спостерігалася і в Чилі, Новій Зеландії та Південній Азії. Зокрема, хлорпірифос було виявлено всього у 30% досліджених зразків у каналі Ла Брас (Чилі) під кінець літнього сезону, при цьому найвищі концентрації становили $0,183 \pm 0,065$ мкг/л (Climent et al., 2016), тоді як концентрації всіх інших пестицидів сумарно не перевищували 20 мкг/л. В озері Чиліка та річці Тапі, що є одними з найбільш забруднених регіонів в Чилі, рівень хлорпірифосу становив 2,73 та 0,27 мкг/л відповідно (Sarker et al., 2021).

Таким чином, рівні забрудненості водойм ЦСЄ пестицидами є доволі високими, зокрема в країнах із великим аграрним сектором. Попри те, що на європейські країни дуже часто покладають провину за забруднення поверхневих та ґрунтових вод пестицидами, аналогічні показники у Північній та Південній Америках, Азії та Південній Африці є вищими. Органофосфати (хлорпірифос, гліфосат), фенілсечовини (наприклад, хлоротолурон), триазини (наприклад, тербутилазин) та неонікотиноїди належать до найуживаніших та

найпоширеніших у водному середовищі пестицидів по всьому світу. Забруднення пестицидами є проблемою світового рівня, що здатна спричинити вельми несприятливі наслідки третім сторонам – людям і водній живності. Відтак, необхідним є не лише постійний моніторинг концентрації та залишків пестицидів, а також встановлення потенційних біомаркерів раннього виявлення, що допоможе на ранніх стадіях визначити згубний вплив ксенобіотиків на екосистеми та людину, поки повне відновлення все ще залишається можливим.

1.2. Біоаккумуляція органофосфатних та триазинових пестицидів в організмі риб

Маючи здатність до акумуляції у живих організмах, пестициди навіть у незначних концентраціях у товщі води або донних відкладеннях можуть накопичуватися в тканинах риб (Olsvik et al., 2019). Накопичення пестицидів у водних тваринах може відбуватися двома основними шляхами, а саме, прямим поглинанням пестицидів з води та поглинанням їх через забруднену їжу (Gunkel et al., 1980). Так, швидкість накопичення фосфорорганічних пестицидів у прісноводних риб є вищою, ніж у морських (Liu et al., 2010). Крім того, молюски менш схильні до накопичення пестицидів, ніж риби, хоча метали вони накопичують активніше (Liu et al., 2010).

Ліпофільність/гідрофобність пестицидів та $\log K_{ow}$ (коефіцієнт розподілу n-октанол-вода) належать до найважливіших факторів, що визначають швидкість накопичення пестицидів у живих організмах. Загалом, $\log K_{ow} < 3$ характеризує пестициди, які не є жиророзчинними, $\log K_{ow} = 3-4$ класифікує пестициди з амфіфільними властивостями, а $\log K_{ow} > 4$ визначає ліпофільність пестицидів. Також, якщо $\log K_{ow} > 4$, пестициди накопичуються переважно у жировій фракції (Noble et al., 19903). Так, значення $\log K_{ow}$ для хлорпірифосу становить 4,9, що дозволяє розглядати хлорпірифос як речовину здатну до

біоаккумуляції в тканинах тварин (Vighi and Di Guardo, 1995). З іншого боку, високотоксичні та стійкі триазинові пестициди, зокрема, симазин ($\log K_{ow} = 2,3$), атразин ($\log K_{ow} = 2,7$), тербутилазин ($\log K_{ow} = 3,4$) і малатіон ($\log K_{ow} = 2,18 \div 3,06$), а також широко використовуваний фосфорорганічний пестицид гліфосат ($\log K_{ow} = -1,7 \div 1,67$) мають нижчі значення $\log K_{ow}$, що свідчить про низькоафінне накопичення безпосередньо в клітинах (Finizio et al., 1997; Ronka et al., 2016). Після накопичення хлорпірифос і атразин виводяться переважно нирками (Kamrin, 1997). У процесі катаболізму їх гідроксильовані, N-деалкільовані, окислені та кон'юговані метаболіти, включаючи 3,5,6-трихлорпіридин-2-фенол, діетилфосфат та діетилтіофосфат, виводяться із сечею (Kamrin, 1997). Так, метаболіти атразину значно менш небезпечні, ніж вихідна молекула, а їх концентрації у навколишньому середовищі зазвичай не є шкідливими для живих організмів (Stratton, 1984).

Існує обґрунтоване припущення щодо лінійної залежності коефіцієнта біоконцентрації (BCF) та/або $\log BCF$, та $\log K_{ow}$. Однак, фізіологічні особливості конкретного виду організму можуть впливати на акумуляцію, розкладання та виведення пестициду, а також пояснюють відхилення значення BCF від прогнозованого (Katagi et al., 2010). У зв'язку з цим були запропоновані уточнені рівняння накопичення фосфорорганічних пестицидів у молюсках на основі таких вихідних даних: $\log BCF = 0,543 \log K_{ow} - 0,436$ ($r^2 = 0,438$, $n = 17$) та $\log BCF = -0,106 (\log K_{ow} - 5,66)^2 + 2,11$ ($r^2 = 0,471$, $n = 17$) (Katagi et al., 2010).

Нещодавно з'явилися дані щодо забруднення організмів трьох видів риб: кефалі (*Liza aurata*), каспійської білої риби (*Rutilus kutum*) та коропа звичайного (*Cyprinus carpio*) – діазиноном, малатіоном та азинфос-метилом у п'ятьох гирлах річок на Каспійському морі-озері (Іранське узбережжя). Відповідні діапазони концентрацій були визначені як 0,01-0,16, 0,01-0,15 і 0,05-0,36 мг/кг відповідно, що, однак, лише трохи нижче за допустимий рівень для їстівної риби (Golshani et al., 2020).

Крім того, риба *Jenynsia multidentata* була здатна накопичувати хлорпірифос у своїх тканинах у такому порядку: кишечник > печінка > зябра, а BCF знаходився в діапазоні від 133 до 212 мкг/кг, що підкреслює здатність хлорпірифосу до біоконцентрації в тканинах риби (Bonansea et al., 2017). Однак, на відміну від пізніших досліджень, значно вищий рівень хлорпірифосу (0,463 мкг/кг) був виявлений у рибі, вирощеній тайванськими рибними господарствами в період з 2002 по 2004 рік (Sun and Chen, 2008). Так, у тканинах зі зразків, відібраних в Азії, концентрації фосфорорганічних пестицидів були співрозмірними з хлорорганічними пестицидами. Наприклад, середня концентрація ДДТ, гексахлорциклогексану, ендосульфану, хлордану та гексахлорбензолу у всіх зразках риби та молюсків з провінції Ляонін, КНР, у 2007 році становила 15,41, 0,84, 1,31, 1,05 та 0,63 мкг/кг відповідно (Liu et al., 2010).

Фактори біоаккумуляції (BAF) або навіть біоконцентрації (у випадку трофічних ланцюгів) є значущими показниками накопичення пестицидів у живих організмах. Однак значення BAF/BCF суттєво різняться не тільки між спорідненими видами, а й також між результатами польових і лабораторних експериментів і в умовах *in vivo/in vitro*. Крім того, фактори біоаккумуляції у комерційних рецептурах (препаративних формах) пестицидів є вищими, порівняно з основною діючою речовиною. Вищенаведене підтверджується даними Bonansea та ін., які виявили, що BCF хлорпірифосу в печінці риб *Jenynsia multidentata*, що зазнали впливу комерційної препаративної форми пестициду із допоміжними речовинами, була вищою, ніж значення, отримане у риб, які зазнали впливу хлорпірифосу окремо (Bonansea et al., 2017). Із цього випливає питання, чи можна послабити імовірну токсичність пестициду для живих організмів шляхом застосування певного ад'юванту, який зменшує поглинання пестициду нецільовими організмами. Подібні дослідження є дуже перспективними у галузі лікування раку як багатообіцяючий засіб підвищення

ефективності протиракових препаратів за рахунок проникності клітинних мембран (Zalba and Ten Hagen, 2017; Schweizer, 2019).

Як було показано, BCF та фактори, що впливають на нього, суттєво різняться у популяціях. Зокрема, коефіцієнт біоконцентрації хлорпірифосу, розрахований для всеїдно-планктоїдної риби-кіллі *Jenynsia multidentata*, варіювався від низьких значень (25 ± 16 і 35 ± 19 у м'язах і зябрах відповідно) до високих (1024 ± 593 у печінці) (Bonansea et al., 2017). В інших видах риб для хлорпірифосу були отримані співрозмірні значення BCF. Наприклад, \log BCF хлорпірифосу у товстолобика (*Pimephales promelas*), гуппі (*Poecilia reticulata*), риби-комара (*Gambusia affinis*), риби-кіллі (*Oryzias latipes*), золотої рибки (*Carassius auratus*) та смугастого данію (*Danio rerio*) були в межах 2,7-3,84 (El-Amrani et al., 2012; Jarvinen et al., 1983; Tsuda et al., 1997; Varó et al., 2000; Welling and de Vries, 1992). У той же час, розрахований BCF для *Cyprinus carpio* становив від 3 до 10 у зябрах і тканинах печінки після 96 годин впливу 0,03-0,1 мкг/л хлорпірифосу, що до 100 разів нижче, ніж у вищезгаданих випадках (Georgieva et al., 2021).

Перелік фосфорорганічних пестицидів, що накопичуються в живих організмах активніше, ніж хлорпірифос, є незначним. Серед них – діазинон, який входив до трійки найбільш часто визначуваних пестицидів у рибі та молюсках з Внутрішнього Японського моря у 2016-2017 роках. BCF для діазинону досягали 9,125 л/кг для риби та морських тварин (Chidya et al., 2022). Найвищі коефіцієнти небезпеки ($HQ = 0,0034 - 0,2196$) для діазинону були визначені у червоного морського окуня, а середній ризик для споживачів вказував на те, що HQ становив $0,1 < HQ < 1,0$ (Chidya et al., 2022; Sánchez-Bayo et al., 2002).

BCF деяких фосфорорганічних, тетразинових та новітніх поліциклічних пестицидів виявилися нижчими, ніж у хлорпірифосу. Зокрема, у низки промислових риб \log BCF малатіону був у діапазоні від 0,65 до 2,01 (3.era.gov., 2022). Значення \log BCF 0,6 і 1,17 були експериментально визначені у

смугастого даніо для атразину при концентраціях 100 і 500 мкг/л, що довело порівняно низьку здатність атразину до біоаккумуляції в корокових риб (El-Amrani et al., 2012). З іншого боку, середні значення коефіцієнта біоконцентрації для новітнього циклічного галогенорганічного інсектициду бромфланіліду сягають 10,02 і 69,40 у даніо при концентраціях у 2,00 і 0,20 мг/л, відповідно (Jia et al., 2020). Таким чином, і морські і, особливо, прісноводні риби накопичують хлорпірифос і діазинон в організмі, а також можуть зазнавати шкоди через вплив пестицидів на біоту. За умови спільної присутності у водоймах може проявлятися адитивну токсичність (Bailey et al., 1997). Все це, безумовно, посилює небезпеку забруднення пестицидами та їх шкоду для живих організмів.

Попри те, що молюски накопичують метали у великих кількостях, стверджують, що вони накопичують нижчі рівні пестицидів, ніж риби (Chen et al., 2022). Так, значення BCF у *Mytilus edulis* після впливу на них 3,2 мг/л хлорпірифосу становило 482 ± 86 , що приблизно вдвічі менше, ніж у риб (див. вище) (Serrano et al., 1997). У водоймах Тайваню лише 0,18% усіх прісноводних молюсків накопичували хлорпірифос і трихлорфон у тканинах на максимальних рівнях 0,05 і 0,02 мг/кг відповідно (Wu et al., 2020). Середнє значення BAF для семи хлорорганічних пестицидів, включно з гексахлорциклогексаном, ДДТ і гептахлором, у молюсків з гирла річки Соай Рап у м. Хошимін (В'єтнам), становило 56,672 – у *Crassostrea gigas*, 66,730 – у *Perna viridis*, 123,884 – у *Anadara granosa*, 52,060 – у *Meretrix lyrata* і 115,176 – у *Pinctada maxima* (Tong et al., 2019). Наведені результати дають більш глибоке уявлення про необхідність контролю за пестицидами і підкріплюють доцільність використання риб як більш чутливих біоіндикаторів для біомоніторингу через вищу здатність до накопичення пестицидів.

Відтак, ліпофільність і $\log K_{ow}$ пестицидів належать до найважливіших факторів, що визначають інтенсивність накопичення цих речовин у живих організмах. Видова специфіка, умови експерименту, наявність домішок у

формуляції пестициду повинні бути враховані, щоб уникнути помилкових суджень та висновків щодо VAF/BCF. Серед фосфорорганічних, триазинових та хлорорганічних пестицидів найбільшою здатністю накопичуватися в організмі водних тварин володіє хлорпірифос.

1.3. Вплив органофосфатних та триазинових пестицидів на риб

Пестициди та їх метаболіти при потраплянні в живі організми, можуть негативно впливати на фізіологічні та біохімічні процеси тварин, людини, та екосистеми в цілому (Falfushynska et al., 2012, 2022; Kalyabina et al., 2021). Так, рівень забруднення води пестицидами позитивно корелював із загальною частотою прояву онкологічних захворювань серед населення штату Парана, Бразилія, що, безумовно, підкреслює негативний вплив відповідного забруднення (Panis et al., 2022). Варіації в біоаккумуляції, ліпофільності, силі впливу цільового метаболіту/ферменту, а також хімічних групах або ад'ювантах змінюють основну структуру пестицидів, що призводить до варіабельності проявів токсичності та ступеня ураження (Kalyabina et al., 2021).

Найпоширенішим механізмом дії фосфорорганічних сполук є інгібування ацетилхолінестерази (AChE) шляхом фосфорилювання залишку серину в активній ділянці ферменту. Інгібування AChE спричиняє збільшення часу перебування ацетилхоліну у тому числі і у вищих концентраціях на нікотинових і мускаринових рецепторах, а згодом – накопичення ацетилхоліну і гіперстимуляцію холінорецепторів, що призводить до клінічного токсикозу, відомого як «холінергічний криз», який спричиняє метаболічний дисбаланс. Однак, лише невелика кількість фосфорорганічних пестицидів здатна безпосередньо зв'язуватися з холінестеразами у вихідній формі (Leung et al., 2019).

Відомо, що негативний вплив на організми мають не лише фосфорорганічні речовини, але й їхні біологічно активні метаболіти після взаємодії з цитохромами печінки P450. Так, біоактивні метаболіти пригнічують ферменти з активним центром у вигляді серину, зокрема: естерази (В-естерази, карбоксилестерази), протеази, гідролази (гідролаза амідів жирних кислот) та ліпази (наприклад, лізофосфоліпаза). Утворення ковалентного зв'язку між алкільною фосфорною групою фосфорорганічної сполуки та гідроксильним залишком серину в активному центрі є причиною блокування фосфорорганічними сполуками серинових гідролаз (Mangas et al., 2017; Marsillach et al., 2013).

Окрім нейромедіаторів, до молекулярних та клітинних мішеней впливу фосфорорганічних сполук належать нейротрофічні фактори, гормони, імунна система, ферменти, що беруть участь у розщепленні β -амілоїдного білка, та протизапальні цитокіни (Nabi and Tabassum, 2022; Naughton and Terry, 2019; Sánchez-Santed et al., 2016). Як наслідок, вважається, що фосфорорганічні сполуки викликають неврологічні захворювання, поведінкові зміни, утруднення дихання, метаболічні розлади, включно зі зміною шляхів розщеплення вуглеводів, окислювальний стрес, пошкодження ДНК, імунні та ендокринні розлади, мітохондріальну токсичність, запалення, а також затримують метаморфоз (Strilbyska et al., 2022). На початковому етапі помітні зміни клітинних процесів і стресових реакцій пов'язані з гістопатологічними розладами, такими як регресивні, судинні та прогресуючі зяброві розлади, набряк хлоридних клітин і некроз (Nur and Devenci, 2018; Rocha et al., 2015). Слід зазначити, що триазини мають подібні ознаки токсичності у тваринних моделях з особливим акцентом на пошкодженнях ДНК та ендокринних розладах (Želježić et al., 2018)

1.3.1. Окисний стрес як основний неспецифічний негативний наслідок впливу органофосфатних та триазинових пестицидів на рибу

Біологічні системи еволюційно розвинули необхідні антиоксидантні механізми для захисту своїх клітин і компартментів від окисного ушкодження внаслідок впливу активних форм кисню (АФО) на біополімери та клітини (Sies et al., 2017). Широке коло ксенобіотиків, зокрема пестициди, токсичні метали, наноксиди, фармацевтичні препарати, можуть порушувати баланс між ендогенними та екзогенними АФО, що призводить до зниження антиоксидантного захисту (Abdollahi et al., 2004; Lushchak, 2011, 2016). Коли порушується фізіологічна рівновага між надлишковим утворенням АФО та їх нейтралізацією антиоксидантами, АФО накопичуються в клітинах, спричиняючи оксидативний стрес і пошкодження тканин (Sies et al., 2017). Щобільше кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів, карбонілювання білків, фрагментації нуклеїнових кислот і пошкодження мітохондрій накопичується в клітинах, то швидше вони схильні до програмованої смерті клітин. Окисний стрес загалом і перекисне окислення ліпідів та карбонілювання білків зокрема можуть виявляти стимулюючий вплив на різні патологічні стани, зокрема, запалення, дегенеративні захворювання та старіння.

АФО вважають основною причиною окисного стресу. Лише 1-5% АФО, що утворюються в процесі клітинного дихання, можуть викликати окисне руйнування біомолекул. Найпоширенішими радикалами є гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$), супероксидний аніон-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), пероксид гідрогену (H_2O_2), синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), оксид азоту (II) (NO), пероксинітрит (ONOO^-), алкоксил ($\text{RO}\cdot$) та пероксидний радикал ($\text{ROO}\cdot$) (Lushchak et al., 2009; Sies et al., 2017). Найбільш реакційно-здатним з них є гідроксильний радикал $\cdot\text{OH}$, який утворюється в реакції Фентона і реакції Габера-Вайса з пероксиду гідрогену за каталітичного впливу редокс-металів, а саме заліза і міді (Barrera, 2012). Для дослідження клітинного утворення $\cdot\text{OH}$ було застосоване пряме

виявлення $\cdot\text{OH}$ за допомогою електронного спінового резонансу, мікродіалізу, вимірювання вільного радикала за допомогою агента-пастки, а також непряме вимірювання продуктів окисної деструкції, таких як перекисне окислення ліпідів і пошкодження ДНК (Yan et al., 2005).

Малоновий діальдегід (МДА) – один з кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів, який належить до найбільш досліджуваних у водних тварин. Низка досліджень показала, що концентрації МДА/ ТБК-активних продуктів у водних тварин зростають після впливу різних пестицидів, особливо фосфорорганічних. Наприклад, після 96 годин впливу комерційного препарату Colosso FC30, що містить хлорпірифос ($0,5$ або $1 \mu\text{g}\times\text{L}^{-1}$) і циперметрин ($0,3$ або $0,6 \mu\text{g}\times\text{L}^{-1}$), у коропа і смугастого даніо спостерігалось посилення перекисного окислення ліпідів (Nunes et al., 2018). При збільшенні тривалості експерименту результати були подібними. За впливу хлорпірифосу ($0,1$ і 3 мкг/л) і Раундапу (15 і 500 мкг/л) протягом 14 днів на *Danio rerio*; $1,4$ і $2,44$ мкг/л хлорпірифосу протягом 15, 30 і 60 днів на рибу *Stenopharyngodon idellus* та 1 і 2 мкг/л атразину протягом 30 днів на жовтохвоста тетра (*Astyanax altiparanae*) було відзначено значне збільшення перекисного окислення ліпідів у печінці, нирках і зябрах досліджуваних особин (Destro et al., 2021; Falfushynska et al., 2022a; Kaur and Jindal, 2017). Останнє цілком узгоджується зі збільшенням вироблення АФО, з одного боку, і падінням активності каталази, супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази (GPx) з іншого (Kaur and Jindal, 2017).

Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) є особливо вразливим до впливу пестицидів, адже навіть невеликі концентрації цих речовин у навколишньому середовищі можуть значною мірою ініціювати цей процес. Індекс варіабельності перекисного окиснення ліпідів в деяких випадках сягає понад 5. Існує багато опублікованих досліджень, що описують активацію перекисного окислення ліпідів у риб після гострого впливу фосфорорганічних пестицидів (наприклад, раундапу, малатіону), триазинів (атразину) та

піретроїдних пестицидів (дельтаметрину, циперметрину та лямбда-цигалотрину) (Modesto and Martinez, 2010; Nwani et al., 2010; Yang et al., 2020b). Вплив гостротоксичної концентрації (10 мг/л) раундапу на *Prochilodus lineatus* протягом 96 годин призвів до триразового підвищення рівня МДА в печінці цих риб (Modesto et al., 2010). Рівень ПОЛ також виявився вищим у зябрах і плазмі крові *Catla catla* після 96 годин впливу гострої (0,09 ppm) і сублетальної (0,009 ppm) концентрацій метилпаратіону. Виявлено, що значні зміни в ПОЛ добре узгоджуються зі змінами антиоксидантів і метаболічних ферментів, таких як глутамат-оксалацетат-трансфераза (ГОТ), глутамат-піруват-трансфераза (ГПТ) і лактатдегідрогеназа (ЛДГ), які могли бути спричинені серйозними ушкодженнями клітин і тканин (Abhijith et al., 2016). Коли тропічна риба *Astyanax aeneus* зазнала впливу сублетальної концентрації етопрофосу (0,01 мг/л протягом 48 годин), рівень ПОЛ збільшився, при тому, що каталаза (КАТ), глутатіон-S-трансфераза (GST) і швидкість метаболізму в стані спокою не зазнали впливу (Sandoval-Herrera et al., 2019).

Коли тварини піддаються впливу токсичних пестицидів протягом тривалого періоду часу, тяжкість завданої їм шкоди зростає. У райдужної форелі, яка зазнавала впливу гостротоксичної концентрації гербіциду на основі гліфосату (1,25 і 2,5 мг/л) протягом 14 днів, спостерігалось значне підвищення загального рівня продуктів окисної декструкції, а також помітні гістопатологічні порушення, включаючи нерегулярні або навіть дегенеративні вторинні ламели та гіперплазію епітелію в зябрових відділах, набряк хлоридних клітин і некроз (Nur and Devenci, 2018). На підставі значного (до 4,4 разів) підвищення рівня ПОЛ у тканинах печінки встановлено суттєвий вплив гострої дії атразину в діапазоні концентрацій 4,238 - 10,600 мг/л на прісноводну рибу *Channa punctatus* протягом 15 діб. Одночасно з індукцією ПОЛ відбувалося значне зниження активності КАТ, що може бути пов'язано зі зменшенням швидкості реакції внаслідок надлишкового утворення H_2O_2 (Nwani et al., 2018). У той же час, короп, який отримувал метаболіти триазину

(тербутилазин 2-гідрокси - $0,73 \mu\text{g}\times\text{L}^{-1}$; тербутилазин-дезетил - $1,80 \mu\text{g}\times\text{L}^{-1}$; атразин 2-гідрокси - $0,66 \mu\text{g}\times\text{L}^{-1}$) у значно нижчих, екологічно співмірних концентраціях не виявляв ознак оксидативного стресу або негативного впливу на вилуплення, поведінку, життєздатність ембріонів, їх ріст або ранній онтогенез (Velisek et al., 2016). Загалом, вищепродемонстроване збільшення перекисного окислення ліпідів може бути пов'язане з некомпенсованим утворенням АФО в клітинах і ослабленою антиоксидантною системою в риб. Показано, що АФО та оксидативний стрес є тригерами апоптозу, спричиняючи пошкодження білків та ліпідів, активуючи апоптичні шляхи та/або запальні процеси.

АФО є вагомою причиною пошкодження ДНК, які, за відсутності належної компенсації, можуть призвести до мутацій та хромосомних аберацій. МДА та 4-гідроксиноненал, як найбільш генотоксичні та мутагенні продукти перекисного окислення ліпідів, утворюють аддукти з ДНК, спричиняючи його пошкодження (Guilherme et al., 2012). Фосфорорганічні пестициди також можуть спричинити пошкодження ДНК шляхом алкілування основ безпосередньо або опосередковано через алкілування білків. Зокрема, монокротофос у низьких наномолярних концентраціях після короткочасного впливу викликав збільшення % хвостової ДНК та частоти мікроядер у смугастого даніо у залежності від дози (D'Costa et al., 2018). Крім того, пестициди на основі гліфосату в субтоксичних концентраціях і хлорпірифос навіть в екологічно співмірних концентраціях призводили до посилення ознак пошкодження ДНК у *Danio rerio* і *Anguilla anguilla*, що проявлялося у вигляді розривів ланцюгів ДНК і підвищення рівня окиснених пуринів в ДНК (Falfushynska et al. 2022a; Guilherme et al., 2012). Доведено, що подібні результати спостерігаються у сільськогосподарських робітників, які зазнають впливу пестицидів під час роботи (Ledda et al., 2021).

Організми на ранніх стадіях життя більше піддаються впливу пестицидів, ніж на пізніших стадіях, оскільки вони є більш вразливими.

Нещодавно було показано, що 3-годинний вплив хлорпірифосу (236 мкг/л), бета-циперметрину (5,9 мкг/л) та їх суміші протягом 96 годин на ембріони смугастика після запліднення (hpf) призводить до збільшення перекисного окислення ліпідів у чотири-вісім разів, а також до незначного зниження антиоксидантної активності. Хлорпірифос і бета-циперметрин, як окремо, так і в комбінації, також були здатні спричинити ураження печінки і прискорювати загибель тканин. Токсичність цих двох пестицидів була пов'язана з позаклітинною матрично-рецепторною взаємодією, вогнищевою адгезією, клітинним циклом, реплікацією ДНК, фототрансдукцією та шляхами з'єднання адгезивів, згідно з даними транскриптомного секвенування (Zhang et al., 2017).

Над проблемою зменшення негативних наслідків, спричинених пестицидами, сьогодні працює багато дослідників, зокрема, над розробкою антиоксидантів та імуностимуляторів, які належать до найбільш перспективних засобів (Ali et al., 2022; Hassan et al., 2022; Maheshwari et al., 2020). У нільської тилапії (*Oreochromis niloticus*), що піддавалася впливу 2 мг/л раундапу та 0,5 мг/л малатіону протягом 60 днів, спостерігалася збільшення МДА, яке було успішно усунуто додаванням селенових дріжджів (3,3 мг/кг доступного селену) (Hassan et al., 2022). В *Oreochromis niloticus* харчування з додаванням ізатісу (1%) зменшувала спричинену атразином (1,39 мг/л протягом 30 днів) затримку росту, печінково-ниркову дисфункцію (сечова кислота, сечовина, креатинін, аспартатамінотрансфераза – АСТ, аланінамінотрансфераза – АЛТ, а також загальний білок, глобулін та альбумін) та окисний стрес (виміряний за допомогою МДА, СОД, глутатіон-пероксидази та каталази) (Ali et al., 2022). Подібні результати були виявлені у нільської тилапії, яка зазнала впливу хлорпірифосу ($15 \mu\text{g}\times\text{L}^{-1}$) після введення сирих екстрактів спіруліни (0,5% і 1%). Риби, які отримували харчування зі спіруліною, мали вищу активність антиоксидантних ферментів, таких як СОД і каталаза, і нижчу активність амінотрансфераз і лужної фосфатази, що

підкреслює як профілактичну, так і відновлювальну дію спіруліни проти токсичності хлорпірифосу (Abdel-Daim et al., 2020).

Що важливо, результати досліджень здатності пестицидів викликати окисне ушкодження ліпідів у нецільових водних тварин, а саме риб, узгоджуються з результатами, отриманими у людей. Гострий вплив тербутилазину *in vitro* (8 нг/мл) призвів до значного посилення перекисного окислення ліпідів та незначної нестабільності ДНК у зразках крові людини. Так, утруднення міграції ДНК було пов'язане зі зшивками ДНК, спричиненими реакцієздатними метаболітами тербутилазину, а не з окисним ушкодженням ДНК (Želježić et al., 2018). Крім того, результати, оприлюднені Intayoung та ін., свідчать про те, що спільне використання гліфосату та параквату призводило до значного підвищення рівня МДА в сечі працівників аграрного сектору (Intayoung et al., 2021). Отже, цілком можливо, що пестициди, викликаючи окисний стрес у нецільових організмах, можуть бути причиною далекосяжних негативних наслідків для здоров'я, включаючи рак не тільки у тварин, але й у людей. Відтак, оцінка небезпеки на ранній стадії з використанням риб як альтернативної моделі може принести багато користі.

Таким чином, дослідження риб дають підстави вважати, що присутність фосфорорганічних і триазинових пестицидів навіть в екологічно релевантних концентраціях може призвести до істотного окисного стресу та окисної деструкції біомолекул. Однак, необхідно докласти більше наукових зусиль, щоби до кінця зрозуміти молекулярні механізми негативного впливу пестицидів, зокрема, триазинів на риб. Антиоксидантні та імуномодулюючі харчові добавки в тому числі рослинного походження можуть пом'якшити несприятливі наслідки, спричинені пестицидами.

1.3.2. Карбонільний стрес як одна з ознак впливу пестицидів на організм риб

Протеїни також є частим об'єктом негативного впливу пестицидів. Вважається, що за дії пестицидів рівень карбонілів білків зростає у тканинах

тварин і людини. Варто зазначити, що тепер увага дослідників змістилася на розробку новітніх біомаркерів, заснованих на фіксації пошкодження білків, зокрема білкові аддукти, карбоніли протеїнів та 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин (8-оксо-dG, окислений нуклеозид ДНК) (Dhama et al., 2019; Marsillach et al., 2013). Доведено, що фосфорорганічні, тіокарбаматні, триазинові та тетразинові пестициди, а також фенілсечовина та піретроїдні естери спричиняють окисне пошкодження білків у різних видів тварин, у тому числі водних (Di Nica et al., 2020; Oğuz et al., 2020). Вплив дельтаметрину (0,75 мкг/л), ендосульфану (10 мкг/л) та параквату (5 мг/л) на *Channa punctata* упродовж від 12 годин до 28 днів, а також вплив хлорпірифосу (0,26 мг/л та 0,52 мг/л) на коропа *Cyprinus carpio* упродовж 96 та 240 годин призвели до значного збільшення рівня карбонілів білків та 8-оксо-dG у зябрах, нирках, мозку та печінці (Berkoz et al., 2019; Parvez and Raisuddin, 2005). Коротший термін впливу призводив до найбільш вираженої індукції, особливо після 48 годин (Parvez and Raisuddin, 2005). Після 14 днів впливу хлорпірифос і малатіон навіть у низьких концентраціях (0,1 і 5 мкг/л, відповідно) посилили утворення метилглюксалу як реакцієздатного карбонільного похідного в печінці смугастого даніо (Vodnar et al., 2021).

Дані, отримані в лабораторних умовах, були підтверджені і в умовах польових досліджень. При порівнянні тканин зябер і печінки риб *Rita rita* і *Cyprinus carpio* з двох природних територій забруднених пестицидами в Індії з відповідними референтними місцевостями було виявлено значно вищу кількість карбонілів білків (Shah and Parveen, 2022). Незважаючи на перспективні результати стосовно підтвердження кореляції біомаркерів окисного пошкодження білків з ризиком забруднення пестицидами із нецільовими показниками та/або прогнозом наслідків, для заповнення прогалин у цій галузі рекомендується провести подальші дослідження, зосередившись на фосфорорганічних сполуках і, зокрема, на тербутилазині, як одному з широко використовуваних пестицидів.

У більшості згаданих випадків посилення окислювальних уражень білків взаємопов'язане з неврологічними та поведінковими розладами, серед яких пригнічення активності ацетилхолінестерази, мускариновий ефект, плавальна поведінка та локомоторна активність не тільки у риб, але й у людини (Bjørling-Poulsen et al., 2008; Jin 2015). Дуже ймовірно, що деякі нейроповедінкові симптоми у тварин, які зазнали впливу фосфорорганічних пестицидів, можуть бути пов'язані з утворенням високореактивних карбонілів білків і генерацією окисного стресу.

1.3.3. Нітрозативний стрес у риб, спричинений пестицидами

Активні форми нітрогену (АФН) – це реактивні сполуки, які утворюються переважно внаслідок взаємодії екзогенного та ендогенного нітроген (II) оксиду (NO) з АФО (наприклад, H_2O_2 та $\text{O}_2^{\bullet-}$) у присутності відновників, зокрема літій-алюміній гідриду (LiAlH_4) (Martínez and Andriantsitohaina, 2009). Нітроксильний аніон (NO^-) (утворюється при відновленні NO), оксиди нітрогену, катіон нітронію (NO^+), S-нітрозотіоли (RSNO) та комплекси динітрозильного феруму – це похідні нітроген оксиду. NO є внутрішньоклітинним медіатором, який контролює різноманітні фізіологічні функції. Однак, через свою високу реакційну здатність з іншими вільними радикалами, NO може проявляти токсичність за патологічних умов. Коли від NO відривається один електрон, утворюється NO^+ , який може утворювати нітросполуки, що активно реагують з нуклеофілами (Wink and Mitchell, 1998).

АФН відіграють важливу роль у різноманітних біологічних процесах, включаючи фізіологічний контроль. NO бере участь в імунологічних реакціях риб, так само як і у вищих хребетних (Eddy, 2005). Ген iNOS райдужної форелі був повністю секвенований, а структура гена була порівняна зі структурою гена iNOS людини. Незважаючи на незначні відмінності від людського гена, екзони демонструють високу консервативність послідовності та організації

(Wang, et al., 2001). У смугастого даніо, яким вводили ліпополісахарид, збільшувалася генерація NO і АФО, а також рівні білків iNOS і COX2 та прозапальних цитокінів, що свідчить про те, що ці молекули відіграють певну роль в захисті від патогенного впливу токсинів (Ko, et al., 2017).

Якщо АФН утворюються і присутні в надмірній кількості, вони можуть пошкоджувати клітини. АФН мають плейотропний вплив на клітинні мішені, причому ці ефекти зберігаються навіть після посттрансляційних модифікацій та взаємодії з АФО (Wink and Mitchell, 1998). Через розвиток нітрозативного стресу АФО взаємодіють з багатьма клітинними компонентами, що призводить до клітинних аномалій, пошкодження та загибелі клітин (Martínez, 2009). Нітрозативний стрес спричиняється нітрозилуванням ключових тіолів цистеїну (S-нітрозилування) та металокофакторів білків, коли NO або подібні сполуки утворюються після впливу певних ксенобіотиків, у тому числі пестицидів.

Майже в кожній роботі, присвяченій змінам параметрів оксидативного/нітрозативного стресу під впливом поширених пестицидів, є розділ, присвячений значним змінам у метаболічних шляхах дотичних до iNOS. Однак, немає чіткої тенденції у зміні показників, пов'язаних з NO, у контексті шкідливого впливу пестицидів. Деякі дослідження підкреслюють дозозалежне пригнічення утворення нітритів, вироблення супероксиду лейкоцитами та різних імунних реакцій (наприклад, фагоцитарної відповіді, проліферації лімфоцитів) у лейкоцитах прісноводного телеоста *Channa punctatus*, що зазнали впливу триазофосу в концентраціях 0,1, 0,5 та 1 мкг/мл протягом 48 годин (Bhardwaj et al., 2022). Малатіон і хлорпірифос, з іншого боку, в концентраціях 50 і 3 мкг/л, відповідно, після 14 днів впливу індукували NO в печінці смугастого даніо (Vodnar et al., 2021). Подібні результати були виявлені у короїв, які зазнали впливу атразину та хлорпірифосу; а також у даніо, які зазнали впливу перметрину, як посилення експресії мРНК синтази нітроген оксиду (iNOS); та у щурів, які отримували паратіон (18 мг/кг), за умов

чого збільшувався рівень цитруліну в головному мозку до 40-47%, що може розглядатися як індикатор продукції оксиду нітрогену (Chen et al., 2014; Jin et al., 2015; Liu et al., 2007; Wang et al., 2013). Крім того, пригнічення 7-нітроіндазолом (30 мг/кг) нейронної синтази оксиду нітрогену призводило до значного посилення холінергічних симптомів отруєння паратіоном і смерті (Liu et al., 2007).

Таким чином, наразі недостатньо вивчено зміни NO в тканинах нижчих хребетних під впливом пестицидів, більшість з яких є імунотоксикантами та ендокринними деструкторами, а отже, можуть слугувати тригером сигнальних шляхів NOS та NF-κB. На основі існуючих даних про зміни NOS у ссавців після впливу пестицидів можна припустити, що вироблення оксиду нітрогену як специфічна захисна реакція на дію ксенобіотиків може сприяти підтримці стійкості до дії пестицидів і нівелювати негативні ефекти, однак, у цій галузі необхідні подальші дослідження (Farkhondeh et al., 2020; Chan et al., 2007).

1.3.4. Імуномодулюючі та запальні ефекти органофосфатних та триазинових пестицидів

Пестициди можуть викликати порушення функцій імунних клітин, що може призвести до імуносупресії або імуностимуляції, що, в свою чергу, може спричиняти запальні та алергічні реакції, а також автоімунні захворювання. Майже всі дослідження, присвячені імуномодуляції фосфорорганічними речовинами, проводилися на гризунах або на клітинних лініях людини, причому більшість з них зосереджувалися на проліферації та функціональній активності субпопуляцій лімфоцитів (Parny et al., 2022). У кількох дослідженнях вивчався вплив ксенобіотиків з навколишнього середовища, зокрема пестицидів, на імунну систему та маркери запалення у риб. Фосфорорганічні речовини, такі як хлорпірифос, діазинон і фозалон, серед іншого, можуть впливати на молекули, що беруть участь у вроджених та адаптивних імунологічних реакціях риб. Дослідження показали, що залежно

від пестициду, тривалості експерименту та концентрації, імунна система активується і запускає запальну реакцію (Chen et al., 2014) або, навпаки, пригнічує активацію імунної системи та здатність виробляти медіатори запалення (Díaz-Resendiz and Girón-Pérez, 2014).

У більшості риб тетрамерний імуноглобулін М (IgM) вважається найпоширенішим типом сироваткового імуноглобуліну (Mashoof and Criscitiello, 2016). IgM продовжує складати більшість з усіх трьох імуноглобулінів, що зустрічаються у риб, і відіграє роль як у вродженому, так і в адаптивному імунітеті, а також опосередковує взаємодію з аутоімунними антигенами, що беруть участь в апоптичному кліренсі клітин (Díaz-Resendiz et al. 2015; Yu et al., 2020). Хоча імунна відповідь риб варіюється залежно від пестициду, часу впливу та концентрації, найбільш послідовною реакцією IgM на фосфорорганічні пестициди є пригнічення, особливо під час гострого впливу, як це було продемонстровано у коропа звичайного (*Cyprinus carpio*) та нільської тиляпії (*Oreochromis niloticus*) (Díaz-Resendiz et al., 2014; Li et al., 2013). Це здебільшого пов'язано зі змінами запальних цитокінів макрофагів (Yang et al., 2021). Так, було виявлено, що хлорпірифос (0,051 мг/мл) знижує концентрацію IgM у плазмі крові нільської тиляпії (Díaz-Resendiz et al., 2014). Крім того, хлорпірифос знижував рівень IgM у крові та селезінці карася, але підвищував його в нирках цього виду. Хлорпірифос також посилював експресію IL-6, IL-8 і TNF- α в тканинах мозку, нирок і селезінки коропа, що посилювалося при поєднанні з атразином (триазиновим гербіцидом) (Chen et al., 2004). Інше дослідження щодо імунотоксичності фосфорорганічних пестицидів з використанням діазинону як моделі показало значне зниження фагоцитарного індексу у молодій нільській тиляпії, хоча змін у концентрації циркулюючого IgM не спостерігалось (Giron-Perez et al., 2007). Крім того, вплив на *Clarias gariepinus* $\frac{1}{2}$ LC50 раундапу та $\frac{1}{2}$ LC50 стомпу призвів до помітного зниження фагоцитарної активності в поєднанні з дисбалансом антиоксидантів та значними гістопатологічними змінами, а саме: сильним

застійним явищем у гепатопортальних кровоносних судинах, мультифокальними ділянками коагуляційного некрозу з великою кількістю лейкоцитів та еритроцитів, а також макровезикулярним стеатозом (Moustafa et al. 2016). З іншого боку, в наших роботах ми показали, що даніо зберігають здатність активувати імунологічні реакції після тривалого впливу 15 або 500 мкг/л раундапу та 0,1 або 3 мкг/л хлорпірифосу, що свідчить про те, що імуносупресія за цих умов є малоімовірною (Falfushynska et al., 2022a).

Щодо впливу широковикористовуваних пестицидів на цитокіни повідомлялося, що вплив хлорпірифоси (4 мкг/л) на великоротого окуня (*Micropterus salmoides*) протягом 60 днів та гострий короткочасний вплив хлорпірифосу (до 100 або 300 мкг/л) на личинки смугастого даніо (96 hpf) призвели до посилення експресії прозапальних генів (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15), зниження експресії протизапальних генів (TGF- β 1, IL-10), тяжких гістопатологічних уражень та зниження експресії генів, пов'язаних з антиоксидантами. Всі ці клітинні події визначають промоцію апоптозу через гіперекспресію CASP3, CASP8, CASP9 та BAX (Zhao et al., 2021; Jin et al., 2015). З іншого боку, вплив атразину в концентраціях 1 і 10 мкг/мл на моноцити срібного сома *in vitro* викликав зниження рівня мРНК TNF- α і мієлопероксидази (МПО), але не вплинув на IL-1 β (Kirsten et al., 2017). Щодо механізму, було продемонстровано, що вплив фосфорорганічних сполук активує кальцій-опосередковану сигналізацію p38-MAPK та ERK, посилюючи запалення через активацію NF- κ B та підвищення рівня прозапальних цитокінів, таких як TNF- α та IL-6 (Camacho-Pérez et al., 2022).

Існує думка, що імуносупресивна дія деяких пестицидів може впливати на здатність риб переносити інфекції, а також паразитарні та вірусні захворювання. Однак, цій темі присвячено не так багато публікацій. Деякі з них розглядають піретроїди та динітроаніліни. Зокрема, було показано, що у райдужної форелі, яка зазнала впливу пендиметаліну, а потім вірусу гемопоетичного некрозу, підвищуються рівні експресії TNF1, TNF2, TLR3, IL-

1 β та IFN, але різниця була більш глибокою у риб, що попередньо зазнали впливу гербіциду. У той же час, єдиним пригніченим геном у групі, інфікованій пестицидами, був β -def, а одноразовий вплив вірусу не приніс якогось фактичного результату (Duru et al., 2019). Також значне порушення імунної системи було відзначено у нільської тиляпії після хронічного впливу біфетрину, що, в свою чергу, значно знижувало стійкість риб до інфекції *Aeromonas* (Farag et al., 2021). Подібні результати були отримані і в одиниць, що зазнали впливу піретроїдних пестицидів, які, як відомо, ослаблюють здатність організму до захисту від інфекцій та раку (Costa et al., 2013).

Ці дослідження імунної та інфламаторної реакції риб на токсичний вплив зростаючого забруднення пестицидами, хоч неоднозначні та неповні, підвищують обізнаність про залежність між вразливим імунітетом риб, що зазнали впливу пестицидів, та їхньою здатністю протистояти додатковим стресорам, таким як інфекція, і виживати після них.

1.3.5. Мітохондріальна та лізосомальна токсичність досліджуваних пестицидів

Вважають, що мітохондрії, які відіграють важливу роль у виробництві клітинної енергії та АФО, повинні бути пов'язані з метаболічними змінами, спричиненими пестицидами. Різні класи пестицидів мають відносно однакові ознаки мітохондріальної токсичності, серед яких: 1) набухання мітохондрій; 2) низький рівень співвідношення цитоплазма/мітохондрії; 3) зміна щільності матриксу; 4) вакуолізовані мітохондрії з дезорієнтованими кристами матриксу в гістограмі; 5) зниження активності НАДН-цитохромоксидази та сукцинатцитохромоксидази в дихальному ланцюзі мітохондрій; 6) інгібування мітохондріального окисного фосфорилування; та 7) зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій (Azevedo et al., 2021; Nassar et al., 2021; Sagarkar et al., 2016). Варто зазначити, що даних про мітотоксичність як відповіді на вплив триазинових пестицидів у риб недостатньо, але

дослідження на моделях ссавців вказують на подібний механізм мітотоксичності, що спостерігається для інших класів пестицидів. Наприклад, вплив атразину призводить до зниження регуляції експресії багатьох субодиниць OXPPOS (наприклад, мітохондріального транскрипційного фактора A і сиртуїну-3) і впливає на експресію факторів біогенезу в клітинах HepG2 і L6 (Sagarkar et al., 2016).

Мітохондрії генерують багато вільних радикалів, які сприяють виникненню багатьох патологічних і дегенеративних змін, особливо коли організм зазнає впливу хімічних стресорів. Після впливу пірипроксифену (0,001-10 мкмоль/л протягом 16 годин) у самців смугастого даніо спостерігалось значне зниження активності комплексу I/II та здатності до поглинання Ca^{2+} в тканині мозку, а також значне збільшення кількості O^2 -радикалів, виявлених за допомогою тесту MitoSOX (Azevedo et al., 2021). Помітне порушення вивільнення Ca^{2+} мітохондріями може бути пов'язане зі зниженням мембранного потенціалу мітохондрій або пошкодженням ендоплазматичного ретикулуму, спричинених пестицидами. Цей результат подібний до висновків наших попередніх експериментів із дослідженням впливу хлорпірифосу та малатіону на смугастого даніо (Bodnar et al., 2021). Однак, помітне зниження активності сукцинатдегідрогенази добре узгоджувалося з накопиченням АФО і збільшенням рівня метилгліоксалу (як побічного продукту гліколізу) в печінці даніо тільки після впливу хлорпірифосу (Bodnar et al., 2021). Активність сукцинатдегідрогенази знижувалася, а активність лактатдегідрогенази підвищувалася після обробки фосфорорганічними інсектицидами, що вказує на те, що анаеробний метаболізм покращувався, а аеробне окислення пірувату знижувалося (Bodnar et al., 2021; Das and Mukherjee, 2000).

Малатіон викликає менш помітні зміни в мітохондріальному диханні риб і в системі окисного фосфорилування, ніж хлорпірифос. Малатіон у концентрації 7,3 мг/л протягом 96 годин, наприклад, не вплинув на

мітохондріальну функцію печінки та активність усіх білкових комплексів бурого паку (*Colossoma macropomum*) (Silva de Souza et al., 2020). Проте, малатіон порушив окисне фосфорилування у лосося срібного (*Oncorhynchus kisutch*), спричиняючи зниження дихальної здатності електронно-транспортної системи на 38% і зниження швидкості контролю дихання на 46%, що може порушити генерацію АТФ у мітохондріях (Wang et al., 2016). Однак, він не вплинув на мітохондріальне дихання станів 3 і 4, а також на електронний потік через комплекси II і IV (Wang et al., 2016).

Основні компоненти пестицидів відповідно до класифікації за способом дії можуть проявляти мітохондріальну токсичність через електрофільно-нуклеофільну взаємодію з біополімерами або конкретну взаємодію з певними молекулами рецепторів (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2017). Нещодавно було доведено, що афінність зв'язування мітохондріальних білків-транслокаторів, зниження мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах HepG2 і розвиток токсичності у смугастого даніо значною мірою пов'язані з гідрофобністю фосфорорганічних пестицидів (хлорпірифосу, азінфос-метилфозалону, малатіону, мевінфосу тощо) (Leung et al., 2019). Крім того, Leung і Meyer підкреслили, що обмін речовин може бути об'єктом шкідливої дії деяких фосфорорганічних пестицидів, особливо в контексті тих сполук, які мають схожість з проміжними продуктами циклу Кребса (наприклад, малатіон і мевінфос) (Leung et al., 2019). Отримані дані також підтверджують думку про те, що деякі фосфорорганічні пестициди, особливо ті, що потребують ферментативної активації до оксонів, можуть мати мітохондріальні ефекти на додаток до відомих наслідків порушення холінергічної передачі (Leung et al., 2019).

Доведено, що функціональність мітохондрій і лізосом координується з клітинним метаболізмом і сигналізацією (Deus et al., 2019). Лізосомальна система відіграє вирішальну роль у розпаді та руйнації старих органел і пошкоджених білків. Шаперон-опосередкована автофагія, макроавтофагія та

ендоцитоз переносять неправильно структуровані та пошкоджені білки до лізосом, а потім продовжують руйнування убіквітин-протеасомним шляхом (Jackson and Hewitt, 2016; Zhang et al., 2021). У той же час, коли лізосомальна система пошкоджена або дисфункціональна, порушується протеостаз, збільшується ендоплазматичний стрес, пригнічується аутофагія (Ren et al., 2021). У хребетних (риби та ссавці) лізосомальна дисфункція часто пов'язана з цитотоксичністю, спричиненою пестицидами (Bodnar et al., 2021; Bonomo et al., 2019; Venkatesan et al., 2017). У смугастого данію як в *in vitro*, так і в *in vivo*, новітні металоінсектициди [Mg(hesp)2(phen)] (10 та 1000 нг/мл), хлорпірифос (0,1 та 3 мкг/л), карбофуран (0,1, 0,05 та 0,02 мкг/л) та раундап (67,7-270,8 та 500 мкг/л) можуть спричинити нестабільність лізосомальних мембран, що визначається за утриманням нейтрального червоного та активністю кислій лізосомальної протеази, катепсину D, що збільшувалася на ~27% порівняно з контрольними показниками (Bonomo et al., 2019; Falfushynska, et al., 2022a; Goulart et al., 2015).

Враховуючи вищенаведені дані, можна припустити ключову роль мітохондрій і, ймовірно, важливу роль лізосом в адаптації організмів до забруднення пестицидами. Збереження функції мітохондрій, а відтак і нормальної метаболічної активності, є спробою компенсувати негативні наслідки забруднення.

1.3.6. Ендокринні розлади, спричинені пестицидами

Пестициди, які можуть впливати на вироблення гормонів, пов'язують із негативним впливом на репродуктивну систему як людини, так і тварин (Leemans et al., 2019). Близько 146 речовин, серед яких і пестициди, включені Європейським осередком Мережі протидії шкідливому впливу пестицидів (Pesticide Action Network-EU, 2023) до списку хімічних речовин, що спричиняють ендокринні порушення (PAN-EU, 2023). Однак, насправді, набагато більше пестицидів можуть впливати на гормонозалежні шляхи,

оскільки вони здатні діяти як ендокринні дизраптори. Пестициди можуть змінювати рівень статевих стероїдів, спричиняти зміни репродуктивної поведінки, порушувати синтез стероїдів, впливати на морфологію гонад, провокувати розвиток токсичності у деяких видів риб (Kar, S. et al., 2021).

Індукція вітелогеніну у самців риб широко використовується як біомаркер впливу ксеноестрогенів. У риб вітелогенін можна визначити як ліпоглікофосфопротейн, який синтезується в печінці, вивільняється в кров і виступає ключовим медіатором протеїнів яєчного жовтка. Загалом, незважаючи на наявність генів вітелогеніну, чоловічі особини мають дуже низький його рівень або взагалі не мають його (Nara et al., 2016). Під впливом певних синтетичних естрогенів, алкілфенолів, фітоестрогенів та пестицидів синтез вітелогеніну у самців значно зростає, тож його можна виявити в крові або гепатоцитах (Wang, et al., 2019). Зокрема, рівень вітелогеніну був вищим у сироватці крові коропа після впливу на нього препаратів Аполло (клофентезин: 1 і 2 мкг/л) і Татту (манкозоб: 9,1 і 91 мкг/л) протягом 14 днів (Falfushynska et al., 2012). Хоча нещодавно повідомлялося, що хлорпірифос у діапазоні концентрацій 0,25-3,02 мкМ не є ендокринно активним і не має потенціалу для взаємодії з естрогенними, андрогенними або тиреоїдними шляхами, на основі більшої ваги оцінки показників їхнього впливу на товстолобика, кілька досліджень запропонували протилежні результати. Варто зазначити, що хлорпірифос у концентраціях 0,174 ммоль/л (протягом 96 годин), 3 мкг/л (протягом 14 днів) та 20 мкг/л у сома, смугастого данію та райдужної форелі викликав порушення функціональної активності рецепторів прогестерону, впливав на рівень вітелогеніну в печінці, яєчниках та сироватці крові, а також індукував стероїдні гормони, а саме естрадіол, прогестерон та гормон, що стимулює статеве дозрівання (De Anna et al., 2021; Mishra et al., 2021; Khatib et al., 2022;. Falfushynska et al., 2022a). Подібні результати були виявлені для інших фосфорорганічних пестицидів, включаючи гліфосат, діазинон і монокротофос (Falfushynska et al., 2022a; Khatib et al. 2022; Korkmaz

et al., 2017; Darvishi et al., 2022; Tian et al., 2009; Xia et al., 2013). Зокрема, вплив 0,488 та 0,976 мг/л діазинону на самців коропа протягом 15 днів викликав підвищення рівня E2 та вітелогеніну в плазмі крові, а також руйнування, застійні явища та фіброз у яєчках (Korkmaz et al., 2017). У той же час, тривалий вплив (30 днів) викликав повне порушення синтезу вітелогеніну в тісному зв'язку з глибокими гістопатологічними змінами в гепатоцитах і гонадах (Korkmaz et al., 2017).

Вплив тетразинових пестицидів на вітелогенез та репродуктивну функцію риб доволі схожий до такого у фосфорорганічних пестицидів. Відомо, що атразин і симазин здатні збільшувати вироблення естрогенів, активність ароматази та експресію *zcyp19a1* (ген-мішень ядерного рецептора SF-1), змінювати метаболізм стероїдних гормонів і вітелогенез, порушувати гіпоталамічний контроль рівня лютеїнізуючого гормону та пролактину, а також сприяти морфологічним змінам у піддослідних особин (Spano et al., 2004; Suzawa et al., 2008; Vasanth et al., 2015). Вплив атразину в концентрації 1000 мкг/л протягом 7-21 дня призводив до зниження рівня тестостерону та естрадіолу в плазмі крові, але не впливав на рівень вітелогеніну у самців *Carassius auratus* (Spano et al., 2004). Цілком імовірно, що вітелогенез не є основною пріоритетною мішенню для фосфорорганічних пестицидів, але вони можуть впливати на нього, особливо у випадку сумісного впливу (De Anna et al., 2021; Falfushynska, H. et al., 2022a; Khatib et al., 2022).

Ген *CYP19* кодує ароматазу – фермент, який перетворює тестостерон на естрадіол. На прикладі нокаутних ліній даніо *cyp19a1a*^{-/-} (тільки самці) було доведено, що ароматаза відіграє важливу роль у регулюванні диференціації та розвитку яєчників, а також контролює фізіологічні функції естрогенів у риб (Lau et al., 2016; Zhang et al., 2013a). Ароматаза також бере участь в управлінні численними фізіологічними процесами, пов'язаними з розмноженням і підтримкою маскулінізації статевої поведінки самців. У даній, які піддавалися впливу 0,001, 0,01 та 0,1 мг/л 40% монокротофосу протягом 40 днів,

спостерігалось значне збільшення експресії як гонадної, так і мозкової ароматази (CYP19a1a, CYP19a1b), фактора транскрипції виличкової головки (FOXL2) та частки самок (71%), а також пригнічення фактора транскрипції 1, пов'язаного з подвійною статтю/mab-3 (DMRT1) (Zhang et al., 2013a). Вважається, що фосфорорганічні та триазинові пестициди впливають на активність ароматази, відіграючи роль алостеричних активаторів або тригерів редуктази цитохрому P450, ефектора конформації ароматази (Zhang et al., 2020). Зокрема, було показано, що гліфосат частково і помірно інгібує ароматазу в клітинах MCF-7, що сильно залежить від концентрації субстрату. Крім того, було виявлено, що за нижчої концентрації гліфосату (1 μ M) інгібування є неконкурентним, проте за вищої концентрації (5 μ M) інгібування переходить у режим змішаного інгібування (Zhang et al., 2020).

У той же час, хлорфенвінфос, хлорпірифос, тетрахлорвінфос належать до пестицидів, які не пригнічують ароматазу в клітинах JEG-3 (Vinggaard et al., 2000). Зважаючи на спорадичну інформацію щодо процесів вітелогенезу у риб за впливу пестицидів, гени ароматази та CYP19 потребують подальшого вивчення щодо можливого впливу фосфорорганічних та триазинових пестицидів. Крім того, використання телеостів для глибшого вивчення механізмів і наслідків дії пестицидів, що порушують роботу ендокринної системи, може бути більш значущим і ефективним, ніж дослідження *in vitro* з використанням людських клітинних ліній.

Широкий спектр пестицидів, включаючи фосфорорганічні сполуки та триазини, може впливати на гомеостаз щитоподібної залози. Атразин, малатіон і хлорпірифос можуть впливати на синтез тиреотропів, що призводить до зниження рівня тиреотропіну (Leemans et al., 2019). Через гормонозалежний механізм хлорпірифос перешкоджає досягненню статевої зрілості хірургових риб (*Acanthuridae*) (Holzer et al., 2017). Вплив на карася *Carassius auratus* монокротофосом у діапазоні концентрацій 0,01-1 мг/л протягом 21 дня призводив до значного зниження рівня Т3 у плазмі крові та

зміни експресії генів, що реагують на гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдну вісь (ГГТ) (Tian et al., 2009; Zhang et al., 2015). З іншого боку, екологічно реальні концентрації фосфорорганічних та триазинових пестицидів можуть імітувати синтез трийодтироніну, як це було продемонстровано у жовтохвостій риби тетра (*Astyanax altiparanae*) після впливу 10 мкг/л атразину протягом 30 днів, у смугастого данію після 0,1 та 3 мкг/л хлорпірифосу протягом 14 днів, а у мишей після короткочасного впливу низьких доз хлорпірифосу, поряд зі значним пошкодженням тканини щитоподібної залози, спостерігалися нерівні контури фолікулів щитоподібної залози та незначна кількість або відсутність колоїду (Destro et al., 2021; Falfushynska et al., 2022a; Otênio et al., 2022). Цікаво, що збільшення рівня загального тестостерону і Т3 спостерігалося при взаємодії з діетилтіофосфатом, неспецифічним метаболітом фосфорорганічних пестицидів (Suárez et al., 2021). Модуляція продукції Т4 в щитоподібній залозі, підвищення активності UDPGT і SULT, ферментів, що беруть участь у печінковому метаболізмі тиреоїдних гормонів, і сприяння екстратиреоїдному перетворенню Т4 в Т3, що каталізується дейодиназою, є потенційними механізмами, що лежать в основі гіпотиреоїдного впливу фосфорорганічних пестицидів (Suárez et al., 2021). Крім того, фосфорорганічні сполуки здатні приєднуватися до мембранних рецепторів тиреоїдних гормонів шляхом молекулярного докінгу, що підтверджує результати експерименту з конкурентним зв'язуванням. Кількісне протеомне дослідження показало, що трис(1,3-дихлор-2-пропіл) фосфат спричиняє неправильну експресію білків в ембріональному розвитку смугастика. Ці білкові взаємодії можуть бути пов'язані з мембранним рецептором тиреоїдного гормону, який, у свою чергу, може бути важливим посередником у порушенні тиреоїдного гормону під впливом фосфорорганічних сполук (Li et al., 2021).

Останні дослідження показують, що у смугастого данію атразин впливає на експресію генів, пов'язаних з ендокринними порушеннями, набагато сильніше, ніж хлорпірифос. У той же час, глюкокіназа, яка діє як сенсор

глюкози і пов'язана з діабетом та гіпоглікемією, виявилася серед генів, що порушуються впливом обох пестицидів (Bloun et al., 2002). Варто зазначити, що пов'язана з пестицидами стимуляція холінергічних рецепторів та нікотинових ацетилхолінових рецепторів може призвести до порушень секреції інсуліну та глюкагону у тварин та людей (Xiao et al., 2017). Хоча риб'ячий інсулін був одним з перших виділених інсулінів хребетних тварин, а риб'ячі моделі стали найбільш широко використовуваними для вивчення вироблення та метаболізму гормонів підшлункової залози (Plisetskaya, 1989), механістичні дослідження гормональних реакцій підшлункової залози на фосфорорганічні та триазинові пестициди залишалися поза увагою науковців. Лише в кількох дослідженнях було розкрито негативний вплив фосфорорганічних пестицидів на запаси гранул зимогену в підшлунковій залозі риб, виснаження запасів глікогену а також зміни в експресії генів, що беруть участь у метаболізмі глюкози в печінці (Blount et al., 2002; Vui-Nguyen et al., 2015). З іншого боку, наявна інформація щодо людей, які постійно піддаються впливу фосфорорганічних пестицидів різними шляхами, дозволяє зробити висновок про потенційний зв'язок між опосередкованим фосфорорганічними пестицидами пошкодженням бета-клітин підшлункової залози, підвищеним печінковим глюконеогенезом і системним запаленням, з одного боку, та цукровим діабетом, з іншого (Chung et al., 2002). Отже, поглиблене вивчення токсичності пестицидів для підшлункової залози, особливо з використанням риб як моделі для механістичних досліджень через схожість реакцій з вищими хребетними тваринами, належить до нагальних наукових потреб (Plisetskaya, 1989).

Відтак, опубліковані дослідження надають певні докази того, що екологічно релевантні концентрації фосфорорганічних і триазинових пестицидів можуть діяти як ендокринні дизраптори і впливати на кортикостероїдний статус, гормони підшлункової залози та рівновагу щитовидної залози у риб. Однак конкретний спосіб їх дії ще належить

з'ясувати. Крім того, необхідно дослідити ширший спектр пестицидів через недостатність даних щодо деяких широко використовуваних пестицидів, які можуть впливати на нецільові об'єкти.

Проведений ретельний аналіз дозволив нам виявити деякі прогалини в науковій думці щодо з'ясування потенційного негативного впливу пестицидів на рибу та їхні життєві процеси: а) більшість досліджень присвячено прісноводним риbam. Необхідно докласти зусиль для вивчення реакції морських риб, особливо у випадку механістичного підходу, беручи до уваги видову специфіку та режим солоності, які можуть впливати на біоаккумуляцію; б) мало відомо про вплив триазинових гербіцидів, зокрема тербутилазину та симазину, на біохімічні ознаки нецільових організмів, незважаючи на те, що ці речовини широко використовуються і здатні спричинити серйозну шкоду; в) усі дослідження на людях і тваринах підтверджують ідею про те, що пестициди сприяють надлишковому утворенню активних форм кисню та нітрогену, які, в свою чергу, можуть ініціювати окисне пошкодження ліпідів, білків та ДНК. Незважаючи на те, що NO (iNOS) відіграє двояку роль у захисті гризунів від впливу пестицидів, відповідній ролі NO у риб приділялося мало уваги; г) інфламазом і піроптоз опосередковано через мітохондріальний окисний стрес можуть бути альтернативними механізмами шкідливого впливу фосфорорганічних пестицидів на рибу; ґ) щонайменше половина досліджень присвячена оцінці гострого короткострокового пошкоджуючого впливу пестицидів на нецільові організми. Цьому напряму досліджень слід приділяти більше уваги, оскільки риба піддається впливу забруднювачів в екологічно реальних концентраціях, але не в гострих. Слід також брати до уваги довгостроковий вплив, оскільки пестициди можуть підвищувати чутливість організму до додаткових негативних впливів, шкодячи стійкості та здоров'ю організму, що може проявитися лише при появі додаткового стресора або на більш пізньому етапі життя; д) мало досліджень присвячено ефектам сумішей, незважаючи на те, що вони найбільш повно моделюють ситуацію в природних

водоймах; е) слід розробити всеохопну стратегію для вирішення проблеми з високонебезпечними пестицидами, зокрема, шляхом розробки недорогих і високоефективних протоколів оцінки ризиків для виявлення пестицидів, що становлять найбільший ризик для здоров'я людини; є) розробка заходів з пом'якшення наслідків впливу пестицидів шляхом імплементації нових, альтернативних, менш небезпечних рецептур пестицидів з їх попередньою оцінкою ризиків на основі біомаркерів.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Умови утримання тварин

Дослідження проводились на дорослих особинах акваріумної риби родини Коропових, даніо реріо *Danio rerio* АВ-дикого типу. Тварин закупаляли у локального провайдера, комерційного об'єднання «Зоосвіт», та доставляли у лабораторію. Для аклімації до лабораторних умов, риб утримували у відстояній, аерованій воді протягом 7 днів. Експерименти проводились у акваріумах об'ємом 5 л, з використанням загальноприйнятої схеми токсикологічних експериментів. У воді, де знаходилися піддослідні риби, підтримували рівень кисню на рівні 7,0 – 8,0 мг/л, вуглекислого газу – 2,2–2,8 мг/л, а рН – 7,6 – 8,0. Також постійно контролювали рівень аміаку, нітритів та нітратів загальноприйнятими аналітичними методами.

Після завершення аклімації, тварини випадковим чином розподіляли на контрольну та дослідні групи. Воду відстоювали і змінювали кожні дві доби, з введенням досліджуваної сполуки у воду експериментальних груп. Кількість особин у групі коливалася в межах 8-10 смугастих даніо. Температура води підтримувалась на рівні $18 \pm 0,5$ °С. Тварин годували подрібненим комерційним кормом «Акваріус» (Україна). Інкубація тривала 14 діб.

Для дослідження було обрано раундап, тербутилазин, хлорпірифос та малатіон, які є найбільш популярними відповідно до обсягів річних продажів та використання у світових масштабах (EPA, 2023; beyondpesticides, 2023), а також фонового вмісту у поверхневих водах та ґрунтах (Statista (2023)). Застосовані концентрації пестицидів були визначені як екологічно-релевантні у відповідності із наявними даними в літературі щодо медіальних летальних концентрацій для коропових риб, у тому числі на прикладі даніо (de Brito Rodrigues et al., 2017) і середнього вмісту досліджуваного пестицидів у

поверхневих водах (Peruzzo et al., 2008). Для дослідження комбінованого впливу гербіцидів та інсектицидів, як відтворення умов реальної екосистеми, було сформовано низку експериментальних серій за схемою, наведеною на рис. 2.1. Номінальні концентрації пестицидів, за яких проводили експозиції смугастого данію теж наведені на рис. 2.1.

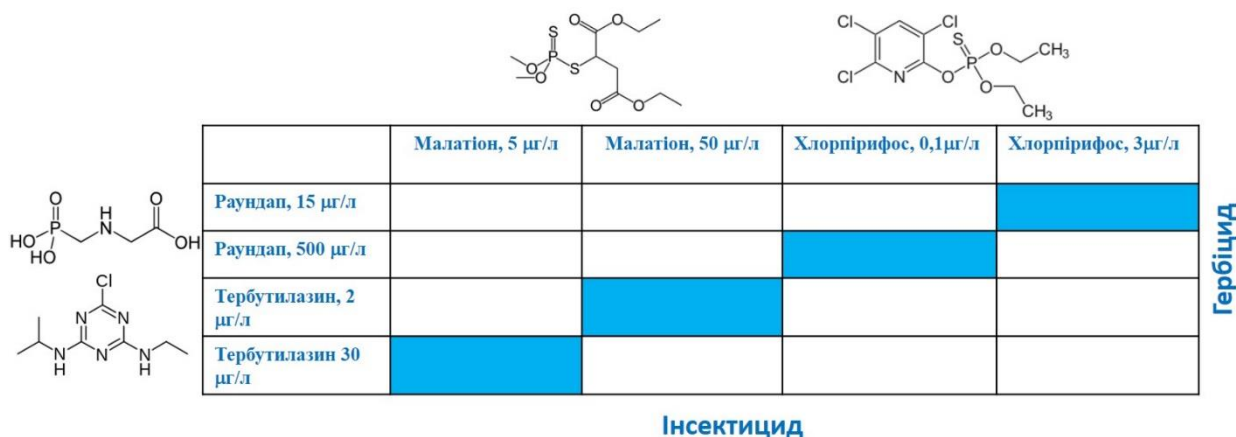


Рис. 2.1. Схема експозиції смугастого данію в присутності пестицидів протягом 14 діб

Експерименти на тваринах проводились відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для польових та лабораторних експериментів (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000) та рішення етичної комісії Тернопільського національного педагогічного університету (Протокол № 2/2020, від 3 серпня 2020 р.).

Після завершення експерименту, риб умертвляли, попередньо піддавши їх гіпотермічному шоку у системі лід:вода. Згодом, за допомогою інсулінового шприца відбирали кров з серця та виділяли еритроцити шляхом центрифугування цільної крові при $1000\times\text{g}$ протягом 15 хвилин. Забір тканини печінки та мозку виконували за температури 4°C . Концентрацію протеїнів у розчинній фазі гомогенату тканин визначали за методом Лоурі та співавт. (Lowry et al. 1951).

Усі реактиви, за винятком зазначених окремо, були закуплені у ТОВ «Сінбіас» (Китай) та мали кваліфікацію «охч» або «хч».

2.2. Біохімічні методи дослідження

2.2.1. Показники антиоксидантно-прооксидантної системи

Для оцінки стану системи антиоксидантного захисту визначали каталазну активність та показники глутатіон (GSH)-залежної системи, у тому числі рівень окисненого та відновленого глутатіону, глутатіон-трансферазну (GST) і глутатіон-редуктазну (GR) активність. Ефективність функціонування антиоксидантів оцінювали за рівнем утворенням активних форм кисню, нітрогену, а також концентрацією продуктів перекисного окиснення ліпідів і карбонільних похідних протеїнів. Для дослідження виготовляли гомогенат тканини печінки (1:10, v/v) в 50 мМ К-фосфатному буферному розчині (рН 7,4), використовуючи електричний гомогенізатор Поттера в системі тефлон/скло. Для дослідження активності ферментів цитозоль одержували розчинну фазу гомогенату S16 шляхом його центрифугування протягом 20 хв. при 16 000×g.

2.2.1.1. Показники системи антиоксидантного захисту

Активність каталази (ЕС 1.11.1.6) як ключового ензиму антиоксидантного захисту визначали у S16 розчинній фазі гомогенату тканини печінки данію (Aebi et al. 1974) з використанням гідроген пероксиду як субстрату реакції. Активність каталази реєстрували за зменшенням оптичної густини при 240 нм внаслідок його розкладу під дією каталази. Активність каталази обраховували з використанням мілімолярного коефіцієнту екстинкції $\epsilon = -0,04 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ і виражали в мкмоль/(мг розчинного протеїну*хв).

Вміст загального глутатіону визначали в безпротеїновому екстракті гомогенату тканини печінки за допомогою реактиву Елмана (Anderson, 1985). З цією метою гомогенат печінки смугастого данію інкубували з 20% розчином трихлороцтової кислоти та для визначення використовували надосадову фракцію, отриману шляхом центрифугування протягом 15 хв при 6 000×g. Принцип методу ґрунтується на здатності реактиву Елмана, 5,5-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБ), окиснювати глутатіон, з утворенням 5-тіо-2-

нітробензойної кислоти. Перед початком визначення здійснювали відновлення GSSG до GSH за допомогою глутатіонредуктази (50 U/ml). Рівень утворення 5-тіо-2-нітробензойної кислоти вимірювали спектрофотометрично при 412 нм з інтервалом 30 с протягом 2 хв. Стандартні розчини виготовляли з відновленого глутатіону. Концентрацію виражали в мкмоль на г вологої маси тканини.

Для визначення *вмісту окисненого глутатіону* перед початком визначення зразок безпротеїнової фракції інкубували з 2-вінілпіридином протягом 60 хв у кінцевій концентрації вмісту 2 % (Griffith, 1980). Редокс-індекс глутатіону визначали за формулою $PI\ GSH = [GSH] / ([GSH] + 2[GSSG])$.

Глутатіон-S-трансферазну [КФ 2.5.1.18] *активність* визначали за рівнем утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензену з глутатіоном. Реакцію ініціювали шляхом додавання до реакційної суміші спиртового розчину 1 мМ 1-хлоро-2,4-динітробензену. З метою уникнення пошкоджуючого впливу етанолу на хід реакції, фінальна концентрація етанолу в пробі не перевищувала 2-4 %. Утворення адукту S-2,4-динітрофенілглутатіону спостерігали за збільшенням інтенсивності абсорбції при довжині хвилі 340 нм. Глутатіон-S-трансферазну активність обраховували за допомогою мілімолярного коефіцієнту екстинкції ($9.6\text{ мМ}^{-1}\text{ см}^{-1}$) (Habig, 1974).

2.2.1.2. *Активні форми кисню та показники окисного ушкодження*

Інтенсивність утворення активних форм кисню (ROS) у супернатанті S16 гомогенату тканини печінки смугастого даніо оцінювали за допомогою нефлуоресцентного деривату дигідрородаміну, який за умов проходження реакції з активними формами кисню перетворюється на флуоресцентний продукт родамін 123. Гомогенат печінки (1:10, v/v) готували з використанням 20 мМ HEPES-сахарозного буферу, рН 7,4. Флуоресценцію утвореного родаміну 123 реєстрували при довжині хвилі збудження (ex.)=485 нм та випромінювання (em.)=538 нм (Viarengo et al., 1999) на мікропланшетному рідері *f*-max Molecular Device (США). Інтенсивність утворення активних форм

оксигену виражали в умовних одиницях флуорисценції за одиницю часу.

Вміст *продуктів пероксидації ліпідів та карбонільних похідних протеїнів* визначали в спільній пробі гомогенату тканин печінки коропоної риби *D. rerio* після осадження протеїнів за допомогою 20 % сульфосаліцилової кислоти. Безпротеїновий супернатант використовували для визначення продуктів пероксидації ліпідів, а протеїновмісний осад – для визначення карбонільних похідних протеїнів (Лушак та ін., 2004; Ohkawa et al. 1975).

Рівень перекисного окиснення ліпідів визначали за утворенням ТБК-активних продуктів у реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за методикою (Ohkawa et al., 1979). Рівень перекисного окиснення ліпідів обраховували з використанням молярного коефіцієнту екстинції комплексу $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, співвідносячи його з інтенсивністю світлопоглинання комплексу при 532 нм. Рівень перекисного окиснення ліпідів у тканині печінки перераховували на грам вологої тканини.

Концентрацію карбонільних похідних протеїнів визначали з огляду на їх здатність реагувати з 2,4-динітрофенілгідразином та утворювати забарвлені комплекси, розчинні у 8 М розчині сечовини (Лушак та ін., 2004). Оптичну густину реєстрували при 370 нм проти контрольної проби, що містила протеїни, без додавання 2,4-ДНФГ. Вміст фенілгідразонів обраховували з використанням молярного коефіцієнту екстинції $\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.2. Цито- та нейротоксичність

Порушення *стабільності лізосомальних мембран* визначали за допомогою катіонного барвника – нейтрального червоного. Стабільність мембран лізосом визначали в лізосомах гепатоцитів печінки смугастого данію. Гепатоцити виділяли шляхом градієнтного центрифугування за допомогою 0,08 М розчину CaCl_2 . До одержаної суспензії лізосом додавали розчин нейтрального червоного у фінальній масовій концентрації 0,004 %. Суспензію інкубували протягом 2 год, після чого відмивали лізосоми від

неакумульованого барвнику. Акумульований барвник екстрагували з інтактних клітин етанольно-оцтовою сумішшю (етанол та оцтова кислота в еквівалентних об'ємах) та визначали світлопоглинання при довжині хвилі 550 нм (Vazzana et al. 2016).

Порушення стабільності ДНК визначали методом лужного осадження в гомогенаті тканини печінки (1:5, v/v), який готували з використанням 50 мМ трис-ЕДТА буферу, рН 8,0, який містив 0,5 % натрію додецил сульфату (Olive, 1988). Рівень фрагментації ДНК визначали в супернатанті гомогенаті тканини печінки, що містив безпротеїнову фракцію ДНК з використанням барвника Hoescht 33342 в присутності 4 мМ натрій холату (Bester et al., 1994). Реакцію проводили в 0,1 М трис буферному розчині, рН 9. Рівень флуоресценції реєстрували при хвилі збудження (ex.)=360 нм та емісії (em.)=450 нм одразу та після 15 хв інкубації у темряві. Рівень фрагментації ДНК виражали у відсотках до вмісту загальної ДНК.

Активність холінестерази (ЕС 3.1.1.7) визначали колориметричним методом у гомогенаті мозку смугастого даніо у фосфатному буфері (1:10, v/v) з використанням реактиву Елмана (Ellman et al., 1961). В основі метода лежить здатність холінестерази гідролізувати ацетилтіохолін йодид при 25 °С. Активність холінестерази обраховували з використанням коефіцієнту екстинкції $\epsilon=14300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і виражали в нмоль гідролізованого ацетилтіохолін йодиду/хв⁻¹мг* протеїну⁻¹.

Активність лактатдегідрогенази (ЕС 1.1.1.27) визначали за інтенсивністю окиснення НАДН. Реакцію проводили у фосфатному буфері рН 7,4 у присутності натрій пірувату при довжині хвилі 340 нм. Швидкість конвертації НАДН в НАД реєстрували протягом 4 хв. Активність ферменту обчислювали з використанням молярного коефіцієнту екстинкції для НАДН ($\epsilon=6,22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) і виражали в мкмоль/(хв*мг протеїну) (Bergmeyer and Bernt, 1974).

Для аналізу набухання мітохондрій як маркера розкриття пори, свіжоізольовані мітохондрії (0,4 мг/мл) інкубували при 37 °С в 0,1 мл інкубаційного буфера, що містить 200 мМ сахарози, 10 мМ трис-мопс, 5 мМ α -кетоглутарату, 2 мМ малату, 1 мМ Pi, 10 мкМ EGTA-Tris, рН 7,4. Набухання мітохондрій визначали шляхом моніторингу зменшення розсіюння світла при 525 нм за наявності або відсутності Ca^{2+} (Jang and Javadov, 2017).

2.2.3. Маркери апоптозу та аутофагії

Інтенсивність процесів апоптозу/аутофагії оцінювали за активністю каспази 3 та лізосомального катепсину D.

Активність каспази 3 визначали за п-нітроаніліном, утвореним в результаті гідролізу ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп п-нітроаніліду (DEVD) під дією каспази 3 у гомогенаті печінки після лізування клітин з використанням лізуючого буфера (4 % Тритон X-100, 5 мМ ЕДТА, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl_2 та 350 мкг/мл ФМСФ). Утворення п-нітроаніліну реєстрували при довжині хвилі 405 нм через 2 години інкубації лізату тканини печінки данію в присутності DEVD при температурі 37 °С. Активність каспази-3 обраховували з використання коефіцієнту екстинкції $2.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ і виражали в нмоль/г тканини (Bonomini et al., 2004).

Активність катепсину D визначали спектрофотометрично за інтенсивністю перебігу ферментативного гідролізу гемоглобіну. Для аналізу використовували 50% гомогенат печінки у 0,25 М розчині сахарози, який в подальшому піддавали гідролізу за допомогою 0,01% розчину тритону X-100. Для визначення вільної активності ферменту реєстрували різницю оптичної густини між дослідом (проба на вільну активність ферменту) і контролем без тритону X-100, загальної – між дослідом і контролем з тритоном X-100. Активність *катепсину D* обраховували з використанням калібрувальної кривої, побудованої з використанням гемоглобіну і виражали в нмоль /хв⁻¹мг* протеїну⁻¹ або нмоль /хв⁻¹г⁻¹ тканини (Barrett, 1976).

2.2.4. Показники метаболічного стану та біотрансформації

Активність сукцинатдегідрогенази (ЕС 1.3.99.1) визначали фероціанатним методом, який базується на окисненні сукцинату до фумарату фероціанатом калію за дії сукцинатдегідрогенази (Dua and Gill, 2004). Дослідний зразок інкубували в 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,8) з 0,1 М бурштиною кислотою, 25 мМ ЕДТА та 25 мМ $K_3Fe(CN)_6$ і витримували у термостаті при $+30^\circ C$ протягом 15 хв. Реакцію зупиняли внесенням 20% розчину трихлороцтової кислоти. Рівень утворення сукцинату визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 420 нм. Активність ензиму виражали у нмоль сукцинату/мг білка·хв.

Метилгліоксаль, як побічний продукт гліколізу, вимірювали у тканині печінки риб шляхом реакції з реактивом Жирара в слабколужному середовищі за методикою Мітчела (Mitchel and Birnboim, 1977) та визначали концентрацію з використанням молярного коефіцієнту екстинкції $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 325 нм і виражали у нмоль/г тканини.

Активність *карбоксилестерази* вимірювали у мікросомальній фракції із застосуванням субстрату п-нітрофенілацетату. Інтенсивність гідролізу п-нітрофенілацетату оцінювали за зниженням оптичної густини комплексу при 405 нм. Вміст п-нітрофенолу визначали використовуючи коефіцієнт екстинкції $18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lushchak, 2011).

2.2.5. Маркери ендокринних розладів

Концентрацію кортизолу, трийодотироніну та імуноглобуліну М у сироватці крові смугастого данію визначали за допомогою імуноензимного аналізу з використанням стандартних наборів (K210 та K201 “Хема”). В якості позитивного контролю використовували зразки сироватки крові людини. Світлопоглинання утвореного імуного комплексу реєстрували при 492 нм на імуноферментному аналізаторі Stat-Fax-303+ (Awareness Technology, США).

Лінійність вимірів оцінювали з використанням серійних розведень зразків. Допустимою межею лінійності вимірів вважали значення з коефіцієнтом детермінації $R^2 = 0,97 \pm 0,02$.

2.2.6. Полімеразна ланцюгова реакція (RT-PCR)

Загальну РНК екстрагували із тканини печінки даніо за допомогою тризолу (Sigma, St. Louis, MO) відповідно до рекомендацій виробника. cDNA синтезували за допомогою стандартного набору High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Berlin, Germany) відповідно до рекомендацій виробника. ПЛР проводили з використанням системи StepOnePlus Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Berlin, Germany) та стандартного набору реагентів Biozym Blue S'Green qPCR Mix Separate ROX kit (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany). Дані нормалізували використовуючи хаузкіперний ген – тубулін, позаяк в пробних експериментах він показав найменшу відмінність між досліджуваними групами.

Таблиця 2.1

Праймери таргетних та хаузкіперних генів *Danio rerio*

Гени	Forward primer (3'-5')	Reverse primer (3'-5')	Код доступу NCBI
Caspase 3	GACGCAAAGCGTGTGGATAC	GCCGATGTTGGGGTAGTTCA	NM_131877.3
KISS1	AACACATGGTGGTGGTCTCC	CTCTCTTGCCATAGCGGAGG	AB245404.1
Vtg	GGATCCAGAAATATATCAAGG AGGA	TGCAGTACAGCAGTGGTCTAA	NM_001044897.3
MK2	AATGGCGGCTGCAATGAAAG	GGCAAGATCAGGAGGTAGGC	NM_001101803.1
Bcl2	GCGGAGGGAACAACCTCTGAA	ATCCCGTAACACCCGGTAGA	AY695820.1
BAX	GACTTGGGAGCTGCACTTCT	CTGACTCCGGGTCACTTCAG	NM_131562.2
RAD51	CCGSTATGATGACCGAGTCC	CAGCATACGCAGAAAGCGTC	NM_213206.2
GADD45	AACCGTGTGGAGATAACGCA	CAGTGATGCAACCCTGAGGT	NM_001002216.1
Tubulin	GTTGGAGCTGAGAGTGTGGAA	CAATGGACAGGAAACACAGC A	NM_194388.2
Ubiquitin B	GTCTCCGAGGAGGCTCAGAT	GTGAGTGCATAAGCAGGGGA	NM_001013272.2

2.3. Математичні методи обробки даних

Результати вимірів даніо подані у вигляді $M \pm m$ для 8 тварин. Якщо дані

згідно тесту Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова не були нормально розподілені, до їх статистичного аналізу були застосовані непараметричні тести (Kruskall–Wallis ANOVA та Mann–Whitney *U*-test) при вірогідності за значення $p < 0.05$. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використання *t*-тесту Стьюдента для незалежних змінних. Вірогідним вважали відмінність між рядами за $p < 0,05$. Відповідність між двома рядами значень встановлювали за обчисленням коефіцієнту кореляції Пірсона.

Для з'ясування впливу діючих факторів та їх взаємних впливів на показники дані використовували одно- та двофакторний аналіз ANOVA та дискримінантний аналіз. Оцінку взаємозв'язку між окремими показниками тварин здійснювали за допомогою методу головних компонент та теплової карти (Heat Map Analysis). Аналіз формування кластерів з дослідних груп здійснювали за допомогою дискримінантного аналізу з модифікацією часткових найменших квадратів (PLS-DA) та *K*-кластерингу. Показники, які з найвищим ступенем достовірності розрізняють обрані експериментальні групи тварин визначали за допомогою побудови класифікаційного дерева, рендом форест аналізу (Random Forest Analysis) та дискримінантного аналізу з модифікацією часткових найменших квадратів (PLS-DA) використовуючи комп'ютерні програми Statistica v 12.0, Metaboanalyst та Exel для Windows-2016.

Для оцінки інтегральної відповіді організму використовували програму CALIBRI (<https://shiny.otelo.univ-lorraine.fr/calibri/R/>).

РОЗДІЛ III.

АНАЛІЗ РЕАКЦІЙ МОЛЕКУЛЯРНИХ СТРЕСОРНИХ СИСТЕМ, ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА МЕТАБОЛІЧНОЇ ВІДПОВІДІ У ТКАНИНАХ ДАНІО ЗА ВПЛИВУ РАУНДАПУ ТА ХЛОРПІРИФОСУ

Проведені дослідження виявили ряд біохімічних та цитогенетичних біомаркерів смугастого даніо, які найбільш чутливо реагують на вплив фосфорорганічних пестицидів (Табл. 3.1). В окремих випадках, як це наприклад для GSSG, LDH та ТБК-АП реакція була концентраційно-залежною або залежала від природи діючого чинника (напр. метилглюксаль, карбоніли протеїнів).

Таблиця 3.1

Одноваріантний дисперсійний аналіз впливу умов експозиції смугастого даніо в присутності раундапу та хлорпірифосу на фізіолого-біохімічні показники риб

Біомаркер	Умови експозиції	Біомаркер	Умови експозиції
Активні форми кисню	$F_{6,35} = 15.6$ $P < 0.001$	Фрагментація ДНК	$F_{6,35} = 10.2$ $P < 0.001$
Загальна антиоксидантна активність	$F_{6,35} = 28.6$ $P < 0.001$	Лактатдегідрогеназа	$F_{6,35} = 85.8$ $P < 0.001$
Активні форми нітрогену	$F_{6,35} = 5.1$ $P = 0.001$	Стабільність лізосомальних мембран	$F_{6,35} = 8.4$ $P < 0.001$
ТБК-АП	$F_{6,35} = 39.4$ $P < 0.001$	Катепсин D	$F_{6,35} = 7.9$ $P < 0.001$
Метилглюксаль	$F_{6,35} = 3.5$ $P = 0.001$	АХЕ	$F_{6,35} = 27.5$ $P < 0.001$
Карбоніли протеїнів	$F_{6,35} = 2.3$ $P = 0.056$	Каспаза 3	$F_{6,35} = 35.6$ $P < 0.001$
Загальний глутатіон	$F_{6,35} = 2.8$ $P = 0.026$	ВАН	$F_{6,35} = 15.2$ $P < 0.001$
Окиснений глутатіон	$F_{6,35} = 24.8$ $P < 0.001$	Bcl-2	$F_{6,35} = 9.0$ $P < 0.001$

GST	F_{6,35} = 16.5 P<0.001	AD51	F_{6,35} = 254.0 P<0.001
IgM	F_{6,35} = 108.8 P<0.001	Nrf2	F_{6,35} = 16.4 P<0.001
T3	F_{6,35} = 10.9 P<0.001	Vtg	F_{6,35} = 75.1 P<0.001
Кортизол	F_{6,35} = 36.1 P<0.001		

Примітка. Вплив експозиції вірогідний за P<0.05

3.1. Стан системи антиоксидантного захисту печінки даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу

Загальна антиоксидантна активність зростала лише за впливу екологічно реальної концентрації раундапу, з наступним її пригніченням за впливу високої концентрації (RH-група, Рис. 3.1). Хлорпірифос як за умов індивідуального впливу, так і в суміші призводив до загального пригнічення антиоксидантної активності гепатоцитів, спрямованої на нейтралізацію радикалів.

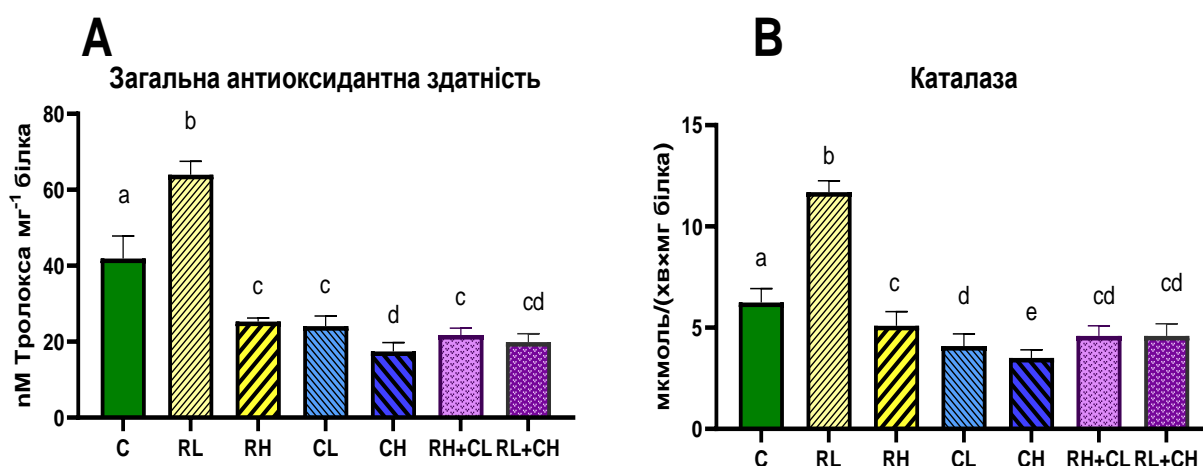


Рис. 3.1. Показники загальної антиоксидантної активності (А) та каталазної активності (В) у печінці даніо за дії раундапу (R) та атразину (A) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях.

Зміни каталазної активності мали односпрямований характер із змінами загальної антиоксидантної активності ($r=0.82$, $p<0.001$) (Рис. 3.1 В).

Пригнічення ферментів антиоксидантного захисту за впливу раундапу і хлорпірифосу у риб було відзначено також й іншими авторами (Goulart et al., 2015; Lushchak et al., 2009).

Відомо, що існує складний шлях взаємодії між ферментами, що беруть участь у системі антиоксидантного захисту організму, і що активність одного ферменту впливає на активність інших. Також відомо, що субстрат або продукт деяких антиоксидантних ферментів може впливати на активність інших. Зокрема, надлишок гідроген пероксиду може пригнічувати активність супероксиддисмутази, тоді як супероксид-аніон може спричиняти пригнічення каталазної активності (Samanta et al., 2014). Система супероксиддисмутаза=каталаза – це перший захисний бар'єр проти токсичності активних форм кисню, у тому числі за допомогою секвестрації утворених оксирадикалів (Bodnar et al., 2022), і ці ферменти часто використовуються як біомаркери, що вказують на регуляцію рівня утворених активних форм кисню (Monteiro et al., 2006). У нашому випадку, пригнічення системи антиоксидантного захисту з одного боку вказує на гармонічність змін реакції системи антиоксидантного захисту, однак з іншого її виснаження та неспроможність забезпечити захист організму від пошкоджувальної дії оксирадикалів, зокрема гідропероксидрадикалу, що утворюються в процесі метаболізму супероксиданіонрадикалу.

На тлі відсутності системних змін рівня загального глутатіону, рівень окисненого глутатіону зростав у всіх досліджуваних групах, а зміна його частки (Рис. 3.2А, Б) мала концентраційно-залежний характер, що вказує на зсув редокс-рівноваги у гепатоцитах коропоної рибки за присутності в середовищі навіть екологічно-релевантних концентрацій органофосфатів, у бік прооксидантних процесів. Активність глутатіон-редуктази за виключенням RL-групи, де вона зростала порівняно з контролем, відповідала рівню контролю, що, очевидно, демонструє перевищення адаптивної здатності ензиму та недостатній рівень конвертації окисненого глутатіону у відновлену

форму, що узгоджується із більшенням частки окисненої форми у структурі загального глутатіону (Рис. 3.2 Г).

Порівняння відповіді пулу клітинних тіолів печінки даніо за умов окремої дії пестицидів та їх співдії не виявило проявів адитивного впливу суміші гербіциду (раундапу) та інсектициду (хлорпірифосу). Водночас, можна відзначити домінуючу роль хлорпірифосу у формуванні відповіді системи глутатіону даніо на присутність суміші раундап/хлорпірифос у середовищі.

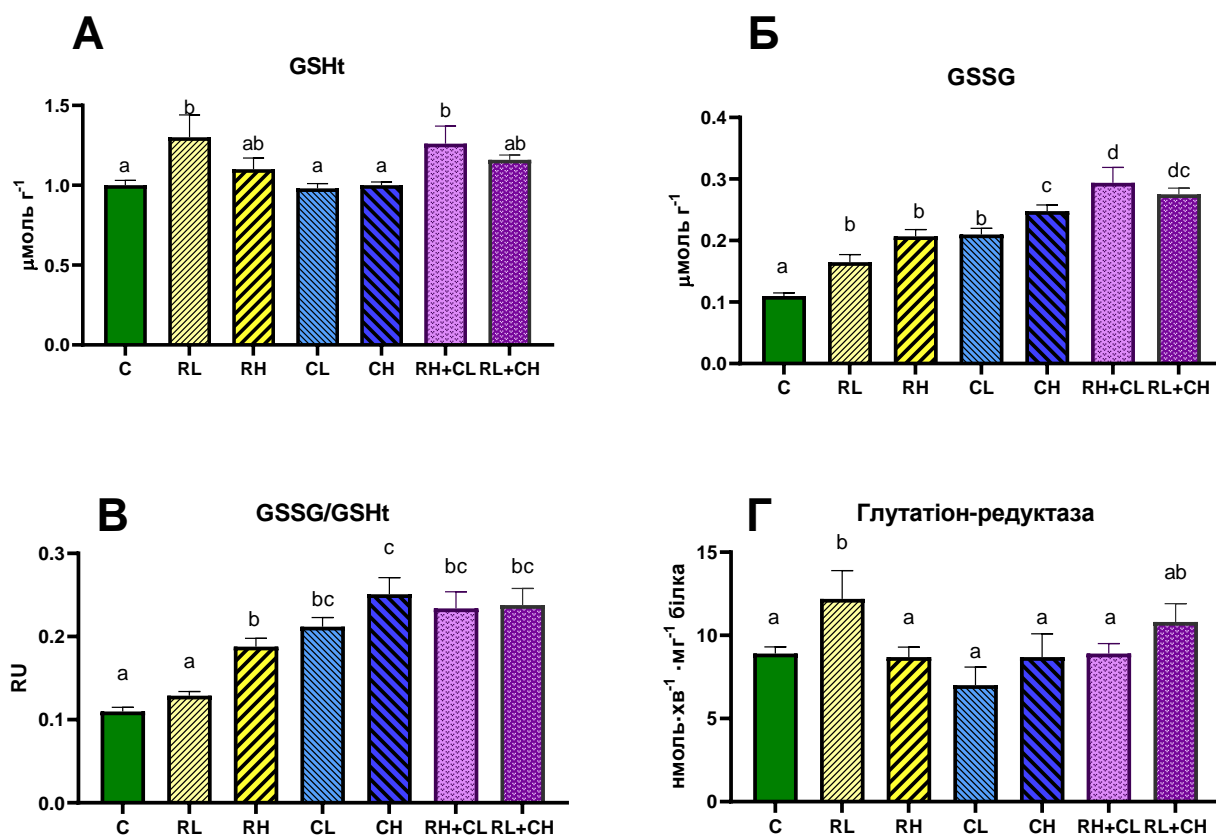


Рис. 3.2. Показники стану пулу клітинних тіолів у печінці даніо за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях.

Раундап не викликав змін рівня АФО, тоді як хлорпірифос, як за умов індивідуальної дії, так і в суміші, підвищував його (Рис. 3.3.А). Рівень активних форм нітрогену, визначений за вмістом нітроген оксиду підвищувався лише за впливу субтоксичних концентрацій досліджуваних пестицидів та в суміші, однак лише за умови присутності субтоксичної

концентрації хлорпірифосу (Рис. 3.3Б). Кореляція між рівнем активних форм кисню та нітрогену відсутня ($r=0.32$, $p>0.05$).

З іншого боку рівень метилглюксалу, як показника активних карбонільних похідних, проявляв підвищену чутливість до хлорпірифосу, за впливу якого рівень α -карбонільних похідних протеїнів, як показника карбонільного стресу зростав вдвічі (Рис. 3.3В).

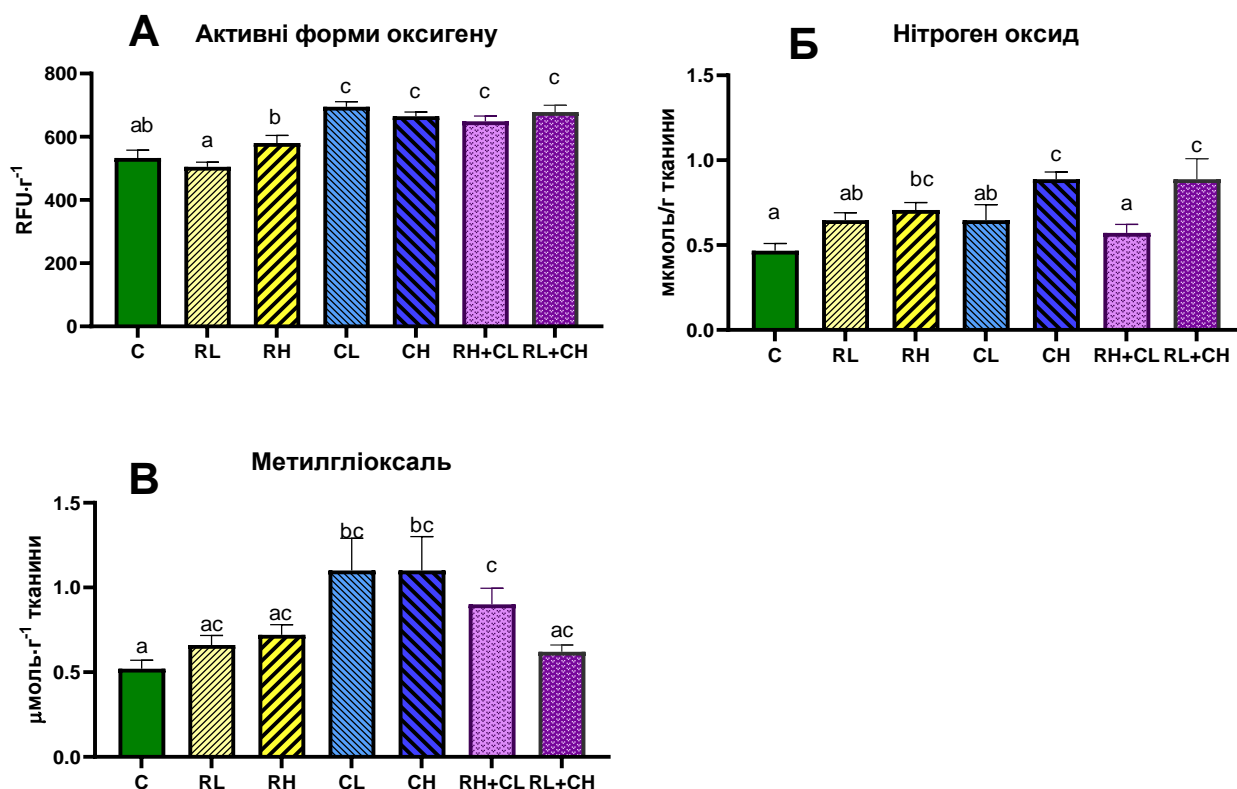


Рис. 3.3. Показники окисного, нітрозативного та карбонільного стресу у печінці данію за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях.

Незважаючи на незначне підвищення АФО, однак некомпенсоване системою антиоксидантного захисту, рівень окисної деструкції ліпідів значно зростав у всіх дослідних групах, особливо за впливу суміші раундапу та хлорпірифосу, де діапазон його варіабельності перевищував 7 (Рис. 3.4А). Разом з тим, протеїни виявилися більш стійкими до фосфорорганічних пестицидів: ознаки окисної деструкції були виявлені тільки в групі

хлорпірифосу (Рис. 3.4.Б). У більшості випадків пригнічення антиоксидантів корелюють із підвищеним рівнем АФО у клітині ($r > 0.6$, $p < 0.01$) та проявами окисного ушкодження біомолекул (Рис. 3.5).

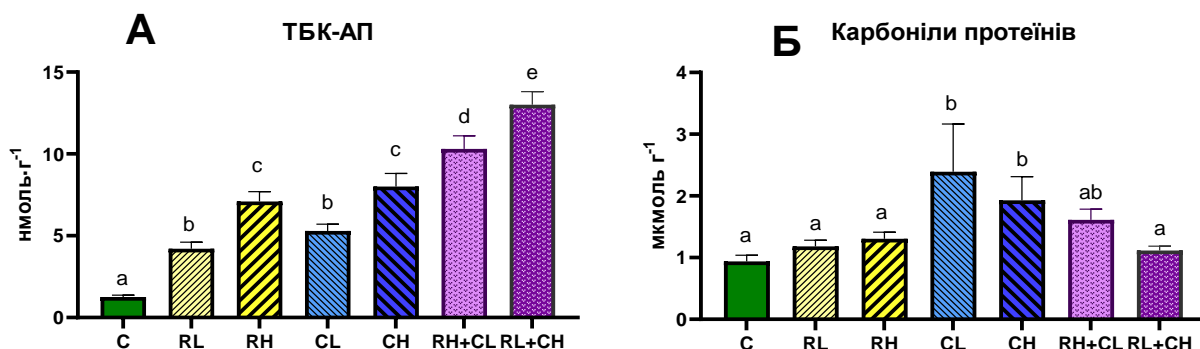


Рис. 3.4. Рівень окисних модифікацій ліпідів (А) та протеїнів (Б) печінки данію за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях.

Збільшений рівень продуктів пероксидації ліпідів, зокрема малонового діальдегіду, вважається ознакою окисного стресу в риб за умов пестицидної інтоксикації. Так, наприклад, вплив пестицидів аполло (клофентезин) та манкоцебу на коропа в екологічно реальних концентраціях протягом 14 діб призвів до значного накопичення ТБК-АП у печінці та зябрах, однак лише у тварин референційної популяції, які не були преадаптовані до хронічного впливу фонових концентрацій пестицидів (Falfushynska et al., 2012). Також, вплив хлорпірифосу (25 мкг/л), гліфосату (3,5 мг/л) та їх суміші у концентрації викликав підвищений вміст малонового діальдегіду у мозку данію, причому сумісний вплив пестицидів мав ознаки синергічного впливу, позаяк призводив до більш істотного підвищення ТБК-АП порівняно з індивідуальним впливом (Zhang et al., 2013a), що було відзначено і в нашому дослідженні, однак за значно нижчих концентрацій.

З іншого боку повідомляють про відсутність накопичення продуктів окисної деструкції ліпідів у мальків риб *Jenynsia multidentata* за впливу 100 мкг/л гліфосату, що пов'язують із високоефективною системою

антиоксидантного захисту та детоксикації. Однак, це не дозволило запобігти розвитку порушення рухових функцій (Bonansea et al., 2017).

Відтак, вплив фосфорорганічних пестицидів у екологічно реальних та субтоксичних концентраціях викликає у смугастого даніо значні прояви окисного стресу, зокрема пригнічення антиоксидантів, активацію проокисних процесів та деструкції біомолекул. Продукти окисного ушкодження, які накопичуються у тканинах, в свою чергу можуть виступати тригерами подальших патологічних процесів у клітині. Разом з тим, нітроген оксид (нітрозативний стрес) та, особливо, метилглюксаль (карбонільний стрес) були більш толерантними та селективними до впливу фосфорорганіки та проявляли підвищену чутливість до хлорпірифосу.

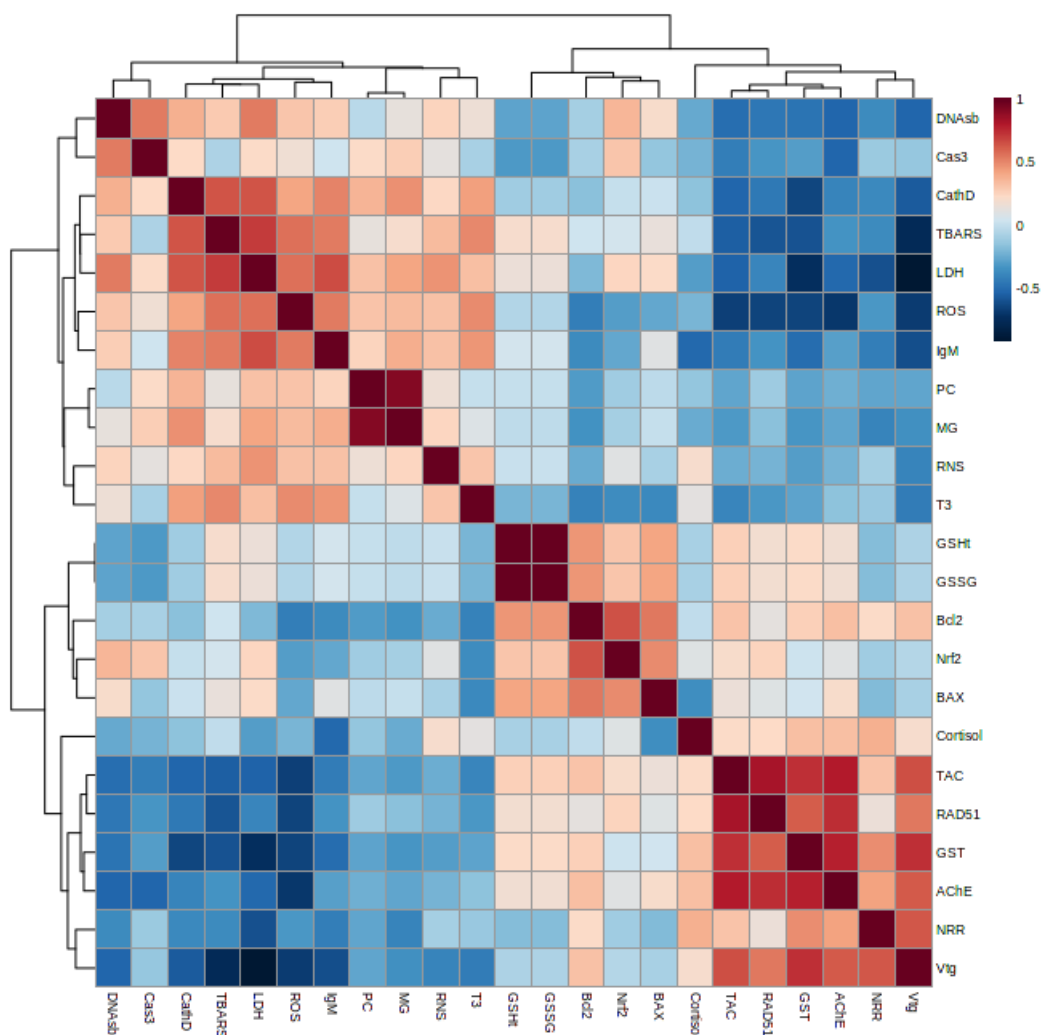


Рис. 3.5. Матриця кореляцій показників печінки, крові та мозку смугастого даніо за впливу фосфорорганічних пестицидів.

3.2. Стан лізосом та мітохондрій гепатоцитів даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу

Лізосоми, як один з ключових елементів метаболічних процесів, стають все більш популярними як чутливий біомаркер для оцінки впливу забруднювачів водних екосистем. Дослідження впливу пестицидів показало можливість використання показників стабільності лізосомальних мембран у гепатоцитах даніо, як неспецифічного маркера стресу. Зокрема, лізосоми у всіх дослідних групах, незалежно від природи діючого чинника та концентрації, втрачають здатність утримувати нейтральний червоний (Рис. 3.6.А). Також підвищується загальна активність аспартатендопротеази – катепсину Д, за винятком RL-групи (Рис. 3.6.В). Найбільше зростання активності катепсину Д (~27% у порівнянні з контролем) було виявлено у риб, за впливу хлорпірифосу у концентрації 3 мкг/л. Виявлені ефекти порушення морфологічної та функціональної активності лізосом можуть призвести до активації лізосомально-опосередкованого апоптозу та / або аутофагії.

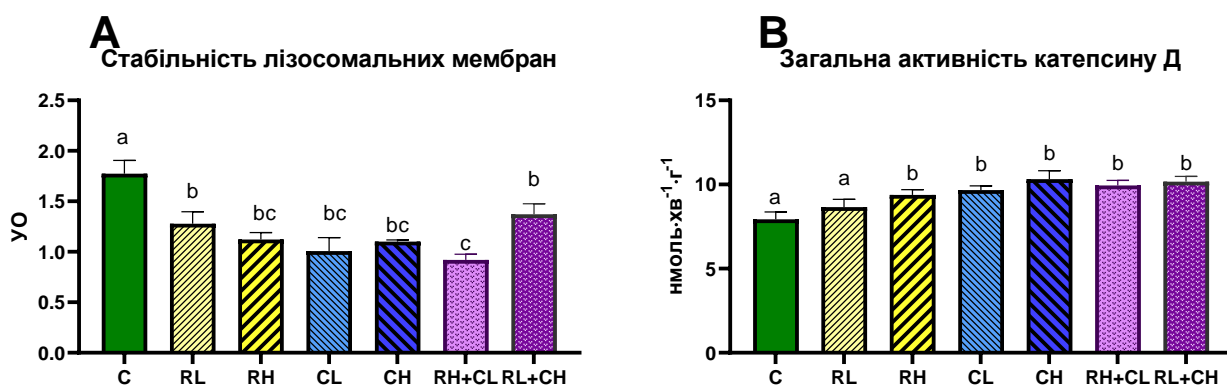


Рис. 3.6. Стабільність лізосомальних мембран та активність катепсину Д гепатоцитів даніо за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях

Визначення показників, що характеризують стан мітохондрій, дозволив виявити за умов експерименту істотні зміни як у їх морфології, так і у функціональних характеристиках. У всіх групах тварин було виявлено ознаки

набрякання мітохондрій, особливо істотне за впливу раундапу та суміші пестицидів. Варіабельність показника в цих групах сягала його 10-кратного збільшення (Рис. 3.7А). Разом з тим, більш глибокі функціональні зміни зв'язані з розладами ланцюга транспорту електронів, зокрема комплексу II, були виявлені за впливу хлорпірифосу та суміші (Рис. 3.7В). Це очевидно вказує на різні механізми ураження мітохондрій досліджуваними пестицидами, однак, з більшим ступенем мітохондріальної токсичності для хлорпірифосу.

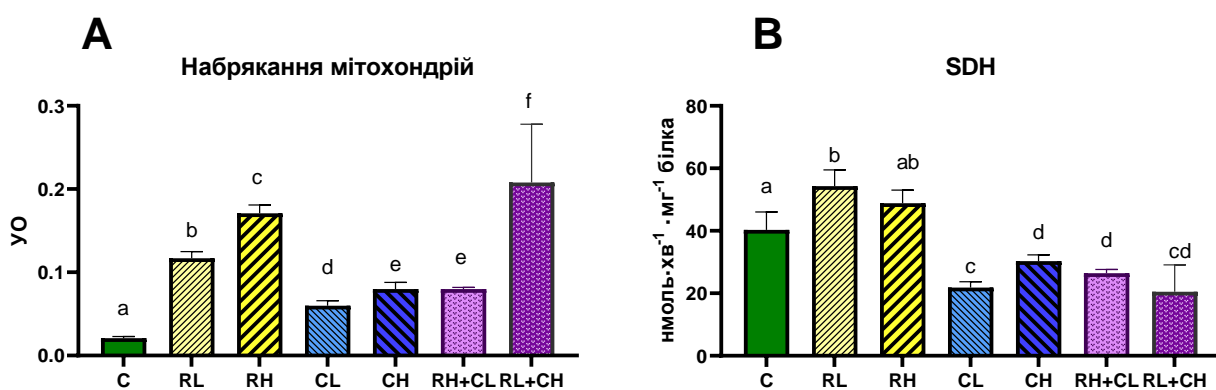


Рис. 3.7. Ступінь набрякання мітохондрій та сукцинатдегідрогеназна активність гепатоцитів даніо за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях.

Вважають, що фосфорорганічні пестициди можуть викликати структурні зміни клітин і тканин у широкого кола організмів (Reddam et al., 2022). Мітохондрії, як енергетичне депо клітини, відповідальне за метаболічні процеси можуть в першу чергу страждати від токсичного впливу пестицидів, а зміни їх функціональної активності можуть бути пов'язані з вищими потребами в енергії для захисту клітини від токсичних впливів. Так, було виявлено, що діазинон і трихлорфон викликають набряк і вакуолізацію мітохондрій у клітинах печінки золотих рибок, гепатоцитах щурів і клітинах серця щурів (Golshani et al., 2020; Reddam et al., 2022). У нашому випадку структурні зміни мітохондрій рибки даніо, що були визначені як збільшення ступеню набрякання мітохондрій, узгоджується із пригніченням активності

SDH як компонента мітохондріального ланцюга транспортування електронів, однак лише за впливу хлорпірифосу та суміші. Раундап, не зважаючи на структурні зміни, не лише не пригнічував, але й активував сукцинатдегідрогеназу, що, ймовірно, свідчить на користь нижчої токсичності раундапу порівняно з хлорпірифосом та збереження здатності протистояти токсичному впливу хімічних стресорних чинників. Тоді як, хлорпірифос, навіть у фоновій екологічно реальній концентрації деактивує захисні сили організму та викликає прояви ознак токсичності, зокрема накопичення продуктів окисної деструкції біомолекул, що було продемонстровано у попередньому підрозділі (див. 3.1.1.).

Як було показано, хлорпірифос викликав значне зниження активності сукцинатдегідрогенази. Наші результати збігаються з раніше повідомленими для деяких хребетних, включаючи моделі ссавців. Наприклад, експозиція хлорпірифосу в гострому режимі (1,656 мг/л) протягом 28 діб викликала пригнічення ферменту сукцинатдегідрогенази в різних тканинах сома *Clarias batrachus* (Tsuda et al., 1997; Yang et al., 2021). Експозиція хлорпірифосом (50 мкМ) значно знижувала активність комплексу II+III у клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y (Turton et al., 2021). Зміни активності сукцинатдегідрогенази можуть бути наслідком серйозного пошкодження клітин, пов'язаного з порушенням метаболізму вуглеводів і білків (Dua and Gill, 2004). Крім того, інгібування сукцинатдегідрогенази може сприяти виробленню АФК, що спостерігалось у рибок данію, які піддавалися впливу хлорпірифосу, з подальшими порушеннями інших мітохондріальних ферментів, які задіяні у мітохондріальному транспортному ланцюзі електронів (Vodnar et al., 2022).

Відтак, раундап та, особливо, хлорпірифос викликають істотні зміни структури та функціональних характеристик лізосом та мітохондрій у данію, що може бути передумовою до значних метаболічних перебудов та аутофагії.

3.3. Стан імунної, гормональної та біотрансформаційної систем даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу

Вплив пестицидів призводив до підвищення рівня IgM у більшості досліджених груп ($P < 0,05$), за винятком риб, які були експоновані 500 мкг/л раундапом (Рис. 3.8.A). Отримані нами дані узгоджуються із даними інших дослідників щодо чутливості імунної системи до впливу пестицидів, підтверджену для широкого кола організмів. Зокрема, було виявлено, що люди, які зазнавали хронічної пестицидної інтоксикації, мали високий рівень atopії та чутливості до антибіотиків, підвищений рівень клітин CD26 ($p < 0,01$) і більш високий рівень аутоімунітету порівняно із здоровими обстеженими (Thrasher et al., 1993). Аутоантитіла були спрямовані до гладкої мускулатури, парієтальних клітин, щіткової облямівки, щитоподібної залози, мієліну та ANA. У щурів хлорпірифос викликав зміни структури та співвідношення лімфоцитів, порушував бластогенез Т-лімфоцитів, а також пригнічував гуморальний імунітет (Effect of chlorpyrifos on immune function in rats). Також хлорпірифос викликав дисфункцію TCR (рецептор Т лімфоцитів) γ , пригнічував антиоксидантну здатність і підвищував вивільнення активних форм кисню в лімфоцитах, що сприяло індукції запальних процесів у лімфоцитах коропа (Berkoz et al., 2019).

Вивчення показників гормонального дзеркала даніо не дозволило виявити докази зміни кортизолу у риб за впливу раундапу та низької концентрації (0,1 мкг/л) хлорпірифосу ($P > 0,05$) (Рис. 3.8С). Висока концентрація хлорпірифосу (3 мкг/л) та вплив суміші RH + CL призвели до помірного зниження рівня кортизолу ($P < 0,05$). У групі RL + CH рівень кортизолу в плазмі підвищився (рис. 3.8С). Разом з тим, варіабельність рівня кортизолу в жодному випадку не перевищувала 25%. Це було характерно і для концентрації Т3 у плазмі (Рис. 3.8 В). Однак в цьому випадку хлорпірифос викликав не зменшення, як для кортизолу, а збільшення рівня Т3. Здатність хлорпірифосу підвищувати Т3 зберігається і за

сумісного впливу фосфоорганічних пестицидів, однак лише у субтоксичній концентрації (Рис. 3.8В).

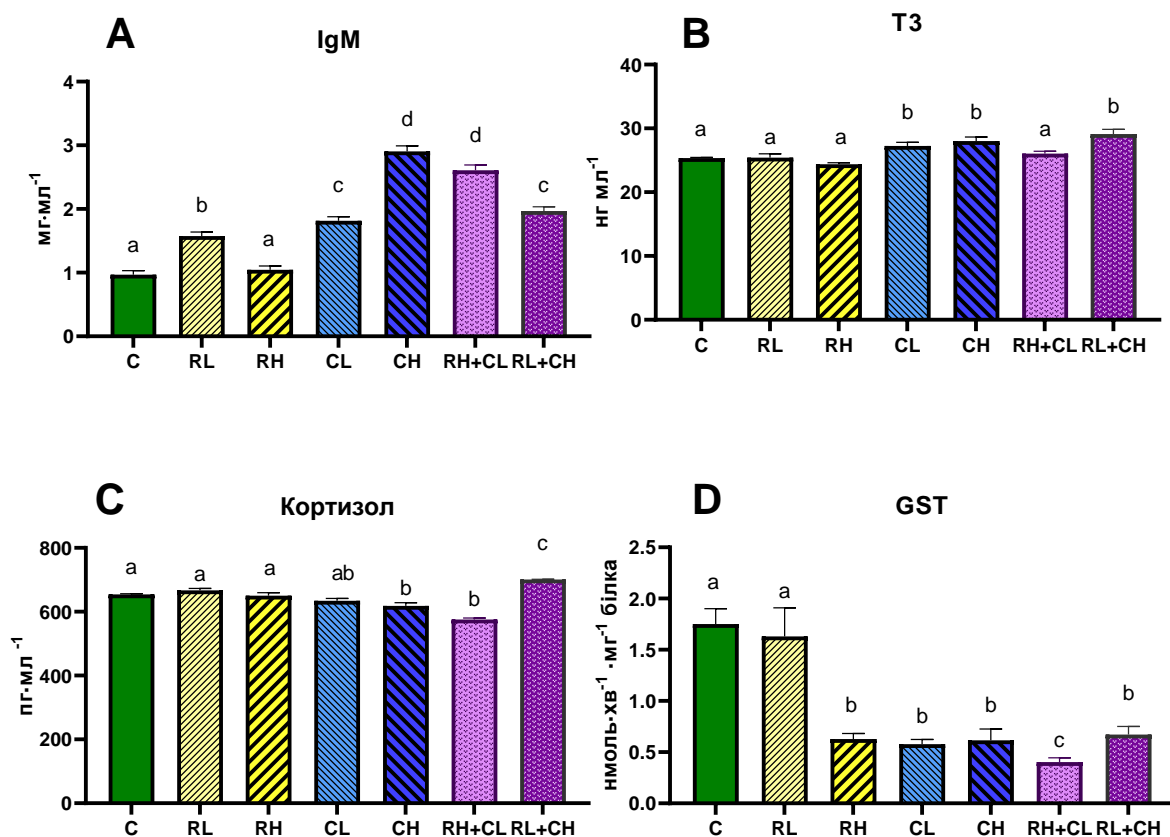


Рис. 3.8. Стан показників імунної (IgM), ендокринної (Т3, кортизол) та біотрансформаційної (GST активність) систем даніо за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях.

Для визначення активності біотрансформаційних процесів у печінці даніо ми визначали активність GST, як ензиму II фази детоксикації. Результати свідчать, що активність GST за виключенням RL-групи, де вона відповідала рівню контролю, істотно зменшувалася (Рис. 3.8D). Порівняння відповіді показника за умов окремої дії пестицидів та їх співдії не виявило проявів адитивного впливу суміші гербіциду (раундапу) та інсектициду (хлорпірифосу).

Літературні дані щодо впливу хлорпірифосу на активність глутатіон-трансферази є неоднозначними. Зокрема, у двостулкового молюска *Scapharca*

inaequivalvis за умов впливу 0,1 ppm хлорпірифосу протягом 15 днів виявлено істотне збільшення активності GSTs порівняно з контролем (Rabbaní et al., 2019). З іншого боку, наголошується на пригніченні активності GSTs у водних тварин як формі реакції організму до пестицидного забруднення. Зокрема, у коропа за впливу 11,6 та 116 мкг/л хлорпірифосу протягом 40 днів та у щурів було виявлено істотне зниження активності GSTs (Sagarkar et al, 2016; Samanta et al., 2014), що і відповідає нашим даним для смугастика. Вважають, що наприклад у двостулкових моллюсків, для яких рівні GSH серед різних тканин не корелюють, міжорганний гомеостаз GSH відсутній (Wu et al., 2020). Враховуючи, що GSTs каталізують кон'югацію електрофільних субстратів з тіоловою групою GSH для детоксикації тканин (Nabig 1974), значуще зменшення активності GST в тканинах коропових риб після впливу хлорпірифосу може вказувати на недостатню його детоксикацію.

Відтак, вплив раундапу та хлорпірифосу викликає активацію імунної відповіді та пригнічення біотрансформаційних процесів, з більш інтенсивним їх проявом за впливу хлорпірифосу, що вкотре вказує на вищу його токсичність для коропової риби у порівнянні з раундапом. Разом з тим, сумісний вплив пестицидів на вищезазначені системи можна розцінити як антагоністичний.

3.4. Прояви цито- та генотоксичності у тканинах даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу

Відомо, що ксенобіотики, зокрема органофосфатні пестициди можуть викликати пошкодження ДНК, зокрема розриви ланцюгів, модифікацію основ, утворення зшивок ДНК-ДНК і зшивок ДНК-білок. Розриви ланцюгів можуть бути індуковані безпосередньо генотоксичними сполуками, шляхом ініціації апоптозу або некрозу, або вторинно, через взаємодію з оксирадикалами чи іншими реакційноздатними інтермедіатами (Ledda et al., 2021). Зшивки ДНК-

білок можуть спонукати клітини до генерації активних форм кисню (Ledda et al., 2021). У разі високотоксичного впливу ксенобіотиків, некомпенсовано підвищених рівнів активних форм кисню або перевищення лімітів толерантності системи антиоксидантного захисту, надлишок утворених активних форм кисню може призвести до підвищення рівноважного рівня пошкодження ДНК, що було відзначено нами практично у всіх досліджених групах тварин, за винятком RL-групи. Збільшення фрагментації ДНК корелює з рівнем активних форм кисню та ТБК-АП у гепатоцитах даніо (Рис. 3.5), що підтверджує вторинний окисний генез розвитку генотоксичності фосфорорганічних пестицидів у коропоної риби.

Фосфорорганічні пестициди поокремо та, особливо, за умов спільної дії призводять до значного збільшення лактатдегідрогеназної активності у плазмі смугастика, що вказує на істотну цитотоксичну їх дію (Рис. 3.9В). Активність ацетилхолінераз (AChE), як показник нейротоксичності, у мозку була пригнічена за впливу обох досліджуваних концентрацій пестицидів та їх суміші ($P < 0,05$), за винятком впливу RL, який призвів до незначного підвищення активності AChE ($P < 0,05$) (рис. 3.9С).

Хлорпірифос – це алкілфосфатна сполука, яка може інгібувати функцію ацетилхолінераз шляхом фосфорилування залишку серину в каталітичному домені ферменту (Adedara et al., 2018). Таким чином, взаємодія хлорпірифосу із залишком серину дезактивує каталітичний центр холінераз. Хоча гліфосат є фосфорорганічним гербіцидом, у ньому відсутні специфічні хімічні елементи / групи, такі як сульфур, галогенід або тіоціанат, які сприяють пригніченню ацетилхолінеразної активності. Вплив гліфосату на нервову систему тварин в свою чергу пояснюється наявністю в його хімічній структурі гліцину, який також міститься в структурі багатьох білків і ферментів. Тому, враховуючи його біологічну роль, гліцин може перешкоджати синтезу глікогенсинтази-кінази-3 шляхом пригнічення експресії гена ацетилхоліну. Крім того, гліцин може впливати на рівень AChE

шляхом зниження синтезу гормоночутливих ліпідів (Hassan et al., 2022; Mesnage et al., 2015).

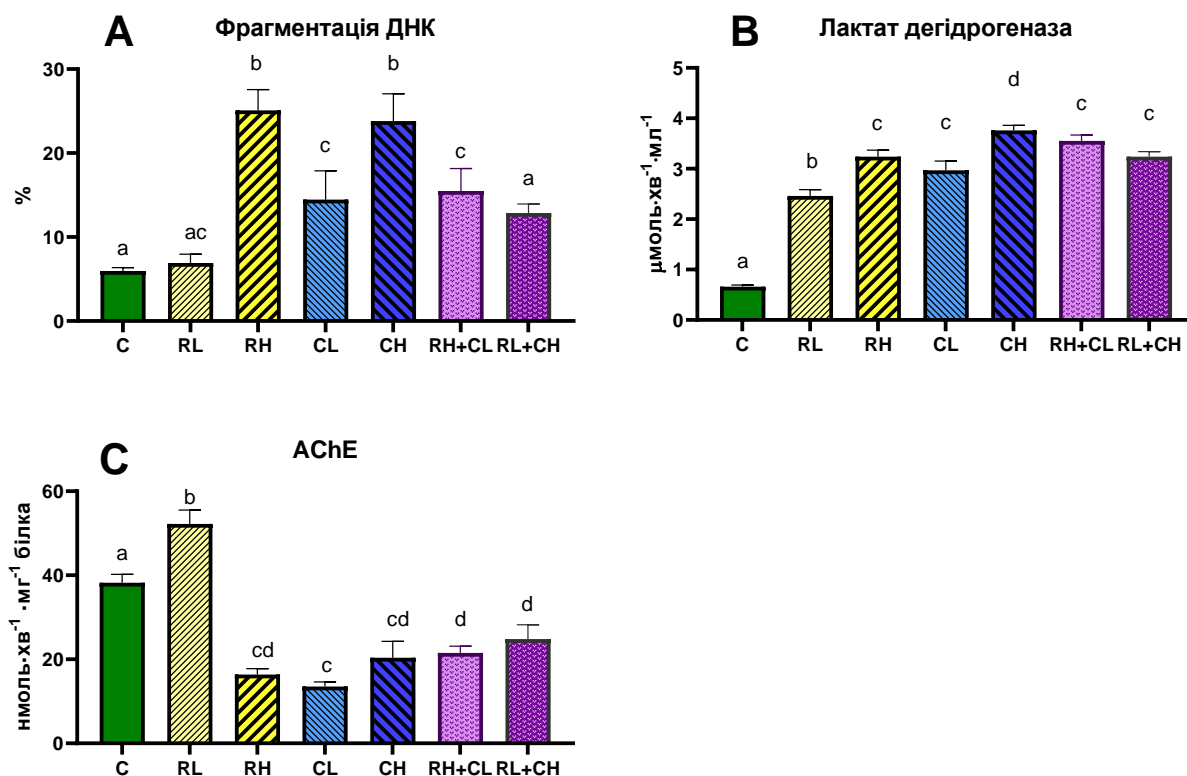


Рис. 3.9. Показники генотоксичності у гепатоцитах (А), цитотоксичності у крові (В) та нейротоксичності у мозку (С) смугастого даніо за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях.

Відтак, раундап та хлорпірифос навіть в екологічно реальних концентраціях викликають прояви цито- та генотоксичності у коропової риби даніо. В ряді токсичності знаходиться на домінантній позиції: Хлорпірифос > Суміш > Раундап.

3.5. Експресія таргетних генів у печінці даніо за впливу раундапу та хлорпірифосу

Субтоксичні концентрації тестованих фосфорорганічних пестицидів

(групи RH і CH) призвели до підвищення (на ~41–47%) експресії ключового ензиму апоптозу каспази 3 (Рис. 3.10А). Разом з тим, експресія мРНК каспази 3 у групах рибок, які були експоновані за присутності низької концентрації раундапу (15 мкг/л) та суміші раундап-хлорпірифос пригнічувалася на ~21–34% (рис. 3.10А). Експресія мРНК проапоптичного білка BAX зростала на ~42–47% у групах RL, RH і RH + CL, та була пригнічена на ~68% у групі CL (рис. 3.10В). Зміни експресії генів Cas3 та BAX у досліджуваних групах були не узгоджені (Рис. 3.10).

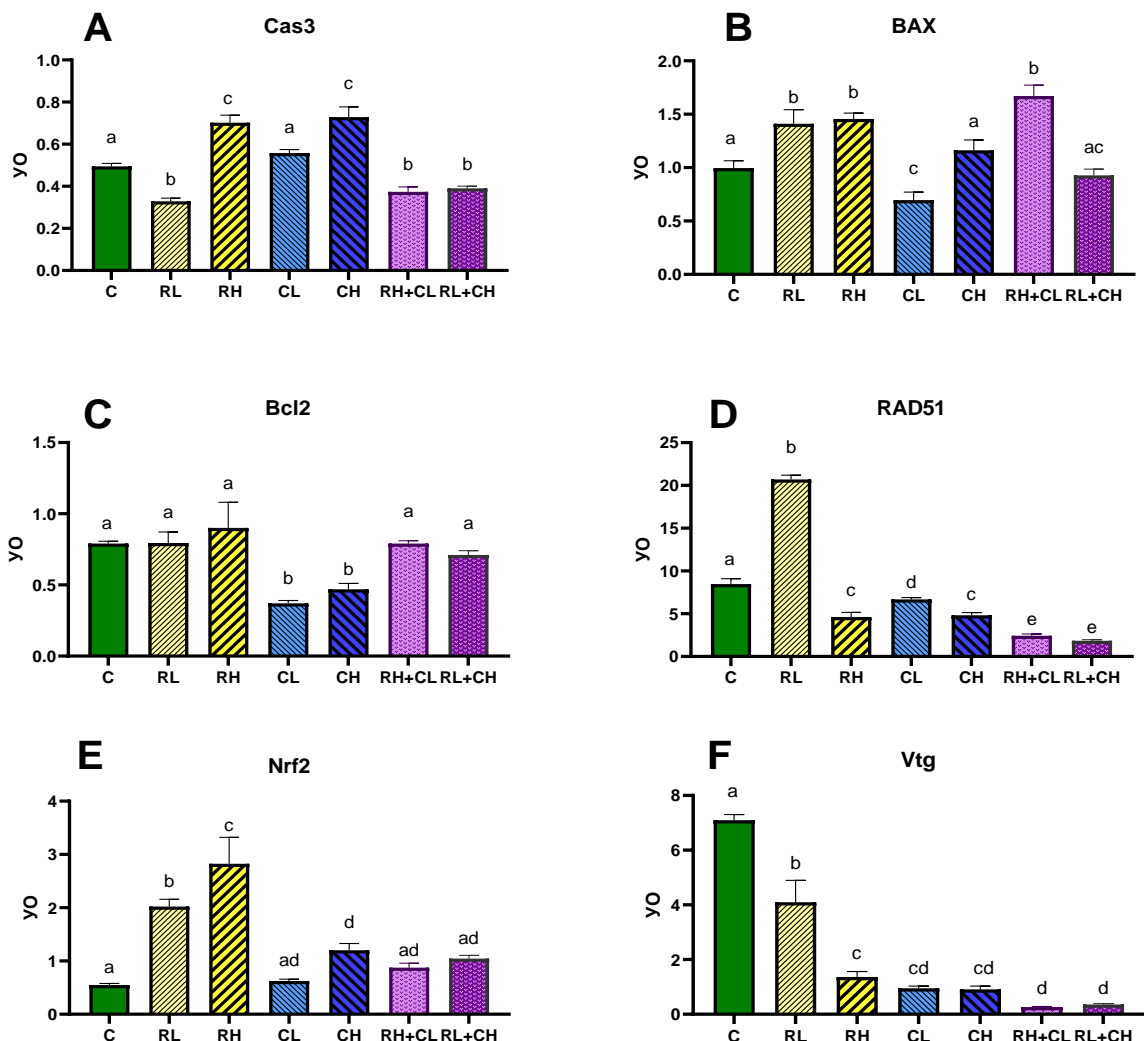


Рис. 3.10. Експресія таргетних генів у тканині печінки смугастого даніо за дії раундапу (R) та хлорпірифосу (C) у екологічно-реальній (L) та субтоксичній (H) концентраціях. А – caspase 3, В – bcl-2-like protein C – B-cell lymphoma 2, D – DNA repair protein RAD51 homolog 1, E – Nuclear factor erythroid 2-related

factor 2, F – vitellogenin

Експозиція рибок хлорпірифосом (на ~41–53%), але не раундапом або комбінаціями раундап-хлорпірифос призводила до пригнічення рівня транскриптів антиапоптичного білка Bcl-2 у печінці (Рис. 3.10С).

Вважають, що RAD51, найбільш відомий як центральний каталізатор гомологічної рекомбінації (HR), забезпечує безпомилкове відновлення дволанцюгових розривів ДНК під час S і G2 фаз клітинного циклу (Wassing et al., 2010). У цьому процесі дволанцюгові розриви ДНК спочатку розпізнаються комплексом MRE11-RAD50-NBS1, який ініціює резекцію пошкоджених кінців ДНК. Резектований 3'-кінець одностанцюгової ДНК швидко зв'язується білком реплікації А (RPA) і згодом замінюється на RAD51. RAD51 подібним чином сприяє перезапуску реплікації шляхом призупиненої реплікації (BIR) на пошкоджених реплікаційних вилках. Крім того, RAD51 виконує нерепараційні функції на зупинених реплікаційних вилках, у яких RAD51 стимулює реверсування розгалуження та стабілізує зупинені розгалуження, захищаючи ДНК від нуклеолітичної деградації. У нашому дослідженні вплив раундапу та хлорпірифосу викликав пригнічення рівня мРНК RAD51 у печінці всіх експериментальних груп, за винятком RL, де було виявлено подвійне збільшення рівнів мРНК RAD51 (Рис. 3.10.D). Найбільш істотне інгібування мРНК RAD51 (на ~74%) було виявлено за умов комбінованого впливу пестицидів. Рівень експресії мРНК RAD51 негативно корелював з рівнем ушкодження молекул ДНК у печінці (Рис. 3.11).

Високий ступінь подібності реакції до пригнічення RAD51 у данію та людини було виявлено при дослідженні синдрому Фанконі та доведено, що пригнічення синтезу або втрата гену RAD51 у данію призводить до розвитку анемічного синдрому Фанконі зі структурними змінами кісткової тканини та тканини нирок (Botthofet al., 2017).

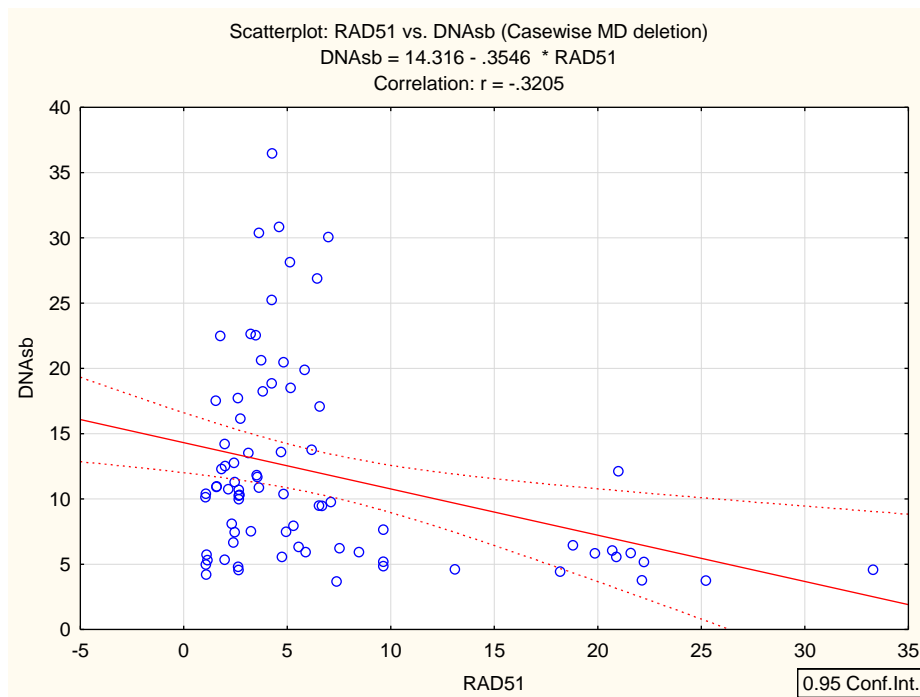


Рис. 3.11. Кореляційна залежність змін рівня експресії мРНК RAD51 фрагментованих молекул ДНК.

Експозиція риб в присутності раундапу (як групи RL, так і RH) і хлорпірифосу (група CH) призвела до значного (у $\sim 2-5$ разів) збільшення експресії мРНК Nrf2 (Рис. 3.10.E). Хлорпірифос у екологічно-реальній концентрації та за співдії з раундапом не викликав експресії Nrf2. (Рис. 3.10.E). Зважаючи на важливу функцію еритроїдного фактору ядерного фактору 2 (Nrf2) в антиоксидантному захисті та активації транскрипції ферментів фази II (Loboda et al., 2016), пригнічення експресії Nrf2 за впливу хлорпірифосу можна розцінити як перевищення лімітів толерантності організму до впливу пошкоджуючих чинників та створення передумов до розвитку патологічного процесу.

Щодо вітелогеніну, то всі діючі чинники викликали пригнічення експресії білка-прекурсора, що служить для побудови жовтка в ооциті, причому за впливу хлорпірифосу зміни були найбільш істотні (Рис. 3.10.F). Це вказує на ендокрин-пошкоджуючий вплив пестицидів, пов'язаним із проявами статевої функції, що потенційно може викликати негативний вплив на зменшення чисельності популяції та біорізноманіття, як віддалені наслідки.

Отже, раундап та хлорпірифос окремо та в суміші викликають у даніо істотні зміни на молекулярному рівні, пов'язані із апоптозом, антиоксидантним захистом та розмноженням.

3.6. Інтегральний аналіз реакцій даніо до впливу раундапу та хлорпірифосу

Інтегральний аналіз даних провели зокрема з використанням формули для визначення інтегрального ефекту (ІЕ) як суму попарних добутоків уніфікованих показників:

$$IE = 3AA \times TBK-AP + TBK-AP \times KPP + KPP \times LDG + LDG \times GSSG + GSSG \times VTG-PPP + VTG-PPP \times 3AA,$$

запропоновану автрами Фальфушинською та Горин (2022). За отриманими результатами визначили рівень токсичності водного середовища як адаптивна відповідь; перевищення лімітів толерантності, стрес; помірна токсичність та переддепресивний стан (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Інтегральний ефект токсичності впливу екологічно реальної та субтоксичної концентрацій раундапу, хлорпірифосу та їх суміші на *D. rerio*

RL	RH	CL	CH	RH+CL	RL+CH
8,52	17,27	12,72	26,80	31,80	34,41
адаптивна відповідь	перевищення лімітів толерантності, стрес		переддепресивний стан	помірна токсичність	

Обробка даних методом канонічного дискримінантного аналізу показала, що на основі визначення квадрату відстані Махаланобіса групи RL і CL локалізуються поблизу контрольної групи у площині двох основних компонент, (рис. 3.12A). Групи CH і групи сумісного впливу натомість

розташовані разом у площині вох основних компонент і показали найбільше відхилення від контрольної групи, що свідчить про найвищу токсичність (Рис. 3.12А).

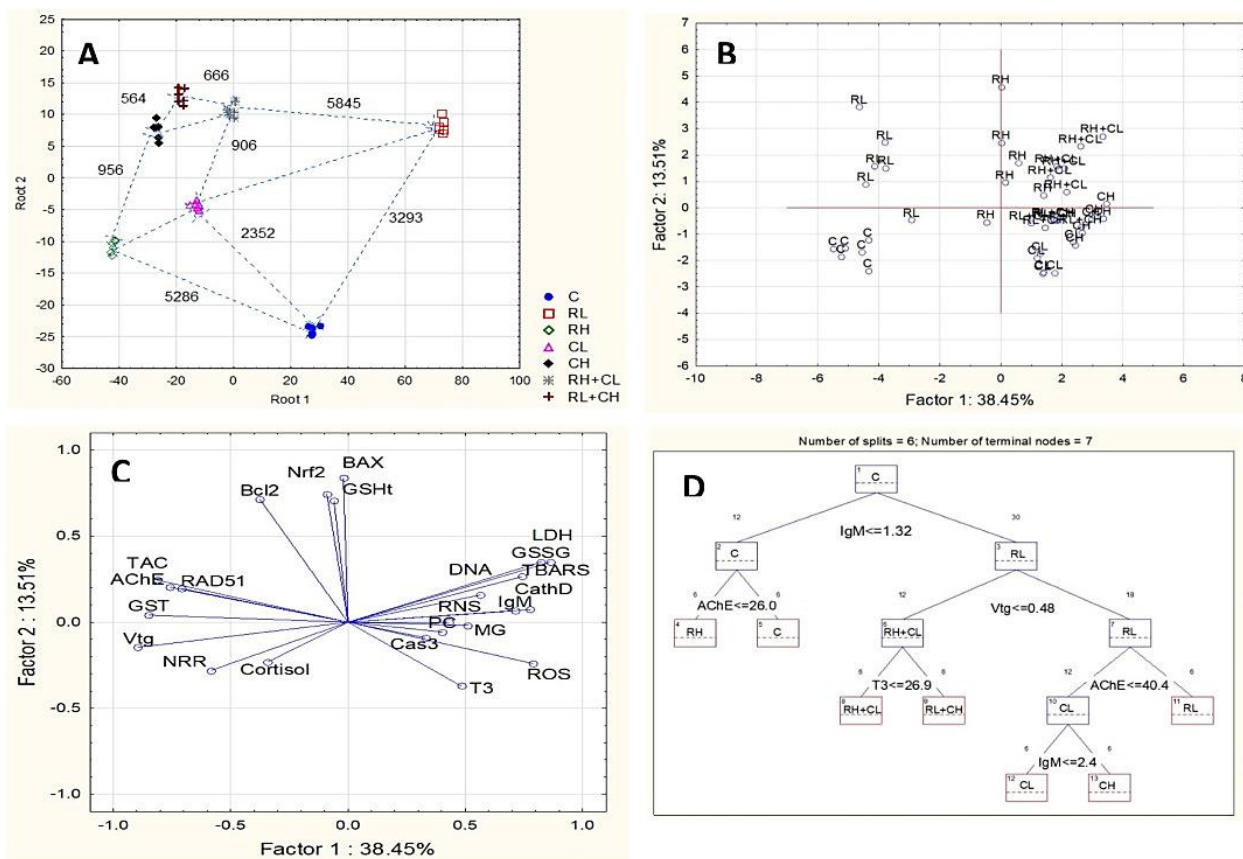


Рис. 3.12. Інтегральний аналіз фізіолого-біохімічних показників смугастого данію за впливу раундапу та хлорпірифосу поокремо та в суміші.

Метод головних компонент в свою чергу згрупував навколо перших двох головних компонент 52% загальних варіацій сукупності даних (Рис. 3.12 В, С). Головну компоненту 1 (38,5% варіації) можна охарактеризувати як вісь токсичного впливу, що має високі позитивні навантаження ($>0,7$) показників рівня активних форм оксигену, GSSG, ТБК-АП, активності лактатдегідрогенази та катепсину D, і високі негативні навантаження ($<-0,7$) загальної антиоксидантної активності, GST, активності AChE, а також експресії мРНК RAD51 і Vtg. Перша головна компонента відсепарувала контрольні групи від груп експонованих у присутності пестицидів які були вплинуті пестицидами, за винятком групи RL (Рис. 3.12 В,С). Положення груп

за впливу хлорпірифосу як поокремо так і в суміші, показали сильне перекриття, що свідчить про схожість біомаркерних профілів цих груп. Положення групи RH на першій головній компоненті було проміжним між групами за впливу хлорпірифосу та суміші пестицидів, з одного боку, і групами контролю та RL, з іншого боку (Рис. 3.12 В,С). Група даніо за впливу низької концентрації раундапу, була відокремлена від контрольної групи вздовж другої головної компоненти (Рис. 3.12 В,С). Головну компоненту 2 (13,5% варіації) можна охарактеризувати як антиоксидантну та антиапоптичну вісь з високими позитивними завантаженнями рівня загального GSH та експресії Nrf2, BAX та Bcl-2. Підсумовуючи результати аналізу канонічних дискримінантів і головних компонентів, можна вказати, що для смугастого даніо хлорпірифос виявив найвищу, а раундап – найнижчу токсичність. Позаяк токсичність сумішей раундап-хлорпірифос була проміжною між токсичністю чистих пестицидів, можна зробити припущення щодо агоністичних взаємодій раундапу та хлорпірифосу між собою за умов одночасної присутності в суміші.

Аналіз CART побудував класифікаційне дерево на основі індексу Джині з шістьма розділеннями та семи кінцевими чистими вузлами без візуалізованих помилок у класифікації (Рис. 3.12D). До найбільш чутливих показників, які розділяли групи за наслідками впливу пестицидів належали показники нейротоксичності, ендокринного дзеркала та імунного стану.

Аналіз рендом форест умовно розподілив показники смугастика за чутливістю до фосфорорганічних пестицидів на дві групи (Рис. 3.13). До визначальних параметрів ввійшли показники стану імунної системи (IgM), репарації ДНК (RAD51), ендокринних розладів (вітелогенін, кортизол), та ключовий елемент Nrf2-антиоксидант чутливого шляху (Nrf2). З іншого боку, загальноприйняті показники окисного стресу проявили порівняно нижчу чутливість до розрізнення груп, що вказує на необхідність інтегрального аналізу стану організму в стесових умовах та уможливорює викриття

прихованих ефектів токсичності, які в віддаленій перспективні можуть спричиняти скорочення чисельності популяцій тварин, а відтак, і біорізноманіття.

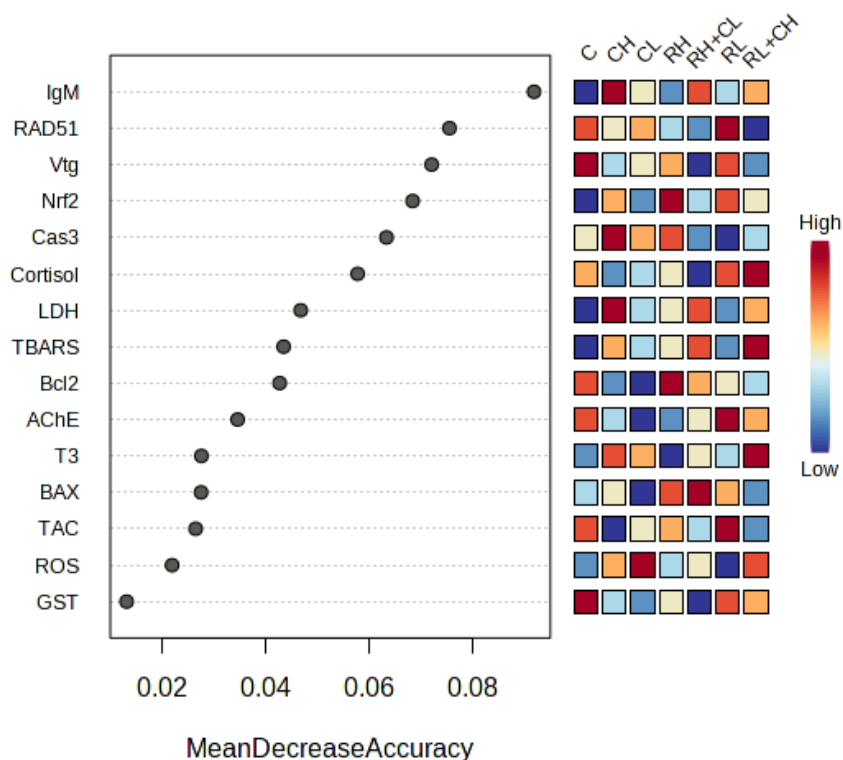


Рис. 3.13. Ступінь відповіді біомаркерів стресу та токсичності печінки, мозку та крові смугастого данію за впливу раундапу та хлорпірифосу за результатами рендом форест аналізу.

Відтак, ми зробили важливий крок у напрацюванні методологічного підходу до оцінки меж толерантності водних організмів до впливів фосфорорганічних пестицидів завдяки розробці інтегрального набору фізіологічних і молекулярних маркерів для оцінки пошкоджувального впливу хімічних речовин фосфорорганічної природи з використанням модельного організму, акваріумної рибки смугастого данію. Стрес-тестування дозволило диференціювати особливості життєвого статусу організму залежно від природи діючого чинника та прогнозувати рівень толерантності до новітніх викликів.

РОЗДІЛ ІV.

МУЛЬТИБІОМАРКЕРНА ОЦІНКА СТРЕСОРНИХ СИСТЕМ, ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ТА МЕТАБОЛІЧНОЇ ВІДПОВІДІ У ТКАНИНАХ ДАНОЮ ЗА МАЛАТІОНУ ТА ТЕРБУТИЛАЗИНУ

Позаяк гербіциди є одними з найбільш використовуваних груп пестицидів в європейських країнах (Worldometer, 2022), можна очікувати появи їх та / або їх метаболітів у середовищі, у тому числі поверхневих та підземних водах. Не дивно, що кількість сільськогосподарських угідь, які піддаються ризику забруднення пестицидами, постійно зростає (Taylor et al. 2002; Khatib et al. 2022). Майже дві третини сільськогосподарських угідь світового масштабу вже забруднені більш ніж одним пестицидом, і третина цих ділянок перебуває високому ризику (Tang et al., 2021). Складність ситуації проявляється ще й у тому, що, згідно з прогнозами, в майбутньому використання пестицидів, а відтак і забруднення, значно зросте.

Тербутилазин (6-хлор-N2-етил-N4-терт-бутил-1,3,5-триазин-2,4-діамін) має меншу розчинність у воді та вищу ретенцію в ґрунті, ніж атразин (6-хлор-N2-етил-N4-ізопропіл-1,3,5-триазин-2,4-діамін), і тому вважається менш токсичним, зменшуючи акватичне забруднення (Baillie, 2016). Проте з хімічної точки зору ці речовини належать до класу нітрогенвмісних гетероциклів (s-триазини). Різниця в структурі між обома гербіцидами полягає в трет-бутиловій групі в тербутилазині, яка замістила більш гідрофільну ізопропілову групу в атразині. Тому очікується, що така речовина буде поширюватися повільніше в воді і, в той же час, не буде такою токсичною, як атразин, через її меншу розчинність у воді. З урахуванням того, що тербутилазин є аналогом атразину, який в свою чергу є надзвичайно токсичним для живих організмів і забороненим в низці країн, його рівень та ефекти для живих організмів потрібно контролювати, щоб уникнути необоротних змін у навколишньому середовищі на кожному рівні харчового

ланцюга.

У зв'язку з інтенсивним веденням сільського господарства у світі загалом і в Україні зокрема, можна очікувати що у водойми одночасно будуть потрапляти органічні сполуки різних класів. В попередньому розділі ми висвітлили проблему забруднення середовища фосфорорганічними сполуками та показали низку токсичних ефектів, які вони навіть у екологічно реальних концентраціях можуть викликати у риб. Це зумовило інтерес дослідити вплив тербутилазину у комбінації з малатіоном, як ТОП-10 за обсягами використання інсектициду.

4.1. Вплив тербутилазину та малатіону на систему антиоксидантного захисту данію

Тербутилазин та малатіон викликали збільшення загальної антиоксидантної здатності в гепатоцитах смугастого данію, однак лише при високих концентраціях, тоді як пестициди при низьких концентраціях або в поєднанні між собою призводили до зменшення актирадикальної активності (Рис. 4.1).

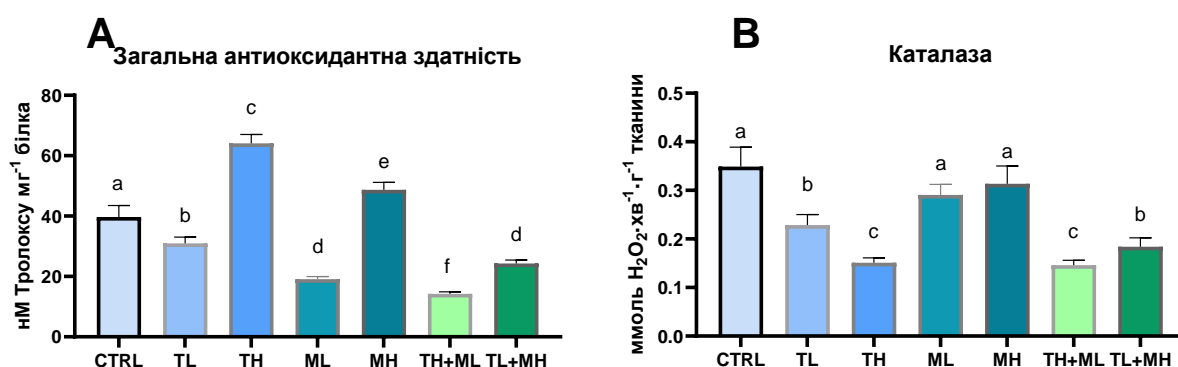


Рис. 4.1. Вплив тербутилазину і малатіону на загальну антиоксидантну здатність (А) та каталазну активність (В) у печінці *D. rerio* (n = 6).

Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH –

тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатіон 5 мкг/л; МН – малатіон, 50 мкг/л. Різні літери вказують на статистично значущу різницю між групами ($p < 0,05$).

Тербутилазин викликав також пригнічення каталази в обох досліджуваних концентраціях, особливо в ТН-групі, та за умов сумісного впливу. Напротивагу, малатіон не впливав на ензиматичну активність каталази печінки даніо (Рис.4.1), що на тлі зменшення загальної антиоксидантної здатності у цих же групах тварин (Рис.4.1) може вказувати на вразливість інших ланок системи антиоксидантного захисту.

Аналіз літератури свідчить, що існує декілька моделей реакції системи антиоксидантного захисту організму на вплив пошкоджуючих чинників, з-поміж яких пригнічення системи антиоксидантного захисту здебільшого простежується за дії високотоксичних забруднювачів та/або гостротоксичних концентрацій ксенобіотиків, що може бути пов'язано з некомпенсованим накопиченням активних форм кисню (Lowry et al., 1951; Lushchak, 2011). Щодо пестицидів, то така схема відповіді була відзначена за впливу триазолів, триазинів, делтаметрину та піретроїдних інсектицидів (Amin and Hashem, 2021; Santana et al., 2022). У свою чергу проведені нами експерименти дали змогу виявити таку модель відповіді у даніо за впливу суміші пестицидів, коли і загальна антиоксидантна здатність і каталазна активність пригнічувалися та, очевидно, не могли забезпечувати належний рівень секвестрації радикалів у клітині, що, потенційно, може зумовлювати прояви окисного ушкодження біомолекул.

Пригнічення активності каталази за впливу тербутилазину частково компенсувалося за рахунок глутатіону, загальний вміст якого зростав на 25% у TL групі (Рис.4.2). За підвищених концентрацій тербутилазину однак змін загального пулу глутатіону виявлено не було. Малатіон, у свою чергу, зумовлював пригнічення синтезу глутатіону за впливу екологічно реальної концентрації та не викликав змін при вищій досліджуваній концентрації.

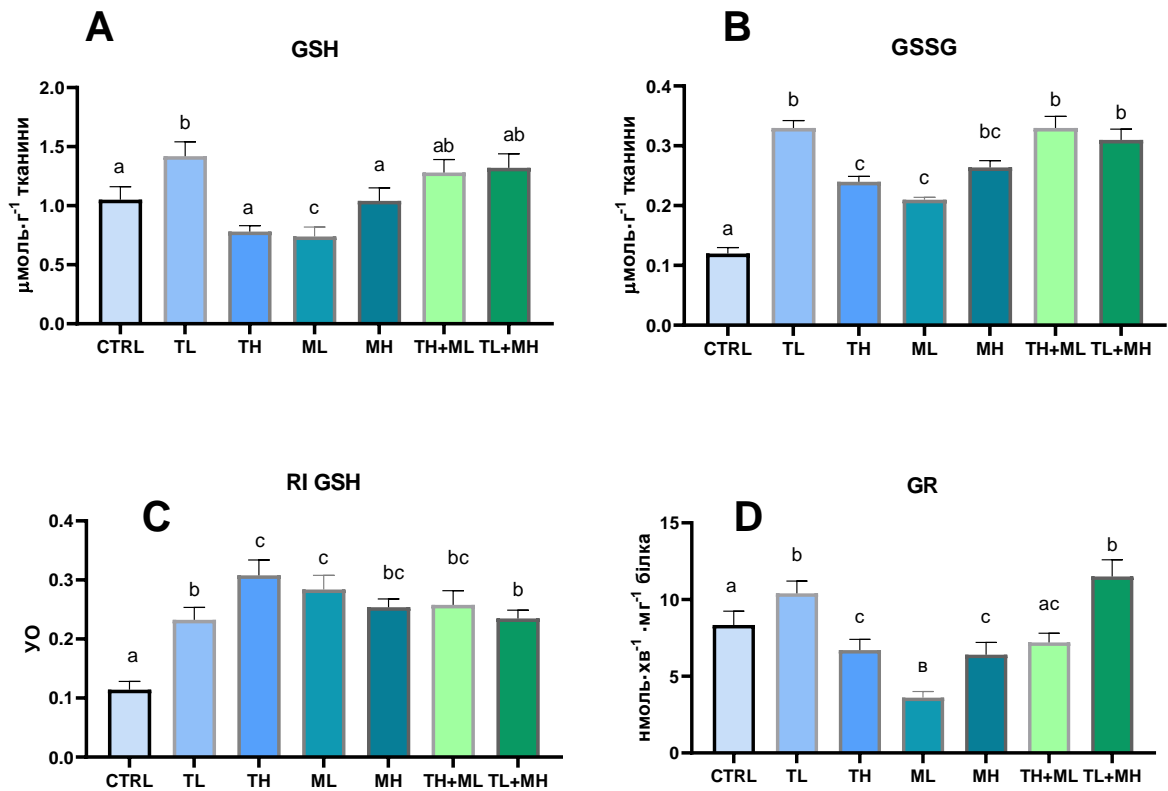


Рис. 4.2. Вплив тербутилазину і малатиону на пул глутатіону гепатоцитів *D. rerio* (n = 6). А: загальний рівень глутатіону, В: рівень окисненого глутатіону, С – редокс-індекс глутатіону, D – глутатіон редуктаза. Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатион 5 мкг/л; MH – малатион, 50 мкг/л.

Рівень загального глутатіону підтримувався і за впливу суміші пестицидів. Щодо окисненої форми глутатіону GSSG, то обидва пестициди за індивідуального впливу і, особливо, за умов сумісної дії спричинили значне збільшення GSSG (Рис.4.2). Обрахунок редокс-індексу глутатіону дозволив виявити зсув редокс-рівноваги у клітині в бік прооксидантних процесів у подібному діапазоні у всіх дослідних групах, що створює передумови до порушення метаболічних процесів в клітині в цілому, а відтак і до метаболічного арешту. Особливо з погляду того, що глутатіон редуктаза у більшості випадків зазнавала пригнічення а отже і перевищення лімітів функціональної здатності щодо конвертації окисненого глутатіону у

відновлений. Зміни активності глутатіон редуктази та вмісту загального глутатіону були взаємнокорельованими ($r=0.58, p<0.05$).

Як відомо, більше 90% глутатіону існує у відновленій формі (Reddam et al., 2022). Наразі у нижчих хребетних не існує стандартної схеми реакції глутатіонової системи на підвищений вміст пестицидів. З одного боку, повідомляється про збільшення глутатіону, як пастки радикалів, у відповідь на ініціацію радикальних процесів у клітині під впливом пестицидів. З іншого боку, це може бути нечутливість або виснаження глутатіонового пулу, з погляду на перевищення лімітів функціональної здатності, що супроводжується накопиченням продуктів окисного ушкодження біомолекул (Aquilano et al., 2014, Griffith, 1980). Загалом можна сказати, що активація системи глутатіону розглядається як адекватна відповідь на стрес, яка забезпечує підтримання відновного статусу в клітинах, зокрема клітинних тіолів (Griffith, 1980). З іншого боку, зниження глутатіону в клітинах свідчить про виснаження пов'язаних з ним механізмів для підтримання відновного стану клітини, детоксикації ксенобіотиків, зокрема органічних, які утворюють кон'югати з глутатіоном для транспорту та виведення із клітин (Aquilano et al., 2014; Reddam et al., 2022).

Таким чином, збільшення рівня окисненого глутатіону, редокс-індексу та пригнічення ферментів обміну глутатіону, можна вважати перевищенням лімітів толерантності організму та поступовою втратою його здатності протистояти пошкодjuвальному впливу пестицидів, не залежно від їх природи.

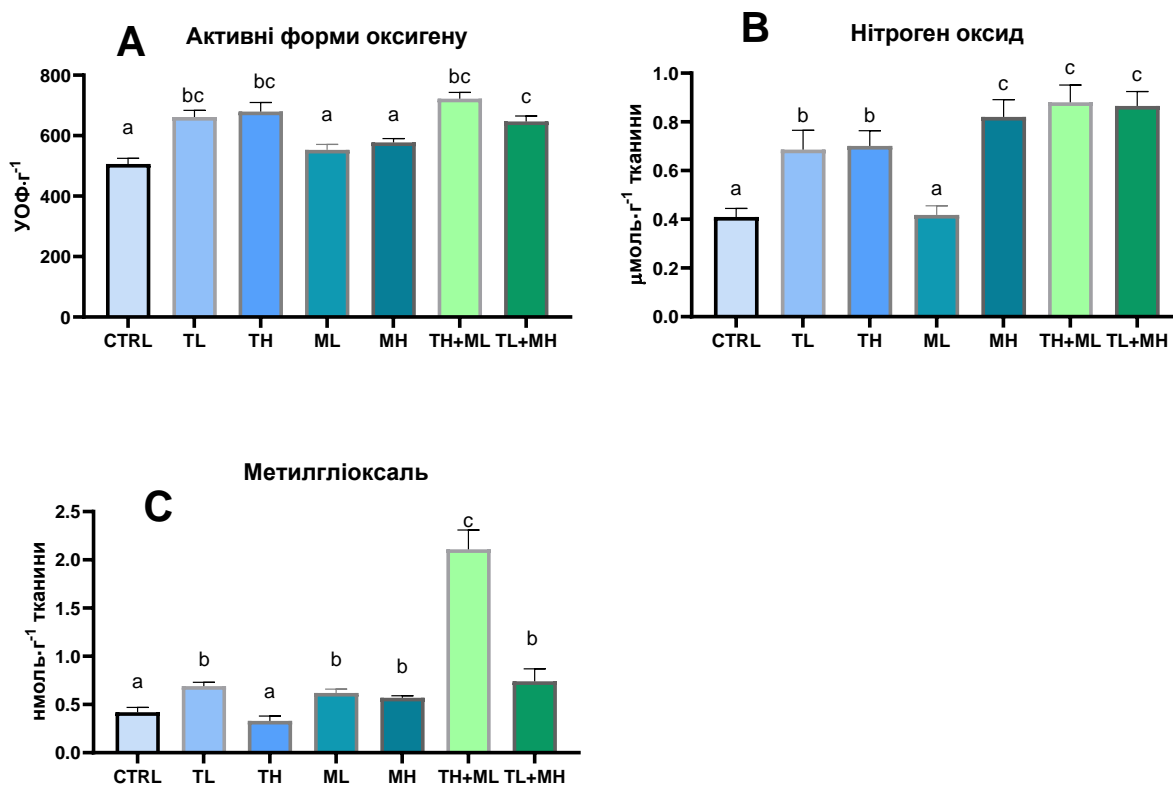


Рис.4.3. Вплив тербутилазину і малатіону на утворення активної форм оксигену (A), нітрогену (B) та α -дикарбонілів (C) у тканині печінки *D. rerio* (n = 6). Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатіон 5 мкг/л; MH – малатіон, 50 мкг/л.

Рівень активних форм оксигену у печінці даніо за умов експозиції тербутилазину індивідуально та в суміші був вищим, ніж у контролі, незалежно від концентрації діючої речовини (рис.4.3). Разом з тим, малатіон практично не впливав на рівень цього показника. Водночас нітроген оксид, як реакційноздатна форма нітрогену, та метилгліоксаль, як реактивна форма карбонілів, зростали практично у всіх досліджуваних групах, за винятком ML та TH відповідно (Рис.4.3). Рівень варіабельності метилгліоксалу був найвищим, зростаючи в п'ять разів за умов сумісного впливу.

Узгоджено із збільшенням реакційно зданих форм оксигену, нітрогену та α -дикарбонілів, у тканині печінки даніо підвищувався рівень продуктів

окисної деструкції ліпідів та протеїнів (за винятком ТН і МН груп) (Рис.4.4). Вплив суміші призводив до найбільш істотних змін, узгоджено із пригніченням загальної антиоксидантної здатності та каталазної активності (Рис. 4.4).

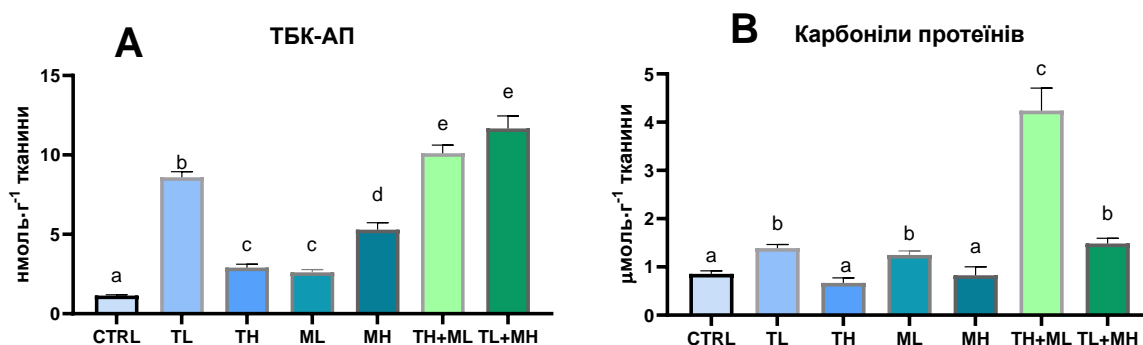


Рис. 4.4. Вплив тербутилазину і малатиону на рівень продуктів окисної деструкції ліпідів (A) та білків (B) у тканині печінки *D. rerio* (n = 6).

Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатион 5 мкг/л; MH – малатион, 50 мкг/л.

Кореляційний аналіз свідчить, що зміни рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків у печінці данію за впливу тербутилазину і малатиону є взаємнокорельованими ($r=0.51$, $p<0.01$, Рис.4.5). Зважаючи на те, що продукти перекисного окиснення ліпідів можуть бути ініціаторами утворення карбонільних похідних протеїнів ми провели аналіз коваріацій та встановили відсутність вірогідного ефекту взаємозалежності змін між цими показниками. При цьому, головною детермінантною змін виступає вплив пестицидів, який і обумовлює перекисні процеси у гепатоцитах данію. Взаємозв'язок описується рівнянням: Окисні модифікації протеїнів = $4.57 + 0.36 \cdot \text{ТБК-АП} + 6.4 \cdot \text{Ефект пестициду}$, $F_{1,34} = 18.9$, $p<0.001$

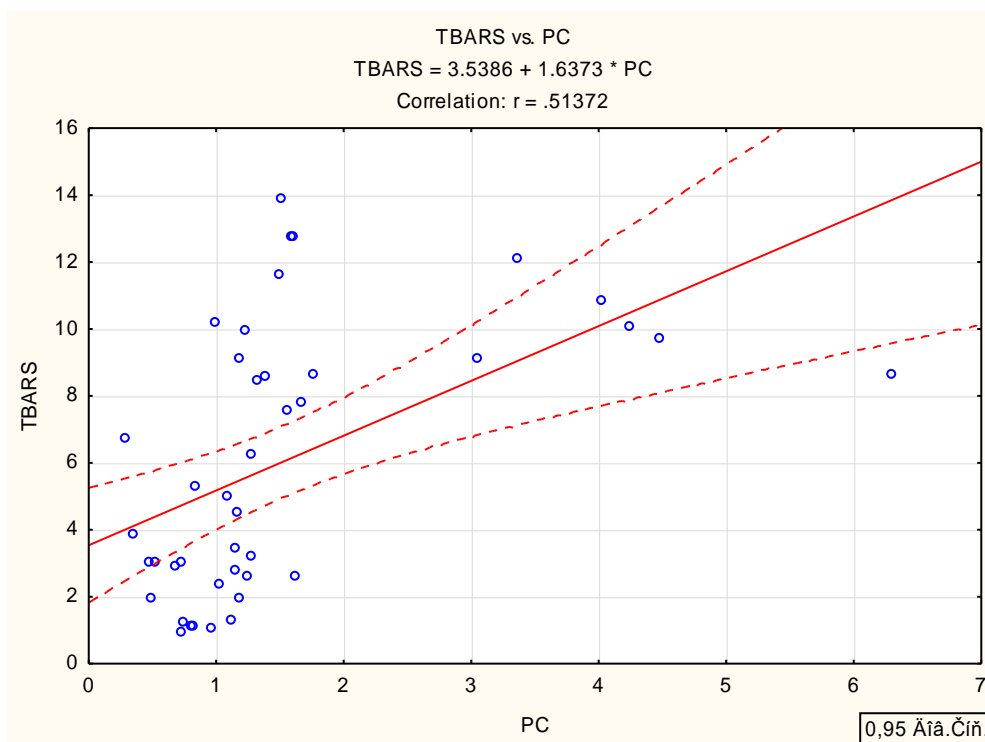


Рис.4.5. Кореляційна залежність змін рівня перекисних модифікацій ліпідів та протеїнів у тканині печінки данію за умов експозиції в присутності підвищених концентрацій тербутилазину та малатіону.

Проведення кореляційного аналізу свідчить, що між показниками окисного стресу у печінці данію за умов експерименту здебільшого існує позитивна кореляція (див. Рис.4.6, верхній лівий квадрат). З одного боку це вказує на мобілізацію та узгоджений характер реакції ключових параметрів окисного стресу до впливу пестицидів, однак з іншого ж боку – на перевищення лімітів толерантності організму. Зокрема, наприклад, збільшення рівня глутатіону у тканині данію, яке відбувається узгоджено із зростанням концентрації карбонільних похідних білків та пероксидації ліпідів, може вказувати на неспроможність антиоксидантів ефективно знешкоджувати радикали, в наслідок чого з’являються ознаки токсичності.

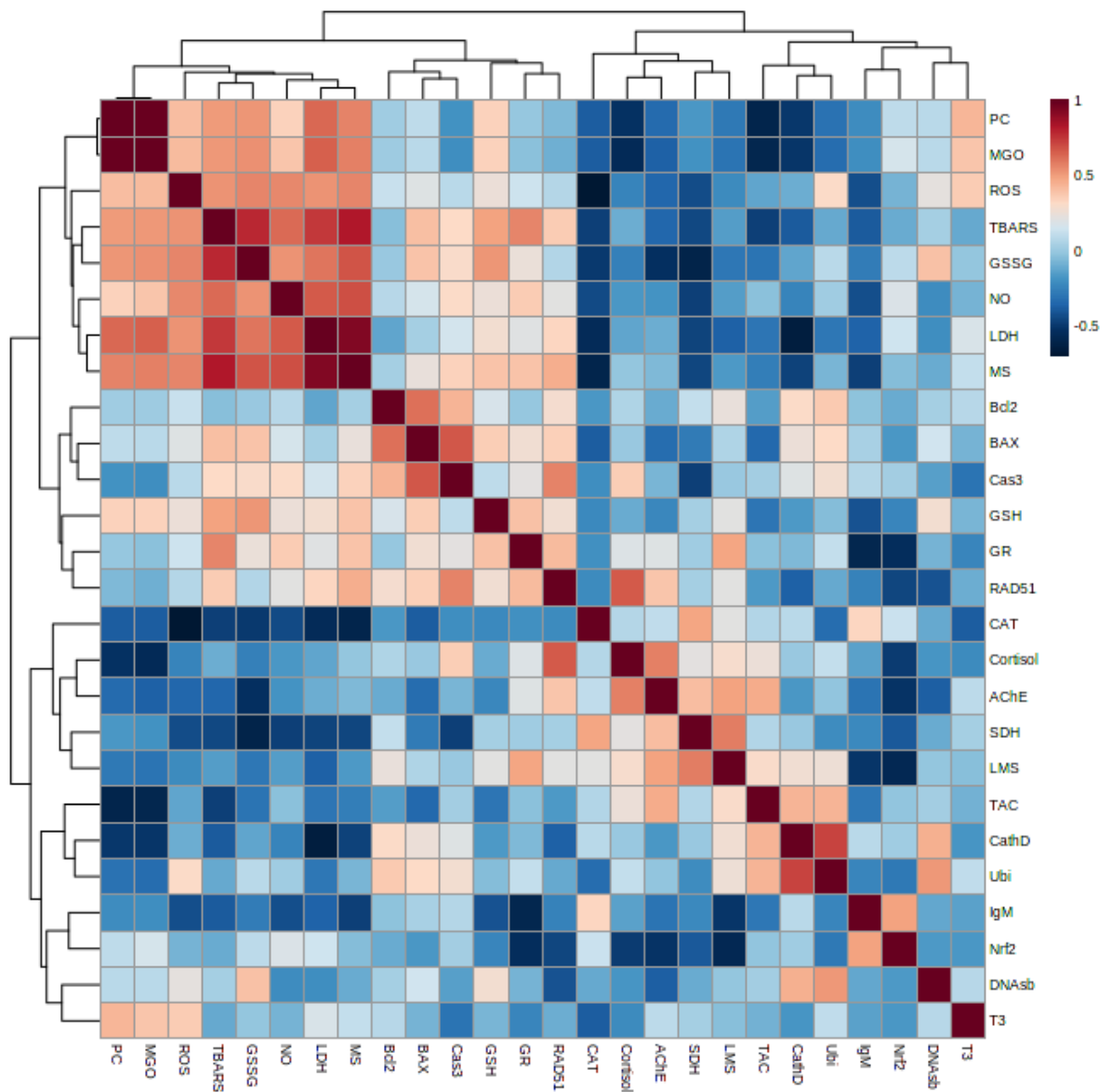


Рис. 4.6. Матриця кореляцій показників печінки, крові та мозку смугастого даніо за впливу тербутилазину і малатіону.

4.2. Інтенсивність метаболічних процесів у печінці даніо за впливу тербутилазину та малатіону

Визначення одного з ключових ензимів енергозабезпечення клітин дозволило зареєструвати суттєве інгібування активності сукцинатдегідрогенази за дії обох досліджуваних пестицидів за умов індивідуальної та сумісної дії у подібному діапазоні (до 87,5 %) у порівнянні з

контрольною групою (Рис.4.7). Це вказує на суттєве інгібування функціональної активності ланцюга переносу електронів у гепатоцитах данію. Ознакою вразливості мітохондрій данію є також їх набрякання, яке проявлялося за впливу всіх досліджуваних чинників, за одним винятком.

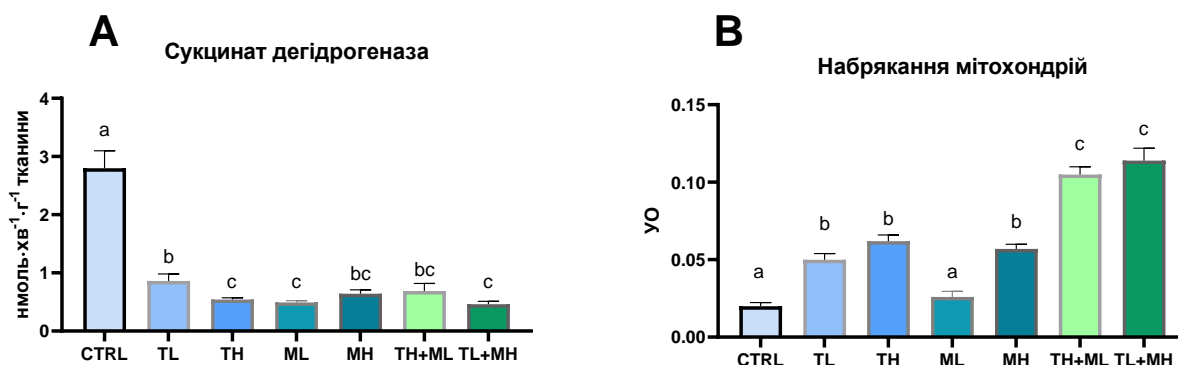


Рис. 4.7. Вплив тербутилазину і малатіону на показники функціональної активності мітохондрій печінки *D. rerio* (n = 6). Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л; ML – малатіон 5 мкг/л; MH – малатіон, 50 мкг/л.

Власне, набрякання мітохондрій визначає зміни сукцинатдегідрогеназної активності, що підтверджується результатами регресійного аналізу: $СДГ = 1,61 - 11,0 \times \text{Набрякання мітохондрій}^*$; $F(1,40) = 10,2$, $p < 0,002$ (Рис. 4.7). Очевидно, ці події опосередковано в кінцевому етапі через розлади окиснення сукцинату до фумарату з наступним відновленням убихінону до убихінолу, які відбуваються на внутрішній мембрані мітохондрій, можуть призвести до потенційного розвитку ознак метаболічного арешту в експонованих тварин.

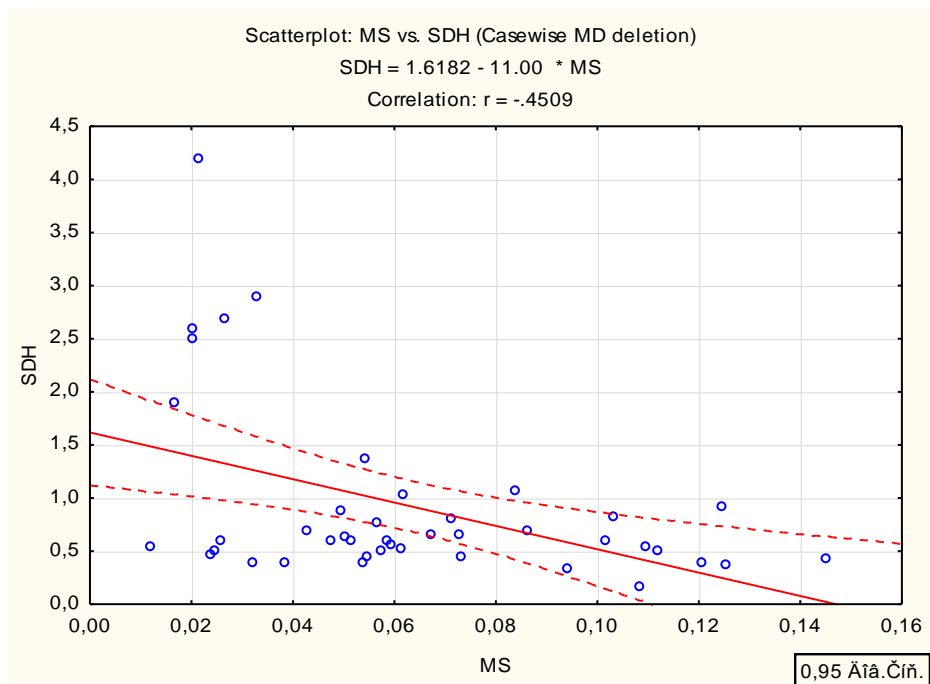


Рис. 4.8. Кореляційна залежність інтенсивності набрякання мітохондрій та комплексу II ланцюга переносу електронів гепатоцитів даніо за умов експозиції в присутності підвищених концентрацій тербутилазину та малатіону.

4.3. Експресія таргетних генів печінки даніо за впливу тербутилазину та малатіону

Вважають, що фактор транскрипції Nrf2 відіграє ключову роль в підтримці клітинного редокс-балансу в умовах стресу і останнім часом розглядається як потенційна мішень для терапії широкого спектру захворювань та патологічних станів, у патогенезі яких важливу роль відіграє окисний стрес. У нативному стані активність транскрипційного фактору Nrf2 є низькою внаслідок його швидкого убіквітування і деградації в 26S-протеасомі, а також завдяки модифікаціям його амінокислотних залишків, що регулюють його транспорт в ядро і зв'язування з ДНК. За допомогою аутофагії і епігенетичної регуляції досягається тривала активація Nrf2, яка може лежати

в основі підвищеної стійкості до впливу хімічних та фізичних факторів, які мають прооксидантну природу.

Збільшення експресії Nrf2 у печінці смугастого даніо було відзначено нами за впливу тербутилазину у вищій діючій концентрації та, особливо, за впливу малатіону у концентраційно-залежному аспекті (Рис. 4.9). Разом з тим, для убіквітину зміни були протилежно спрямовані та негативно корельовані (Рис.4.9).

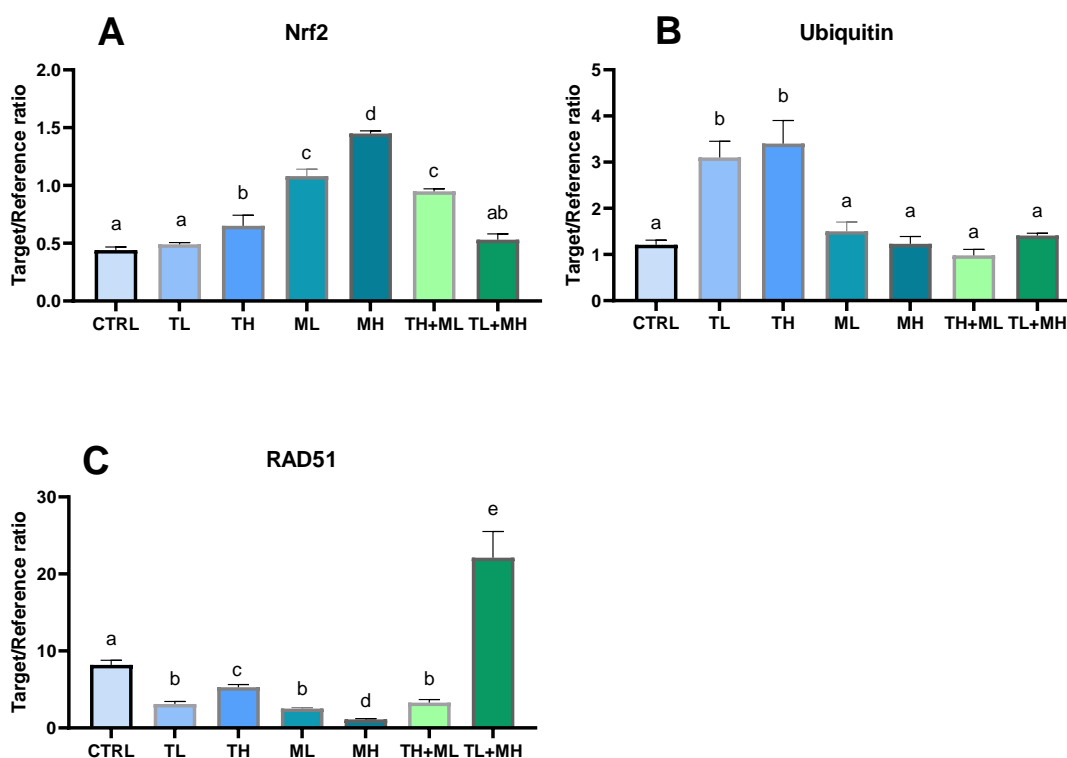


Рис.4.9. Вплив тербутилазину та малатіону на експресію генів, що регулюють відповідь організму на окисний стрес (А), убіквітинування (В), та репарацію ушкоджень ДНК (С). Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатіон 5 мкг/л; MH – малатіон, 50 мкг/л. Різні літери вказують на статистично значущу різницю між контрольною та експериментальною групами ($p < 0,05$).

Як відомо, шляхом убіквітинування протеїни можуть позначатися для подальшої протеасомної деградації та/або для ініціації/запобігання протеїн-протеїн інтеракції. Очевидно, підвищений рівень експресії убіквітину за впливу тербутилазину можна розцінювати як адаптивну реакцію – можливість видалення пошкоджених протеїнів та запобігання подальшому розвитку цитотоксичних проявів. У свою чергу, відсутність змін рівня експресії убіквітину за впливу малатіону та суміші пестицидів може вказувати на перевищення лімітів толерантності організму та прогресування патологічних змін, які у віддаленій перспективі можуть призвести до незворотних змін та загибелі особини.

Зміни експресії генів, що регулюють процеси репарації ДНК (RAD51) були здебільшого пов'язані з їх пригніченням (Рис. 4.10), що очевидно було одним з факторів накопичення продуктів окисної деструкції біомолекул та фрагментації ДНК (Рис.4.10). Підтвердженням цього припущення служить зменшення рівня фрагментації ДНК у групі TL+MH, коли експресія RAD51 зростала практично втричі.

Експресія каспази 3, як ключового ензиму апоптозу, зростала у всіх досліджуваних групах, за одним виключенням, особливо помітно за впливу суміші TL+MH (Рис.4.10). Цікаво, що саме в цій групі було відзначено і апрогулювання процесів репарації ДНК, та, з іншого боку, найнижчий рівень зпоміж досліджуваних груп рівня фрагментації ДНК (Рис. 4.10) та відносно невисокий рівень карбонільованих протеїнів, при найвищому рівні пероксидації ліпідів. Очевидно, це вказує на ефективне видалення продуктів окисної деструкції шляхом мобілізації не лише репаративних механізмів, але й програмованої смерті клітини. У свою чергу рівень експресії регуляторів апоптозу BAX/Bcl-2 істотно не змінювався, особливо у випадку антиапоптичного регулятора Bcl-2.

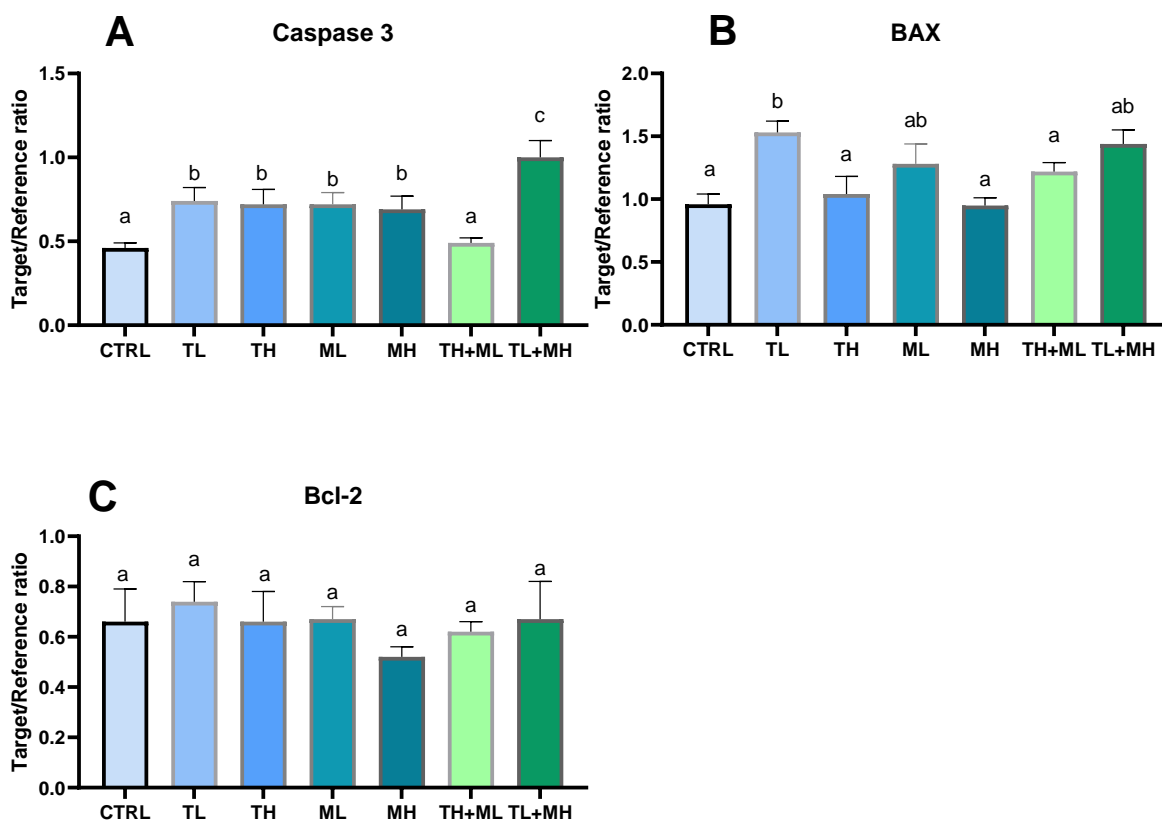


Рис. 4.10. Вплив тербутилазину та малатіону на експресію генів, що беруть участь в апоптозі. Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатіон 5 мкг/л; MH – малатіон, 50 мкг/л. Різні літери вказують на статистично значущу різницю між контрольною та експериментальною групами ($p < 0,05$).

Вважають, що імунітет риб насамперед забезпечується шляхом функціонування антитіл IgM, які відповідають як за вроджений, так і за адаптивний імунітет у риб. Ефекторні функції IgM включають активацію комплементу, який як лізує, так і опсонізує патогени (Mashoof and Criscitiello, 2016). IgM також опосередковує аглютинацію для фагоцитозу та видалення збудників, а також клітинну цитотоксичність (Mashoof and Criscitiello, 2016). Як свідчать результати наших досліджень з-поміж досліджуваних пестицидів лише малатіон ініціював експресію IgM, тоді як за дії тербутилазину як окремо так і в суміші рівень IgM залишався на рівні контролю, що, очевидно, свідчить

про зниження чутливості імунної системи риб та неспроможність мобілізувати захисні сили за умов комплексного навантаження на організм.

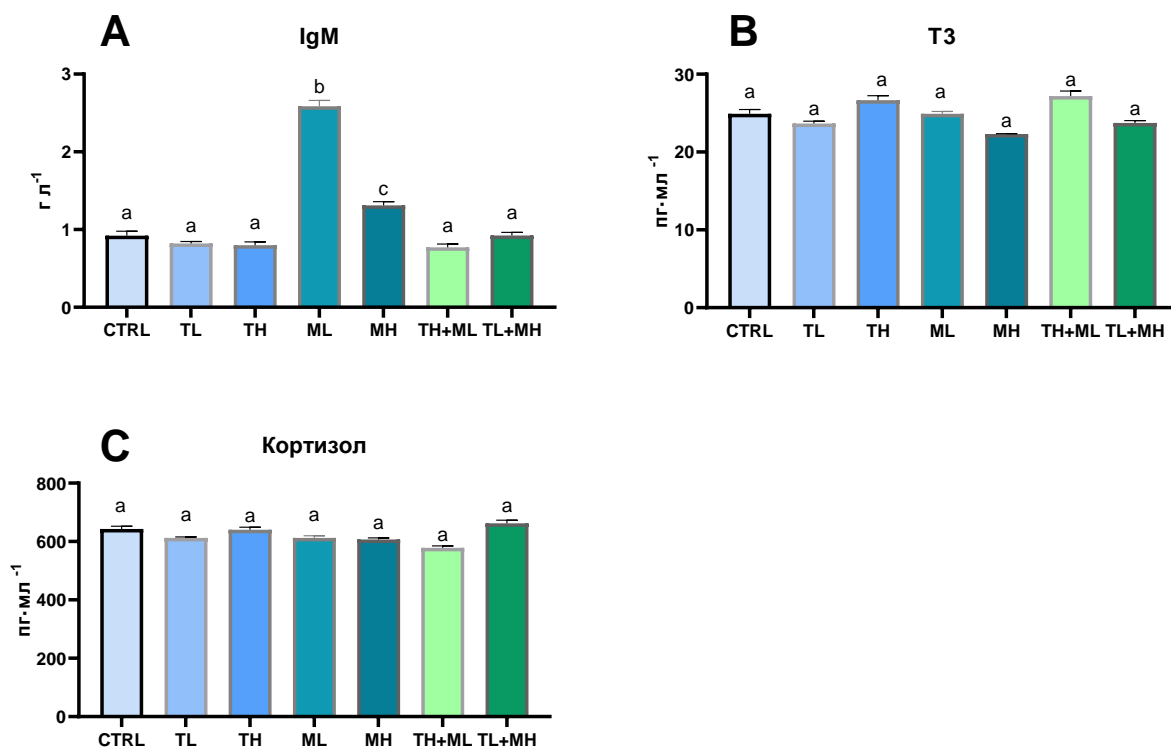


Рис. 4.11. Вплив тербутилазину та малатиону на показники стану імунної (А) та ендокринної (В-С) систем у печінці *D. rerio*. А – концентрація імуноглобуліну М, В – вміст трийодотироніну, С – концентрація кортизолу. Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатион 5 мкг/л; MH – малатион, 50 мкг/л. Різні літери вказують на статистично значущу різницю між контрольною та експериментальною групами ($p < 0,05$).

З іншого боку рівень експресії стрес-гормону кортизолу та трийодотироніну залишався стабільним у порівнянні з контролем, незалежно від природи діючого чинника, що вказує на відсутність ендокринних розладів. Як відомо, атразин, який належить до аналогічної групи пестицидів, що й тербутилазин (клас хлоротриазинів), був заборонений до використання у багатьох країнах з приводу високої ендокрин-дизруптивної дії. Було доведено, що атразин пригнічує синтез андрогенів у дорослих особин жаб і андроген-

залежний ріст гортані у личинок самців, що розвиваються, підвищує рівень вітеллогеніну у чоловічих особин риб та жаб, пригнічує статевий потяг та викликає істотні зміни у рівні кортизолу (Hanson et al., 2019; Hayes et al., 2010). Відсутність ознак ендокринних розладів за впливу тербутилазину свідчить на його користь як замітника атразину, використання якого набуває все більшої популярності.

4.4. Вплив тербутилазину та малатіону на морфологічні та функціональні характеристики лізосом гепатоцитів данію

Стабільність лізосомальних мембран є неспецифічним індикатором стану організму. Низка досліджень у молюсків показує істотну кореляцію стабільності лізосомальних мембран з різними біомаркерами ефекту (окисний стрес, генотоксичність, клітинна цілісність), які призводять до порушень аутофагічних процесів (Moore et al., 2006). У лабораторних дослідженнях було висловлено припущення, що дестабілізація лізосомальних мембран передують збільшенню лізосом (Moore et al., 2006) і що обидві відповіді можуть, таким чином, вказувати на біологічну дію стресорів навколишнього середовища, забезпечуючи ранній сигнал про дистрес на організменному та екосистемному рівнях (ICES, 2006). Разом з тим, у нижчих хребетних реакція лізосом, як раннього біомаркера, вивчена недостатньо. Наші дослідження показали, що тербутилазин та, особливо, малатіон викликають дестабілізацію лізосомальних мембран гепатоцитів данію (Рис. 4.12). Це супроводжується активацією серинової лізосомальної протеази катепсину Д, за виключенням груп сумісного впливу пестицидів (Рис. 4.12). Більше того, кореляційний аналіз підтверджує високий рівень взаємозв'язку між активністю катепсину Д та рівнем експресії убіквітину (Рис. 4.12), що вказує на активацію аутофагічних процесів у групах, які були експоновані у присутності окремого пестициду, особливо тербутилазину, та недостатній рівень аутофагії за умов

сумісного впливу, що в свою чергу може призвести до накопичення пошкоджених протеїнів.

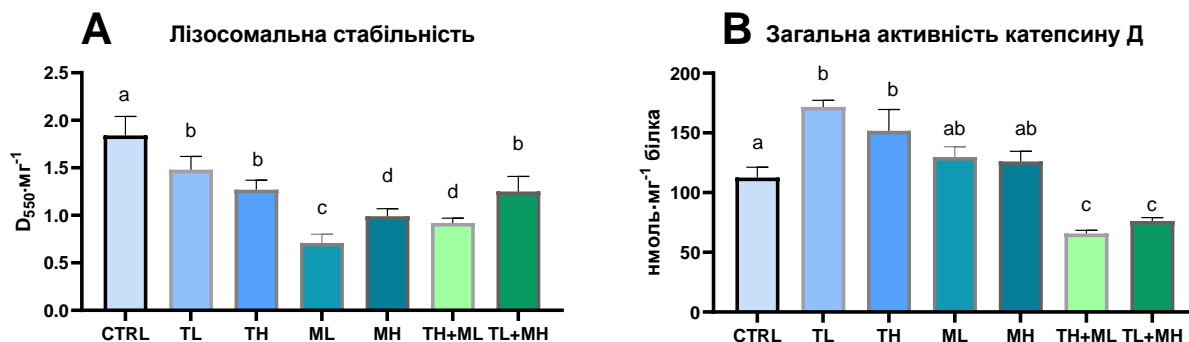


Рис. 4.12. Вплив тербутилазину і малатиону на утримання лізосомами барвника нейтрального червоного (А) та активність катепсину D (В) у печінці *D. rerio* (n = 6). Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатион 5 мкг/л; MH – малатион, 50 мкг/л. Різні літери вказують на статистично значущу різницю між контрольною та експериментальною групами (p < 0,05).

4.5. Прояви цито- та генотоксичності у даніо за впливу тербутилазину та малатиону

За умов експерименту у печінці смугастого даніо було відзначено збільшення фрагментації ланцюгів ДНК у гепатоцитах рибок у більшості досліджуваних групах, як ознаку генотоксичності (Рис. 4.13). Порушення цілісності ДНК клітин смугастика виникає на тлі пригнічення антиоксидантів, що підтверджено результатами кореляційного аналізу (Рис. 4.13). Останнім часом все більше уваги приділяють вивченню механізмів окисного ушкодження ДНК в риб, позаяк існує думка, що фрагментація ДНК може спричинятися як безпосередньо впливом токсиканту(-ів) так і вторинними радикальними процесами у клітині. Було показано, що окисне ушкодження ДНК сприяє фоновому рівню одного 8-гідроксидезоксигуанозину (найпоширенішої окисненої основи) на 130 000 основ ядерної ДНК щурів, що

подібно до рівня, який спостерігається у різних видів риб (Mitchelmore and Chirman, 1998). 8-Гідроксидезоксигуанозин спричиняє неправильне кодування і, отже, може бути важливим фактором у «спонтанних» пухлинах. У нашому випадку причиною виникнення фрагментації ДНК може бути рівним чином обидва фактори.

Важливо, що збільшення генотоксичних (Рис. 4.13) проявів не інтенсифікує процеси репарації ДНК у клітині, визначені за рівнем експресії RAD51 (Рис. 4.13), що унеможливує своєчасне усунення ушкоджених фрагментів з наступним можливим порушенням процесів синтезу протеїнів у клітині, а відтак, її загибелі у віддаленій перспективі.

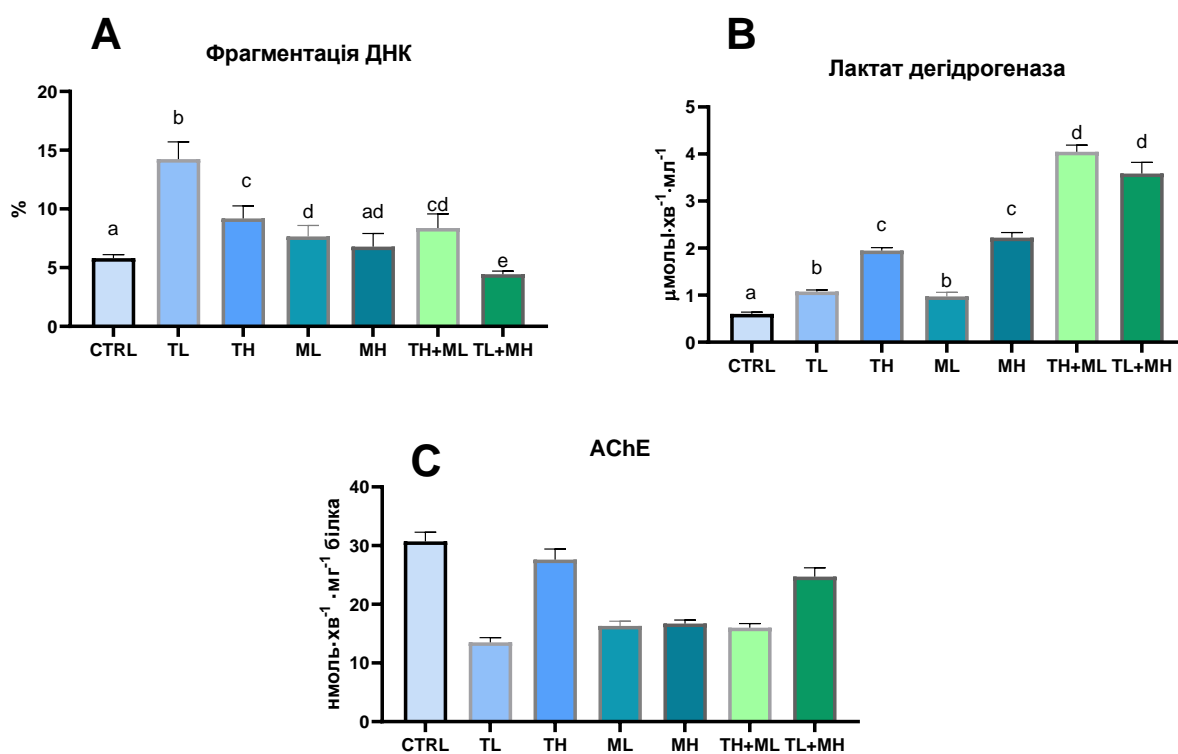


Рис. 4.13. Генотоксичні та цитотоксичні зміни у печінці, крові та мозку даніо

D. rerio за впливу тербутилазину і малатіону на організм (n = 6).

Експериментальні групи: CTRL – контроль, TL – тербутилазин, 2 мкг/л; TH – тербутилазин, 30 мкг/л ML – малатіон 5 мкг/л; MH – малатіон, 50 мкг/л. Різні літери вказують на статистично значущу різницю між контрольною та експериментальною групами (p < 0,05).

експериментальною групами (p < 0,05).

Водночас, активність лактатдегідрогенази у крові данію, як показник цитолізу, зростала залежно від концентрації. Особливо істотне збільшення лактатдегідрогеназної активності було відзначено за впливу суміші пестицидів, що узгоджується із більш істотними проявами окисного ушкодження та нижчим рівнем апоптозу та аутофагії в цих групах (Рис. 4.13).

Як і було очікувано, вплив органофосфатного інсектициду малатіону викликав пригнічення ацетилхолінестеразної активності у мозку смугастого данію, однак незалежно від концентрації діючого чинника (Рис. 4.13). Разом з тим, тербутилазин пригнічував ацетилхолінестеразну активність лише за впливу низької концентрації. Це вказує на прояви помірної нейротоксичності досліджуваних пестицидів для данію.

4.6. Інтегральний аналіз реакцій данію до впливу тербутилазину та малатіону в екологічно-реальних та субтоксичних концентраціях

Аналіз даних за допомогою методу дискримінантного аналізу (PLS-DA, Projection to Latent Structures – Discriminant Analysis) дозволило виявити утворення трьох кластерів груп досліджуваних тварин на підставі фізіолого-біохімічних реакцій організму до впливу діючих чинників. Зокрема, група контролю відділяється від інших за Компонентом 2, групи за впливу малатіону утворюють спільний кластер, до якого входить також група за впливу високої концентрації тербутилазину.

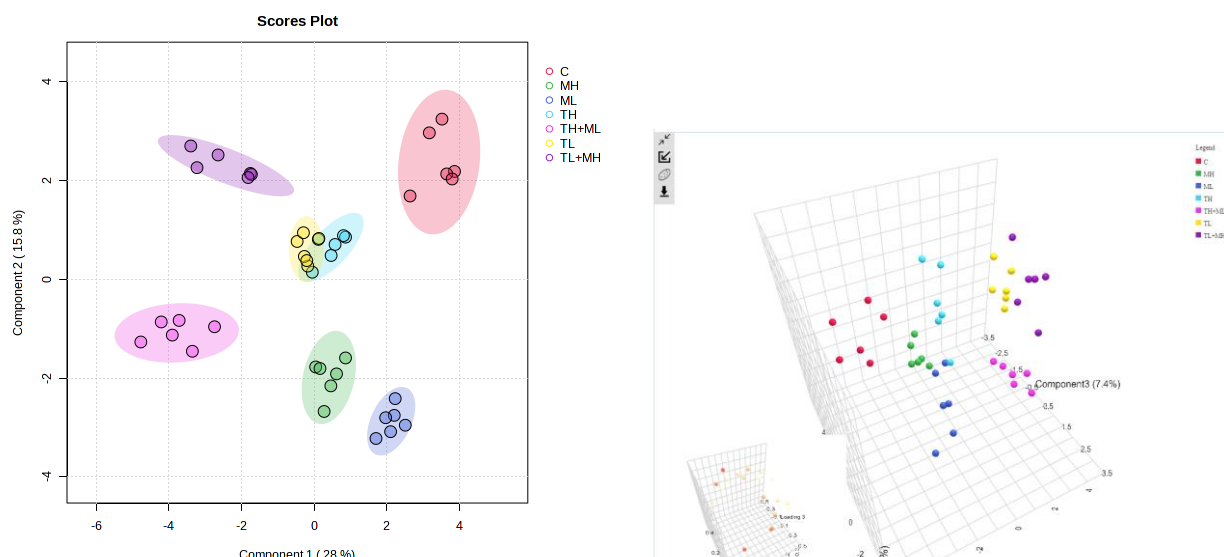


Рис. 4.14. Графічне зображення результатів дискримінантного аналізу (PLS-DA, Projection to Latent Structures – Discriminant Analysis) фізіолого-біохімічних реакції данію до впливу малатіону та тербутилазину.

До третьої групи входять групи за впливу низької концентрації тербутилазину по окремо та в суміші з одного боку та група спільної дії TH+ML, яка частково є відділена у площині Компоненти 3. Таке розташування груп за умов комбінованого впливу очевидно вказує на антагоністичну взаємодію тербутилазину та малатіону за умов одночасної присутності у середовищі. Найближче до групи контролю розташована група тербутилазину TH відповідно до відстані Махаланобіса (табл. 4.1).

Табл. 4.1

Взаємне розташування груп на основі обрахунку квадрату відстані Махаланобіса дискримінантного аналізу фізіолого-біохімічних реакції данію до впливу малатіону та тербутилазину

Group	Squared Mahalanobis Distances						
	C	TL	TH	ML	MH	TH+ML	TL+MH
C	0.000	2003.421	463.135	1087.870	1396.895	1922.834	1970.088
TL	2003.421	0.000	1898.434	2340.695	3400.239	1405.842	987.314
TH	463.135	1898.434	0.000	1388.759	1998.573	2437.839	2274.352
ML	1087.870	2340.695	1388.759	0.000	791.183	2567.218	3463.028

MH	1396.895	3400.239	1998.573	791.183	0.000	1998.190	3721.646
TH+ML	1922.834	1405.842	2437.839	2567.218	1998.190	0.000	794.743
TL+MH	1970.088	987.314	2274.352	3463.028	3721.646	794.743	0.000

Згідно результатів аналізу Рендом форест (Random Forest) встановлено, що лактатдегідрогеназна активність, рівень загальної антиоксидантної здатності, перекисного окиснення ліпідів та експресії RAD51 належать до показників, які вносять найбільш вагомий вклад у розподіл груп (Рис. 4.15). Матриця розподілу груп не містить помилкових класифікацій. До показників середньої сили відносяться інтенсивність набрякання мітохондрій, експресія Nrf2 та рівень імуноглобуліну IgM (Рис. 4.15). Таким чином, вищезазначених сім показників можна рекомендувати для інтегральної оцінки стану організму, який потенційно зазнає впливу пестицидів, а також для встановлення природи діючого чинника, позаяк показники проявляють і чинникоспецифічну реакцію, наприклад як IgM, який значно зростає у данію за впливу малатіону і не змінюється за впливу тербутилазину.

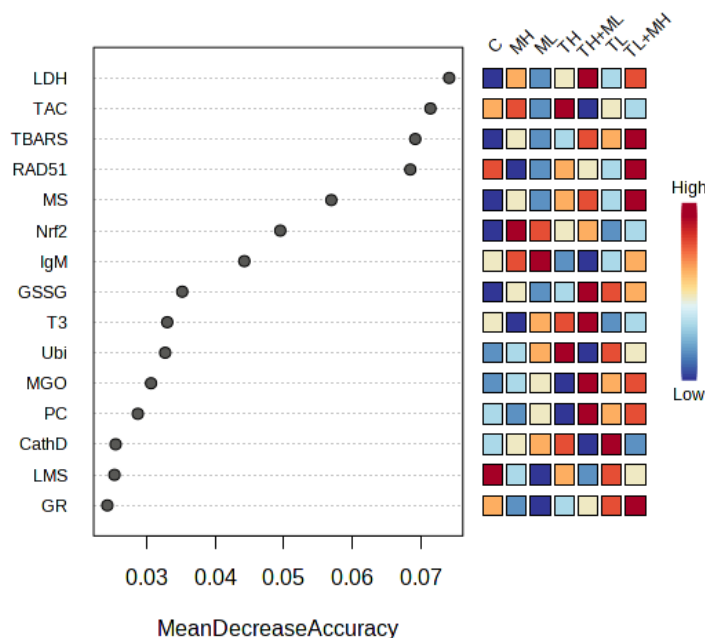


Рис. 4.15. Результати аналізу Рендом форест (Random Forest) щодо визначення найбільш чутливих показників з набору даних фізіолого-біохімічних показників данію за впливу малатіону та тербутилазину.

Відтак, тербутилазин та, особливо, малатион у екологічно релевантних концентраціях здійснюють вагомий вплив на стан системи антиоксидантного захисту, морфологічні та функціональні показники мітохондрій та лізосом, а також імунітет данію, що відображається в активації апоптозу та аутофагії. Також за збільшення концентрації пестицидів у середовищі посилюються ознаки цитотоксичності в крові риб та спостерігається дисбаланс між антиоксидантами та прооксидантами. Вплив суміші пестицидів має ознаки антагоністичної взаємодії, однак з високим рівнем цитотоксичних змін та послаблення процесів аутофагії/апоптозу.

РОЗДІЛ V. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Забруднення водойм вважається однією з головних проблем у всьому світі. Широкий спектр забруднювачів антропогенного походження потрапляє у водні екосистеми та може призводити до серйозних наслідків пов'язаних із змінами гідрологічних циклів, викликати зменшення біорізноманіття та, опосередковано, впливати на стан здоров'я людини (Rohani, 2023). Вже сьогодні підвищені рівні як «класичних» так і «емерджентних» забруднювачів у водних екосистемах, зокрема пестицидів, фармацевтиків, мікропластику та металів, викликають серйозне занепокоєння серед дослідників у всьому світі (Backhaus et al., 2019; Statistic, 2023). З-поміж полютантів пестициди вважаються найактивнішими у водному середовищі і можуть викликати токсичні прояви у живих організмів вже в наномолярних концентраціях (Bodnar et al., 2022). Вони можуть зумовлювати пригнічення росту та обмеження розвитку личинок і ембріонів тварин (El-Amrani et al., 2012; Gaur and Bhargava, 2019), зміну гематологічних показників (Amin and Hashem, 2012; D'Costa et al., 2018) та фізіолого-біохімічні порушення (Plisetskaya, 1989, Bodnar et al., 2022) у безхребетних гідробіонтів та риб, причому впливи можуть мати пестицидо-специфічний, концентраційно-залежний та видо-специфічний характер.

Риби належать до біоіндикаторних організмів стосовно впливу пестицидів, позаяк не лише фізіолого-біохімічні, але й морфологічні та поведінкові показники високочутливо реагують на їх присутність у середовищі (Jayaraj et al., 2016; Rohani, 2023). Незважаючи на значну кількість публікацій за напрямком (за даними PubMed ключовим словам “Fish” “Pesticide” “Toxicity” відповідає 5751 публікація станом на 30.11.2023), існує низка прогалин, які особливо стосуються молекулярних реакцій риб до впливу пестицидів та їх сумішей у екологічно реальних концентраціях. З цією метою

нами було проведено низку експериментів впливу раундапу, хлорпірифосу, малатіону та тербутилазину поокремо та в суміші в екологічно реальних та субтоксичних концентраціях, які при цьому не перевищували 5% LC₅₀. Зокрема, для раундапу (гліфосат), згідно бази даних Агенції захисту довкілля США, що містить для відповідної комбінації 1192 записи (Erickson, 2023) LC₅₀ коливається для риб в рамках від 43 до 645 мг/л, що в нашому випадку не перевищувало 2% LC₅₀.

Для хлорпірифосу LC₅₀ коливається для риб в рамках від 10 до 1000 мкг/л за результатами 3024 записів (EPA, 2022). Використані нами 0,1 та 3 мкг/л не перевищують 5% LC₅₀⁹⁶ для корошових риб навіть у випадку вищої концентрації (ECOTOX, 2023). Для малатіону відповідні значення LC₅₀ становлять 0,24 – 10-16,2, мг/л, що в нашому випадку (5 та 50 мкг/л) не перевищувало 3% LC₅₀.

Якщо для фосфорорганічних пестицидів база даних Агенції захисту довкілля США задовільно наповнена, то для тербутилазину база даних гострої токсичності для водних організмів дуже обмежена, несистематична і включає лише 159 записів, які дотичні як NOEC, LOEC, так і LC₅₀. у різних водних тварин При цьому встановлені експериментально значення NOEC та LOEC, до прикладу, на підставі порушення рухової активності, рівня ТБК-АП та швидкості росту коливаються від > 0.001-0.0031 мг/л до < 5.6 мг/л (ECOTOX, 2023). Для карася та гупії LC₅₀⁹⁶ було встановлене на рівні 4,3 мг/л, а для форелі – 1,14 мг/л (ECOTOX, 2023), що у випадку використаних нами 2 та 30 мкг/л тербутилазину не перевищує 2,6% LC₅₀⁹⁶ навіть у випадку вищої концентрації.

Незважаючи на те, що використані нами концентрації фосфорорганічних та триазинового гербіцидів та інсектицидів були значно нижчі, ніж зазвичай використовувані в екотоксикологічних експериментах та відповідали їх фоновому вмісту у водоймах, ми виявили палітру деструктивних змін на молекулярному та клітинному рівнях у корошової

рибки даніо, дотичних до окисного стресу, ендокринних порушень, імуно- та цитотоксичності, які за умов хронічного впливу, очевидно, можуть мати незворотній вплив на стан систем організму та призводити до загибелі особин.

5.1. Окисний стрес – як домінантна реакція коропової рибки даніо на вплив гербіцидів та інсектицидів класу органофосфатів та триазинів

Наші дослідження надали переконливі докази того, що окисний стрес відіграє важливу роль в токсичності раундапу та хлорпірифосу. Зокрема були виявлені ознаки порушення клітинного окисно-відновного балансу, які відображалися у накопиченні продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків, а також фрагментованих молекул ДНК й окисненого глутатіону у печінці *D. rerio*. Разом з тим, хлорпірифос виявився сильнішим прооксидантом, ніж раундап, про що свідчить високий рівень накопичених продуктів окисної деструкції при значно нижчих тестових концентраціях хлорпірифосу (0,1–3 мкг/л), ніж раундапу (15–500 мкг/л, що відповідає ~7,2 і 240 мкг/л гліфосату), низкою ознак цитотоксичності (напр. вихід лактатдегідрогенази у кров) та ураження лізосомальних і мітохондріальних мембран. Висновок про вищу токсичність хлорпірифосу порівняно з раундапом підтверджується багатофакторним (РСА та дискримінантним) аналізом мультибіомаркерних профілів *D. rerio* (Рис. 3.12). Варто зазначити, що хлорпірифос демонструє вищу спорідненість до біоконцентрації в тканинах риб, ніж гліфосат (діюча речовина раундапу), ймовірно, через вищу ліпофільність хлорпірифосу (El-Amrani et al., 2012), що може сприяти вищій токсичності хлорпірифосу порівняно з раундапом.

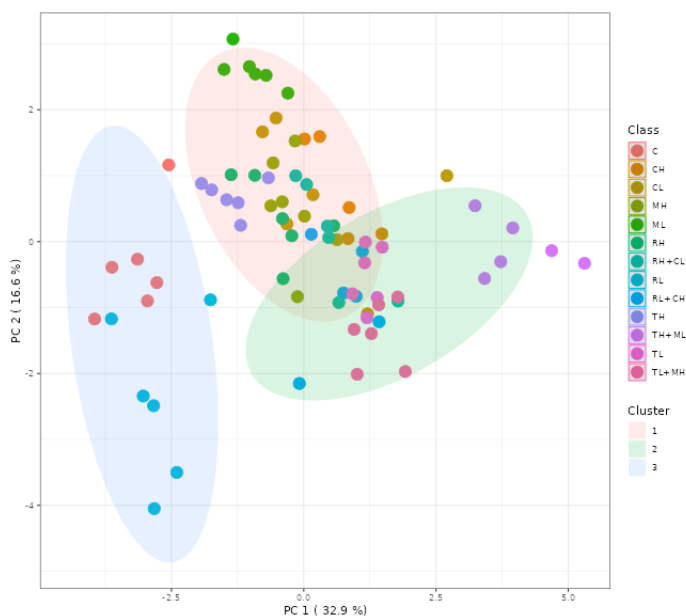
Цікаво, що ефекти суміші раундап-хлорпірифос показали ефекти, подібні до ефектів, спричинених відповідними концентраціями хлорпірифосу окремо, що вказує на те, що як більш токсичний з двох досліджуваних пестицидів, хлорпірифос був переважним рушієм окисного стресу,

спричиненого сумішами пестицидів. Найбільш послідовними маркерами окисного пошкодження, спричиненого екологічно реальними концентраціями хлорпірифосу та раундапу в рибках даніо, були ТБК-АП та розриви ланцюгів ДНК, що вказувало на високу чутливість ліпідів мембрани та ДНК до пестицидів.

Про важливу роль окисного стресу як токсичного механізму дії пестицидів повідомлялося і в попередніх дослідженнях на хребетних і безхребетних (Falfushynska et al., 2012, 2013, 2022a; Lushchak et al., 2009, 2018). Зокрема, гострий і хронічний вплив пестицидів класу неонікотиноїдів (імідаклоприду), тетразину (Аполло) і тіокарбамату (Татту) викликали окисне ушкодження ліпідів у риб, про що свідчить накопичення ТБК-АП (Falfushynska et al., 2012, 2013; Marins et al., 2021; Vieira et al., 2018). Подібним чином комерційні препарати пестицидів, що містять 0,3–0,6 мкг/л циперметрину та 0,5–1,0 мкг/л хлорпірифосу, призводили до значного накопичення ТБК-АП у тканинах коропа та даніо (Nunes et al., 2018). Підвищення рівня ТБК-АП спостерігалось в печінці та м'язах риб *Pseudoplatystoma sp.*, яких піддавали гострому впливу високих концентрацій (15 мг/л) раундапу (Sinhorin et al., 2014). Також факти окисного ушкодження білків (на яке вказує накопичення карбонілів білків) були показані у зябрах і печінці неотропічної риби *Prochilodus lineatus* після впливу 1,25–1250 мкг/л імідаклоприду (Vieira et al., 2018), у печінці та мозку риби *Pseudoplatystoma sp.*, яку піддали впливу 15 мг/л раундапу (Sinhorin et al., 2014), а також у печінці та мозку *Rhamdia quelen*, яку експонували в присутності 0,11 мкг/л імідаклоприду та 0,039 мкг/л пропоксуру (Marins et al., 2021). Ці висновки разом із результатами нашого нинішнього дослідження рибок даніо підтверджують уявлення про ключову роль окисного стресу в токсичності пестицидів.

Аналогічно до раундапу і хлорпірифосу, малатіон і особливо тербутилазин у тканині печінки індукували утворення активних форм

окиснену та нітрогену, пригнічували активність антиоксидантів та ініціювали окисне ушкодження біомолекул, що підтверджує прооксидантну природу досліджуваних гербіцидів та інсектицидів. Незважаючи на те, що глибина прооксидантних проявів була більш значною у тварин, які зазнали впливу екологічно реальних концентрацій тербутилазину та малатиону, у тварин за впливу пестицидів у високих концентраціях та їх суміші спостерігався дисбаланс відповіді системи антиоксидантного захисту, що відповідало більш істотному виходу ЛДГ в кров та набряку мітохондрій як маркерів пошкодження клітинних структур та ознаки загальної токсичності та стресу. Цілком ймовірно, що накопичення активних форм кисню і продуктів окисного пошкодження може активувати таргетні фактори транскрипції та ініціювати продукцію антиоксидантів та протизапальних цитокінів після посилення деструктивних змін на молекулярному рівні та появи гістопатологічних ознак (Birben et al., 2012). Тим не менш, піддаючись тривалому негативному впливу пестицидів, особливо коли захисні системи досягають меж толерантності, в організмі можуть розвиватися незворотні зміни, які у віддаленій перспективі можуть призвести до загибелі особини.



A

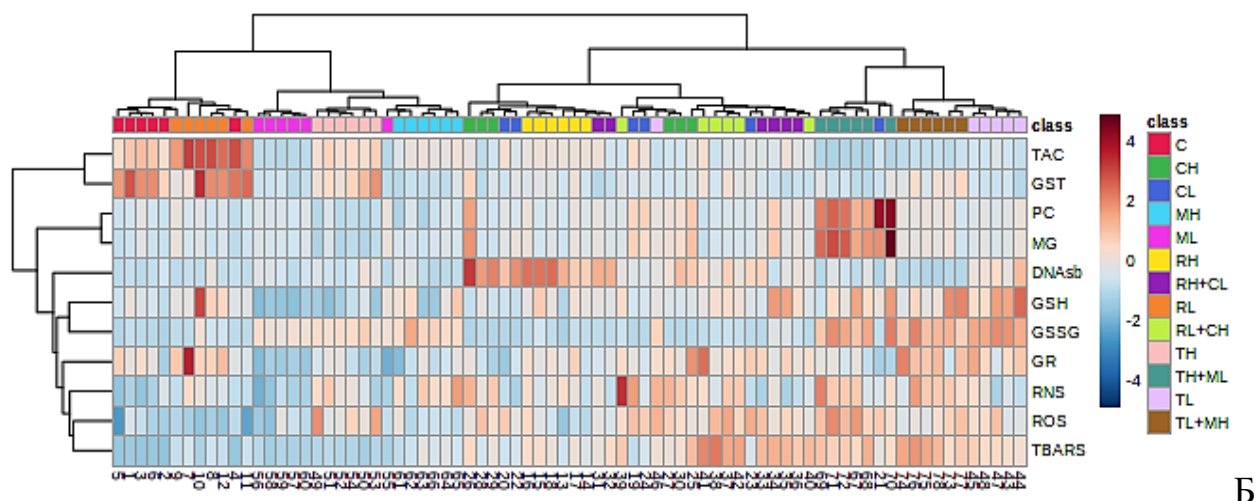


Рис. 5.1. К-кластеринг (А) та теплова карта (heatmap) (Б) показників системи антиоксидантного захисту та окисних ушкоджень печінки смугастого даніо за впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів

Вплив хлорпірифосу та сумішей, що містять хлорпірифос, а також тербутилазин призводив до накопичення у печінці риби даніо реактивного α -оксоальдегіду метилгліоксалу. Згідно наших даних, інформація щодо впливу пестицидів на карбонільний стрес обмежена, причому не лише у водних тварин, але й в ссавців. Метилгліоксаль – побічний продукт гліколізу, який знешкоджується ензимами гліоксалазної системи (Rabbani et al., 2020). Метилгліоксаль здатний спонтанно реагувати з біополімерами, утворюючи кінцеві продукти глікації, які обумовлюють патології, пов’язані зі старінням, онкологією, нейродегенеративними процесами тощо. Порушення балансу між виробленням та видаленням метилгліоксалу призводить до дикарбонільного стресу, що, в свою чергу, призводить до пошкодження протеїнів та ДНК через утворення аддуктів з метилгліоксалем (Rabbani and Thornalley, 2010). Окисний стрес посилює дикарбонільний стрес, ймовірно, через GSH-залежність системи гліоксалази (Rabbani et al., 2020). Наші результати продемонстрували спільне виникнення окисного та дикарбонільного стресу у рибок даніо, особливо послідовно у груп, які зазнали впливу хлорпірифосу, і підтвердило уявлення про те, що підвищений рівень окисного стресу пов’язаний із накопиченням дикарбонілів. Таким чином, тварини, які піддавалися впливу

хлорпірифосу та суміші раундап-хлорпірифос, показали найвагоміші та найбільш послідовні докази окисно-відновних порушень (включаючи підвищені рівні АФО, накопичення ТБК-АП, карбонільних похідних білків, GSSG та пригнічення антиоксидантного захисту), пов'язаного з високим накопиченням метилгліоксалу у печінці. У рибок даніо, за впливу раундапу та малатіону, очевидно більш м'який окисний стрес був пов'язаний із відсутністю накопичення метилгліоксалу. Разом з тим варто зазначити, що наше нинішнє дослідження не дозволяє встановити причинно-наслідковий зв'язок між окиснювальним і дикарбонільним стресом у риб, які зазнали впливу пестицидів, що вимагає подальшого дослідження.

Доведено, що глутатіон відіграє важливу роль у підтримці клітинного гомеостазу шляхом знешкодження активних форм кисню, що утворюються в результаті метаболічних процесів та під впливом екзогенних чинників. Порушення балансу окисно-відновного клітинного пулу глутатіону призводить не тільки до окисного стресу, але й створює передумови до ендogenousного накопичення NO, що, у свою чергу, сприяє нітрозилуванню протеїнів, S-нітрозилуванню та розриву ланцюгів ДНК (Aquilano et al., 2014). Низькі концентрації тербутилазину, згідно з нашими даними, призводили до збільшення концентрації глутатіону, який частково компенсував пригнічення активності каталази, підтримував окисно-відновний стан клітин, зв'язував NO та пом'якшував окисне пошкодження та цитотоксичність, викликану дією пестицидів. Однак із збільшенням концентрації тербутилазину в навколишньому середовищі антирадикальна здатність GSH у печінці рибок даніо значно знижується. Хоча рівень окисного ушкодження у групі TH був нижчим порівняно з групою TL, пошкодження клітин було більш прогресуючим, відповідно до більш інтенсивного виходу ЛДГ та набряку мітохондрій. Очевидно, що GSH у рибок даніо служить важливим буфером для NO, який цілком може виконувати роль ключового медіатора пошкодження клітин при токсичності тербутилазину та захищає організм від

надмірної токсичності. Важливу роль NO було доведено також для індукованих тербутилазином ендокринних порушень у гранульозних клітинах яєчників людини (Park et al., 2016).

Примітно, що концентрації GSSG зростали в печінці рибок даніо під час усіх експериментальних впливів, причому найбільш істотне збільшення відзначено у групах, за впливу тербутилазину та сумішей пестицидів. Це вказує на те, що GSH за впливу пестицидів може бути окиснений в процесі детоксикації утворених активних форм кисню і нітрогену у риб. Посилене окислення GSH для контролю окисно-відновного балансу може обмежити доступність цього важливого субстрату для інших GSH-залежних процесів клітинної детоксикації, таких як біотрансформація ксенобіотиків. Ця гіпотеза підтверджується відзначеним пригніченням активності ключового ферменту біотрансформації фази II, GST, у печінці риби, яка зазнала впливу пестицидів та їх сумішей. Єдиним винятком була риба, яка піддавалася впливу низької концентрації раундапу (15 мкг/л), де активність GST підтримувалася на початковому рівні, а помірне збільшення GSSG нейтралізувалося підвищенням загального рівня GSH у печінці.

Якщо порівняти інтенсивність проявів окисного ушкодження за впливу всіх досліджуваних пестицидів та їх сумішей, то видається, що найменш помітного ушкодження тварини зазнали за впливу екологічно реальної концентрації раундапу: ця група утворює віддалений від інших спільний кластер з тваринами групи контролю та вирізняється від інших високим рівнем антиоксидантного захисту (Рис.5.1). Зокрема, вплив низьких концентрацій раундапу сильно стимулював загальну антиоксидантну активність, підвищував рівень GSH і призводив до транскрипційної регуляції ключового білка в системі репарації ДНК RAD51. Це вказує на те, що низькі концентрації раундапу можуть викликати гормезис-подібну реакцію, посилюючи клітинні захисні системи та сприяючи нижчим рівням окисного пошкодження у тварин порівняно з іншими діючими чинниками. Проміжне положення займають

групи за впливу малатіону, хлорпірифосу поокремо та за сумісного впливу, а також групи за впливу високих концентрацій раундапу та тербутилазину. Найбільш істотні прояви окисного стресу та ушкодження (ТБК-АП, активні форми кисню та нітрогену, окиснений глутатіон) на тлі пригнічення антиоксидантів в свою чергу відсепарували групу тербутилазин-експонованих тварин (за винятком ТН-групи) (Рис. 5.1).

Якщо для фосфорорганічних пестицидів загальноприйнятим механізмом токсичності вважається пригнічення холінергічної активності як в цільових, так і в нецільових організмів, то для триазинів визначеного механізму токсичності для нецільових організмів немає (Živković et al., 2016), хоча згідно даних Європейської організації безпеки харчових продуктів (EFSA) тербутилазин та його метаболіт дезетилтербутилазин є високотоксичним для водних організмів (Živković et al., 2016). Дезетилтербутилазин та ще один метаболіт тербутилазину - тербутилазин-2-гідроксид належать до сполук прооксидантної природи та відомі своєю здатністю ініціювати перекисне окиснення ліпідів і пригнічувати антиоксиданти у червоних болотних раків (*Procambarus clarkii*) і коропа (*Cyprinus carpio*) (Abass et al., 2021; Stara et al., 2016; Velisek et al., 2016). Згідно з одержаними нами результатів саме тербутилазин викликав найбільш істотні прояви окисного ушкодження у порівнянні з іншими досліджуваними пестицидами фосфорорганічної природи. Окремі існуючі дані з використанням вищих хребетних та культур клітин людини теж свідчать на користь окисного стресу як домінуючого предиктора токсичності тербутилазину. Зокрема пригнічення Nrf2/HO-1 метаболічного шляху, як маніпулятора системи антиоксидантного захисту з відповідним пригнічення експресії антиоксидантів NQO1, NOX2 і SOD2 було продемонстровано у тканині міокарду бройлерів, що супроводжувалося активацією фероптозу (Loboda et al., 2016). Також здатність тербутилазину ініціювати окисний стрес та ушкодження була доведена з використанням цільної периферичної крові

людини, ізольованих лімфоцитів і клітин HepG2, які були піддані впливу тербутилазину протягом 4 годин в концентраціях 8,00, 0,80 і 0,58 нг/мл, що можна порівняти з поточними контрольними значеннями, встановленими Європейською комісією в 2011 році (Želježić et al., 2018).

Гострий вплив тербутилазину на лімфоцити людини та культури клітин HepG2 *in vitro* призводив до нестабільності ДНК, причому частка окисних ушкоджень ДНК не переважала в структурі.

Оскільки Nrf2 належить до плеiotропних факторів транскрипції і є головним регулятором експресії генів, які беруть участь у детоксикації, запаленні та відповіді на окисний стрес, залучення Nrf2 до захисту клітин від токсичних ефектів і окисного стресу роблять його потужним модулятором тривалості життя (Loboda et al., 2016). Вважається, що ефективна регуляція сигналізації Nrf2 підтримує окисно-відновний стан клітин і захищає клітини від індукованого ксенобіотиками апоптозу та некрозу (Alu et al., 2010; Chenxu et al., 2019). Зокрема, активація шляху Nrf2 може ефективно пригнічувати запалення клітин і експресію білків RIP3, що взаємодіють з рецепторами, які відіграють важливу роль у регуляції сигнального шляху некрозу в клітинах миші, стимульованих пальмітатом (Chenxu et al., 2019). У цьому дослідженні експресія Nrf2 у печінці рибок даніо узгоджується з активністю катепсину D та експресією убіквітину, які залучаються до реалізації апоптозу/некрозу (Roberts et al., 2022) і корелюють один з одним ($r > 0,32$, $p = 0,006$) (Рис. 5.2).

Взаємозв'язок показників описується відповідним рівнянням багатофакторної регресії: $\text{Убіквітин} = 0,14 + 0,155 \square \text{Катепсин D}^* + 0,36 \square \text{Nrf2}^*$, $F(2,75)=7.8190$ $p<0,00082$, $R^2 = 0,17$. Оскільки активні форми кисню і нітрогену можуть впливати на протеасом-убіквітинову систему, яка руйнує неправильно згорнуті білки (Sule et al., 2022), надмірна експресія Nrf2 після впливу малатіону та суміші, ймовірно, пом'якшить негативний вплив пестицидів на риб і захистить клітини і тканини даніо від глибоких пошкоджень і стимуляції некрозу.

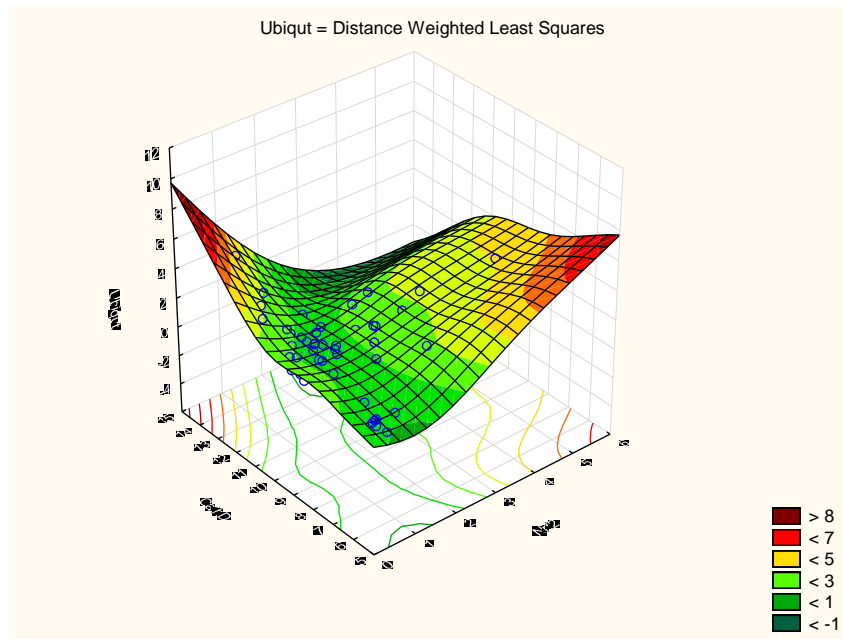


Рис. 5.2. Взаємозв'язок рівня експресії Nrf2, убіквітину та активності катепсину D у гепатоцитах даніо за впливу гербіцидів класів органофосфатів та триазинів.

Експресія мРНК Nrf2 (фактора 2, пов'язаного з ядерним фактором еритроїд 2), сильно зросла в печінці риби, яка піддавалася раундапу, і показала помірне збільшення у відповідь на високу концентрацію хлорпірифосу, тербутилазину та малатіон. Nrf2 є транскрипційним фактором, який регулює стійкість клітин до прооксидантів шляхом підвищення експресії антиоксидантів, генів аутофагії та механізмів контролю якості білка (Ma, 2013). Різні хімічні класи пестицидів є помітними індукторами Nrf2. Зокрема, було відзначено, що експресія Nrf2 зростала за впливу діазинону, дельтаметрину, діурону та метазахлору у клітинних лініях рибок даніо ZFL, ZF4 та Pac2 (Lungu-Mitea et al., 2018) та дихлофосу у личинках рибок даніо (Bui-Nguyen et al., 2015). У наших дослідженнях збільшення транскрипції Nrf2 за впливу раундапу була знівельована шляхом комбінованого впливу з хлорпірифосом, що вказує на те, що присутність більш токсичної сполуки в суміші перешкоджає клітинній сигналізації та Nrf2-залежному антиоксидантному захисту. Варто зазначити, що захисна реакція, показана

посиленням транскрипції Nrf2, є недостатньою для повного запобігання окисному ушкодженню в усіх експериментальних групах, відповідно до накопичення окисних пошкоджень ліпідів, ДНК та (у групах, за впливу хлорпірифосу) білків.

Окисне ушкодження ліпідів, ДНК і білків може викликати запрограмовану смерть клітин шляхом апоптозу, якщо рівень ушкоджень перевищує ліміти здатності механізмів клітинної репарації (Kannan and Jain, 2000). У нашому поточному дослідженні було виявлено докази індукції апоптозу у риб, які піддавали впливу тербутилазину, малатіону, а також високих концентрацій раундапу та хлорпірифосу, відповідно до підвищення експресії основного мастеррегулятора апоптозу каспази 3 у печінці. У риб, які зазнали впливу хлорпірифосу, це супроводжувалося пригніченням транскрипції антиапоптичного білка Bcl-2. Зважаючи на відсутність узгодження реакції Cas 3, BAX та Bcl-2, докази активації апоптозу та його ролі у виведенні продуктів токсичності досліджуваних фосфорорганічних та триазинового пестицидів та їх сумішей у рибок даніо можна вважати суперечливими. Зокрема, було виявлено пригнічення, а не стимуляцію експресії мРНК каспази 3 у риб, які піддавалися впливу низької концентрації раундапу та суміші раундап-хлорпірифос. Експресія мРНК проапоптичного регулятора BAX була підвищена в деяких експериментальних групах (включаючи RL, RH і RH + CL) і знижена (CL) або незмінна (CH, RL + CH) в інших. Відсутність залежності транскрипційної відповіді від концентрації в маркерах апоптозу вказує на те, що окисний стрес, індукований досліджуваними концентраціями пестицидів, міг не досягти порогу пошкодження, пов'язаного із загибеллю клітин у печінці рибок даніо.

Опрацювання показників окисного стресу за впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів методом рендом форест аналізу виявило мінімальний набір показників, який з високою точністю (частота помилки класифікації < 10%) прокласифікувати групи тварин та віднести їх до кластеру

«Тербутилазин (хлоро-s-триазини)» та «Орґанофосфати» (Рис. 5.3). Набір біомаркерів включає рівень окисного глутатіону, ТБК-АП та загальну антиоксидантну активність та дозволяє економічно-обґрунтовано та в стислі терміни не лише передбачити присутність тих чи інших пестицидів як емерджентних забруднювачів у середовищі, але й оцінити його на рівень безпеки для живих організмів.

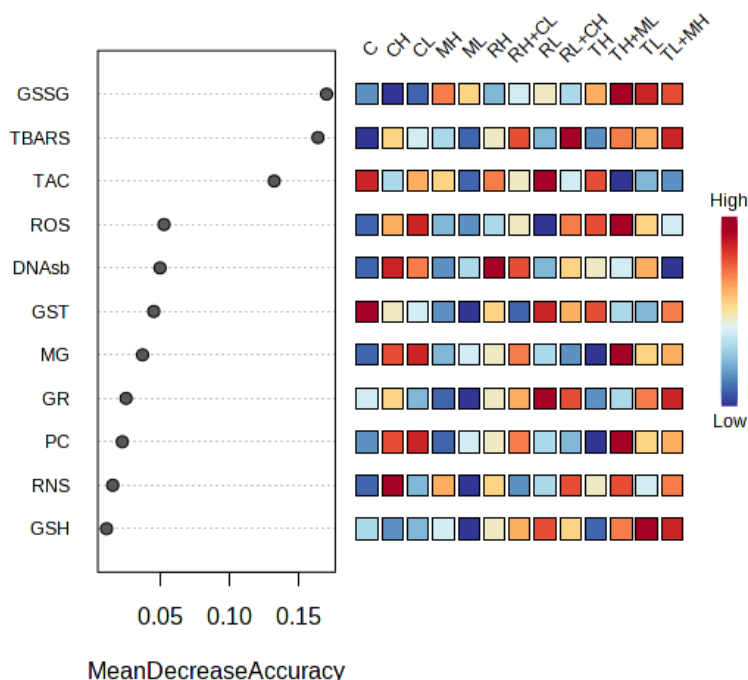


Рис. 5.3. Рендом форе́ст аналіз визначення мінімального сету біомаркерів окисного стресу до впливу фосфорорґанічних та триазинових пестицидів.

Традиційні екотоксичні тести, призначені для швидкого та недорогого проведення, повинні бути легко відтворюваними та придатними для однозначного трактування (Fisher and Hook, 2002). Відтак, такі тести зазвичай пов’язані із перевіркою гострої токсичності або оцінкою хронічних впливів на ріст і розмноження (Husak et al., 2022; Kennedy et al, 2009). Хоча ці тести, безумовно, надають цінну інформацію, однак не імітують сценарії навколишнього середовища, що диктує потребу та активний розвиток оцінки якості середовища за допомогою біомаркерів: вони не лише відображають вплив факторів навколишнього середовища або несприятливі наслідки для

стану організму від впливу забруднюючих речовин, але й проявляють чутливість до забруднювачів у нано- та мікромолярних концентраціях, які характерні для природного середовища (Hook et al., 2014). Ретельно підібрані біомаркери можуть бути найкращим підходом для виявлення ранньої реакції на забруднювачі (Broeg et al. 2005) і є набагато більш чутливими для визначення стресу організму, ніж реакція цілої тварини (Smit et al. 2009). Причому, визначення індивідуальних біомаркерів для оцінки ефекту діючого чинника є малоінформативним. З цією метою рекомендованим для оцінки ризику в рамках програм біомоніторингу є імплементація наборів біомаркерів. При цьому, відповідно до економічно-обґрунтованої моделі моніторингу, вагомим є мінімальна кількість показників, яка в одночас забезпечить високий результат. З погляду вищезазначеного мінімальний набір показників окисного стресу (рівень окисного глутатіону, ТБК-АП, загальна антиоксидантна активність), що запропонований нами для аналізу середовища щодо присутності та рівня токсичного впливу фосфорорганічних та триазинових пестицидів є коштооефективним й інформативним та може бути використаним службами екологічного контролю.

5.2. Дегенеративні зміни мітохондрій та лізосом гепатоцитів данію як ознаки впливу гербіцидів та інсектицидів класу органофосфатів та триазинів

Припускають, що фосфорорганічні пестициди можуть спричинити суттєві морфо-функціональні порушення клітинних органел та тканин нецільових тварин, у тому числі водних (Reddam et al., 2022). Вважається, що першочерговою мішенню токсичного впливу пестицидів є мітохондрії, що пов'язано із підвищеними потребами в енергозабезпеченні для усунення негативних наслідків впливів пошкоджуючого чинника та адаптації до нового оточення. Досліджувані нами пестициди, особливо хлорпірифос та

тербутилазин у формі його метаболіту, 2-гідрокситербутилазину, мають ліпофільні властивості а, отже, можуть проникати в організм шляхом пасивної дифузії, а потім збиратися всередині мітохондріального матриксу через різницю в заряді між матриксом і цитоплазмою. Очевидно це і визначало набрякання мітохондрій, яке було зареєстровано нами за умов впливу всіх досліджуваних чинників. Морфологічні зміни мітохондрій у даніо узгоджуються із пригніченням активності сукцинатдегідрогенази – комплексу II мітохондріального електронно-транспортного ланцюга. Таким чином, найбільш широко використовувані фосфорорганічні пестициди викликають не тільки морфологічні, а й функціональні зміни в мітохондріях.

Аналіз літературних джерел свідчить, що нами вперше було досліджено явище морфофункціональних змін мітохондрій у *D. rerio* після застосування раундапу, малатіону, хлорпірифосу та тербутилазину в умовах *in vivo*. Разом з тим, одержані результати щодо зниження активності СДГ за дії органофосфатних пестицидів узгоджуються з раніше проведеними дослідженнями на моделях деяких хребетних тварин, включаючи ссавців. Так, гострий вплив хлорпірифосу (1,656 мг/л) протягом 28 днів викликав інгібування сукцинатдегідрогенази в різних тканинах *Clarias batrachus* (Moustafa et al., 2016). Застосування хлорпірифосу у концентрації 50 мкМ значно зменшувало активність комплексу II+III у клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y (Želježić et al., 2018). Водночас, зміни активності сукцинатдегідрогенази можуть бути обумовлені серйозними клітинними пошкодженнями, пов'язаними з порушеннями вуглеводного та білкового обмінів (Amin and Hashem, 2012). Більш того, інгібування СДГ може сприяти генерації активних форм кисню, що спостерігалось у риб *D. rerio*, які піддавалися впливу всіх досліджуваних пестицидів (за винятком малатіону), з подальшими порушеннями інших мітохондріальних ензимів, задіяних в електронно-транспортному ланцюзі мітохондрій. Стійкий негативний взаємозв'язок активності СДГ та рівня активних форм кисню у печінці даніо

був підтверджений за допомогою регресійного аналізу ($F(1,76)=14.322$ $p<.00031$) на підставі бази даних всіх проведених експериментів (Рис. 5.3). На прикладі моделей ссавців було встановлено, що пригнічення СДГ активності призводить до накопичення сукцинату, який може викликати ознаки «псевдо-гіпоксичного» стану: сприяти накопиченню АФО, активації фактору гіпоксії HIF-1 α , та експресії генів апоптозу (Tretter et al., 2016) (Рис. 5.4). У нашому випадку простежується подібний взаємозв'язок, який не лише вказує на розвиток псевдо-гіпоксичного стану у тварин за умов впливу екологічно реальних концентрацій пестицидів, але й свідчить на користь данію, як альтернативної механістичної моделі для вивчення біохімічних процесів. Взаємозв'язок параметрів описується рівнянням багатофакторної регресії: $СДГ = 67,94 - 0,0707 \times АОФ^* + 7,4 \times ВАХ - 34,59 \times Cas3^* + 16,43 \times Bcl-2$, $F(4,73)=10.016$ $p<.00000$, $R^2 = 0,35$.

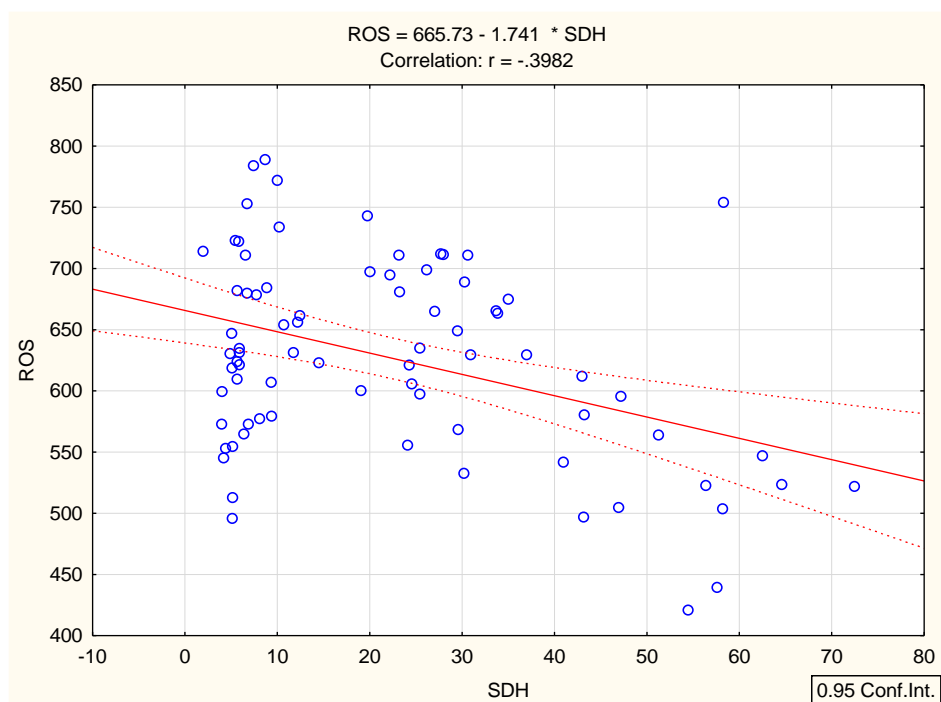


Рис. 5.4. Кореляційна залежність змін активності сукцинатдегідрогенази та рівня активних форм кисню у печінці данію за впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів.

Активні форми оксигену, які, потенційно утворюються в надлишку внаслідок розбалансування ланцюга переносу електронів у мітохондріях, можуть впливати на проникність мембран і викликати мутації як в ДНК локалізованій в ядрі, так і в мітохондріальній ДНК (Ledda et al., 2021). Причому останнє є навіть більш небезпечним, з огляду на те, що порівняно з ядром мітохондрії мають нижчий потенціал для відновлення ДНК (Mitchelmore and Chirman, 1998). Взаємозв'язок рівня фрагментації ядерної ДНК з втратою сукцинатдегідрогеназної активності та рівнем АОФ у клітині у гепатоцитах даніо було доведено за допомогою багатофакторного регресійного аналізу (Рис.5.5), причому з-поміж обраних предикторів саме сукцинат дегідрогеназа відіграє вирішальну роль у визначенні збільшення рівня фрагментації ДНК. Взаємозалежність описується наступним рівнянням: $ДНК_{фрагмент} = -12,04 + 0,0316 \times АФО^* + 0,263 \times Набрякання \text{ мітохондрій} + 0,186 \times СДГ^*$, $F_{(3,74)}=5.929$, $p<.00111$.

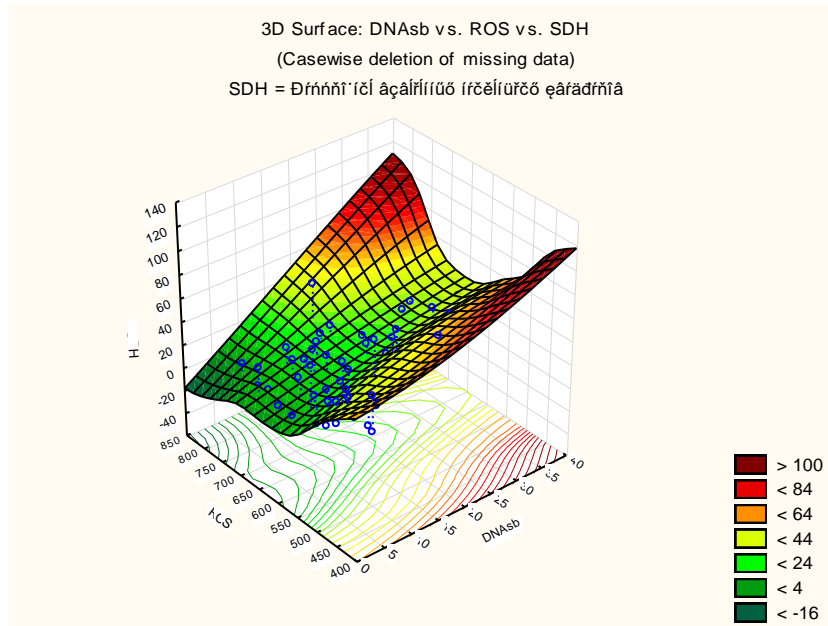


Рис.5.5. Взаємозв'язок рівня фрагментації ядерної ДНК з сукцинат дегідрогеназною активністю та рівнем активних форм оксигену у гепатоцитах даніо за впливу гербіцидів класів органофосфатів та триазинів.

Поряд із морфофункціональними порушеннями мітохондрій, як реакція даніо на вплив фосфорорганічних та триазинового пестицидів, у гепатоцитах даніо за впливу всіх досліджуваних чинників було відзначено ознаки пошкодження лізосом, яке проявлялося як дестабілізація лізосомальних мембран та збільшення активності катепсину D.

Лізосомальна система відіграє ключову роль у деградації та переробці пошкоджених білків (De Leonibus et al., 2019). Пошкодження або дисфункція лізосомальної системи призводить до порушення білкового гомеостазу, стресу ендоплазматичного ретикулулу та порушення аутофагії (Nakashima et al., 2019; Ren et al., 2021). Лізосомальна дисфункція зазвичай пов'язана з індукованою пестицидами цитотоксичністю у хребетних, включаючи риб (Vodnar et al., 2021; Bonomo et al., 2019) і ссавців (Venkatesan et al., 2017). Наші дослідження надають вагомі докази того, що раундап, хлорпірифос, малатіон і тербутилазин, навіть у екологічно релевантних концентраціях, викликають дестабілізацію лізосомальної мембрани (вимірюється за утриманням нейтрального червоного у лізосомах) у рибок даніо. Дестабілізація лізосом може пояснити підвищення активності ключової кислоти лізосомальної протеази катепсину D у всіх групах, які зазнали впливу пестицидів (крім RL та малатіону). Проте вплив досліджуваних пестицидів на стабільність лізосомальної мембрани не залежав від концентрації та був подібним за величиною між групами, які зазнали впливу окремих забруднювачів та їх сумішей, що очевидно вказує на те, що пошкодження лізосом не є основним фактором стресу, спричиненого пестицидами у рибок даніо.

Як було показано, хлорпірифос та тербутилазин з-поміж досліджуваних пестицидів проявили найбільш високу здатність до стимуляції катепсину D у лізосомах гепатоцитів даніо, що може вказувати на активацію процесів аутофагії в тканині печінки даніо за впливу даних пестицидів. Катепсин D, аспарагінова протеаза, яка в основному виробляється як пропептид у зернистому ендоплазматичному ретикулулі, і далі активується шляхом

протеолітичного розщеплення після досягнення цільового локалю (фагосоми, ендосоми та лізосоми) (Kausar et al., 2017; Sales et al., 2019). Катепсин D є незамінним білком, який бере участь у різних фізіологічних процесах, включаючи лізосомальний процес аутофагії, модуляцію апоптозу, активацію поліпептидних гормонів тощо (DeLuca et al., 2009). У риб катепсин D може залучатися до захисту хазяїна від мікробних патогенів. Зокрема, підвищення рівня експресії катепсину D після мікробної інфекції було відзначено в різних тканинах сома *Ictalurus punctatus*, амура *Stenopharyngodon idella*, *Cynoglossus semilaevis* та *Haemaphysalis longicornis* (Dong et al., 2012; Feng et al., 2011). Позаяк у нашому випадку простежувалася позитивна кореляція між активністю катепсину D та рівнем імуноглобуліну M (Рис. 5.6), можна припустити його залучення окрім аутофагічних процесів, до регуляції імунної відповіді у корошових риб. На користь цього свідчить здатність хлорпиріфосу виступати в ролі імунодизраптора (Thrasher et al., 1993).

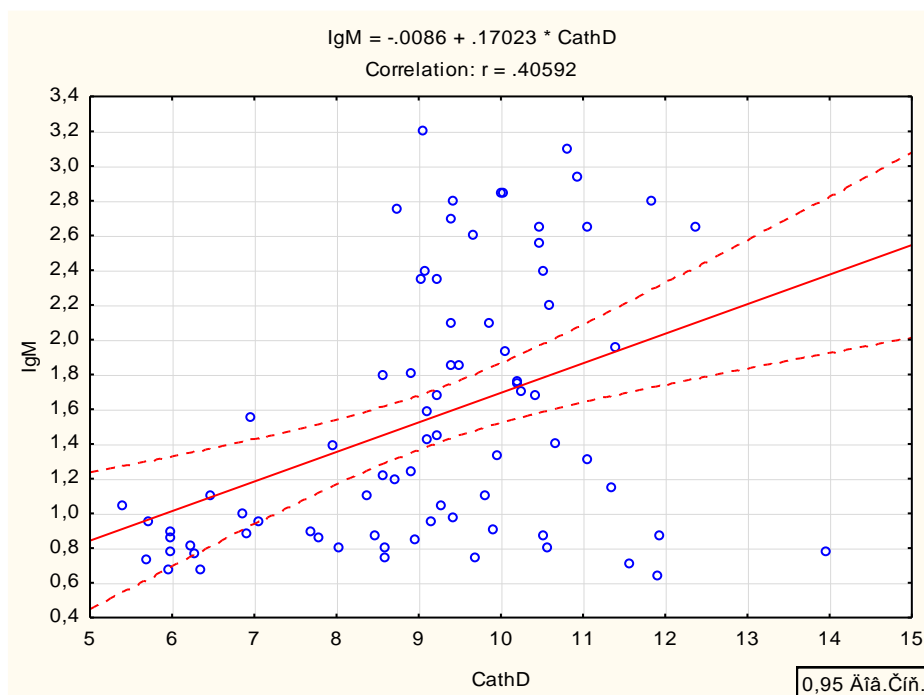


Рис. 5.6. Кореляційна залежність змін активності катепсину D та рівня імуноглобуліну IgM у тканинах даніо за впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів.

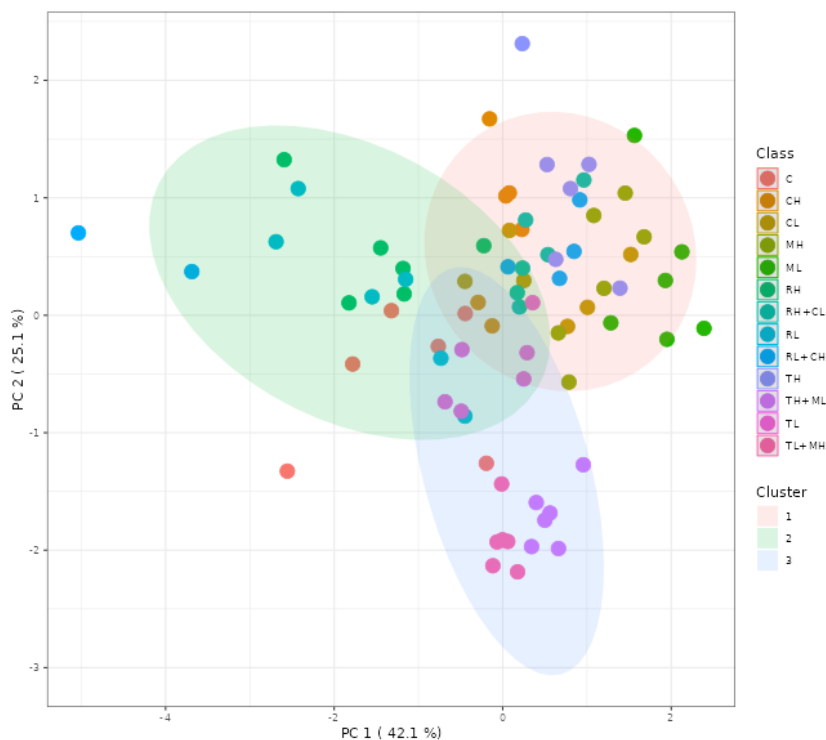
Щодо тербутилазину такі дані в літературі відсутні. Встановлена залежність створює підґрунтя до подальших механістичних досліджень, які станом на сьогодні в даній галузі практично відсутні.

Аутофагія – це катаболічний процес, який уможливорює розщеплення цитозольних компонентів на основні біомолекулярні складові шляхом лізосомальної деградації, з метою їх подальшої переробки та подальшого використання. Це важливий процес, необхідний для підтримки клітинного гомеостазу (Moss et al., 2000). З одного боку, аутофагічний «кліренс» пошкоджених біомолекул та органел може сприяти виживанню та адаптації особи до нового середовища, таким чином створюючи можливий механізм, за допомогою якого аутофагія може захистити від розвитку патологічних станів, а то й навіть загибелі внаслідок пошкоджуючого впливу ксенобіотиків. Крім того, аутофагія може запобігти некрозу шляхом катаболічної генерації енергії (Ren et al., 2021). З іншого боку, високий рівень «аутофагічного стресу» може призвести до масової активації лізосом, що призводить до незворотних цито- та гістологічних змін, які в кінцевому етапі викликають масову загибель клітин, а відтак і організму. Позаяк активація катепсину у нашому випадку була помірною, не більше 40% порівняно з контролем, то можемо припустити, що феномен активації аутофагічних процесів був спрямований на підтримання гомеостазу, особливо ефективно у випадку тербутилазину, відповідно до загального нижчого рівня ушкоджень організму.

На прикладі клітинних ліній людини було встановлено, що лактат та лактатдегідрогеназа LDHB належить до ключових факторів лізосомальної активності та аутофагії (Moreno et al., 2020). LDHB каталізує перетворення лактату та NAD^+ на піруват, NADH та H^+ . Ця реакція сприяє ацидифікації лізосом залежно від V-АТФази, протонної помпи лізосом. Під час аутофагічного процесу утворюється аутофагосома, що ізолює цільовий або неспецифічний матеріал. Потім цей вміст піддається ферментативному розкладанню після злиття аутофагосоми з лізосомами, які забезпечують

протони та активовані в кислому середовищі протеази до утвореної таким чином аутолізосоми (Levine and Kroemer, 2008). Ацидифікація лізосом необхідна для дозрівання везикул і активації протеаз під час аутофагії. В нашому випадку ми не знайшли зв'язку між активністю лактатдегідрогенази та катепсину Д, що може, однак, бути обумовлено локалізацією визначуваної нами ЛДГ в крові та вимагає більш детального аналізу, зокрема визначення концентрації лактату, ЛДГ активності гепатоцитів, співвідношення $NAD^+/NADH$ та активності кислих фосфатаз, для з'ясування механізмів залучення ЛДГ до регуляції аутофагії у корошових риб за впливу пестицидів.

Проведено аналіз показників, приналежних до відповіді мітохондрій та лізосом данію за впливу всіх досліджуваних пестицидів методом К-кластерингу та рендом форест аналізу. Результати надали переконливі докази того, що досліджувані пестициди викликають подібні прояви ушкодження мітохондрій та лізосом: групи лежать в одній площині К-кластерингу, без чітких меж розподілу (Рис. 5.7А), а середнє значення помилки класифікації в рендом форест аналізі становить 0,372. Лише група контролю відділяється від інших без помилок класифікації.



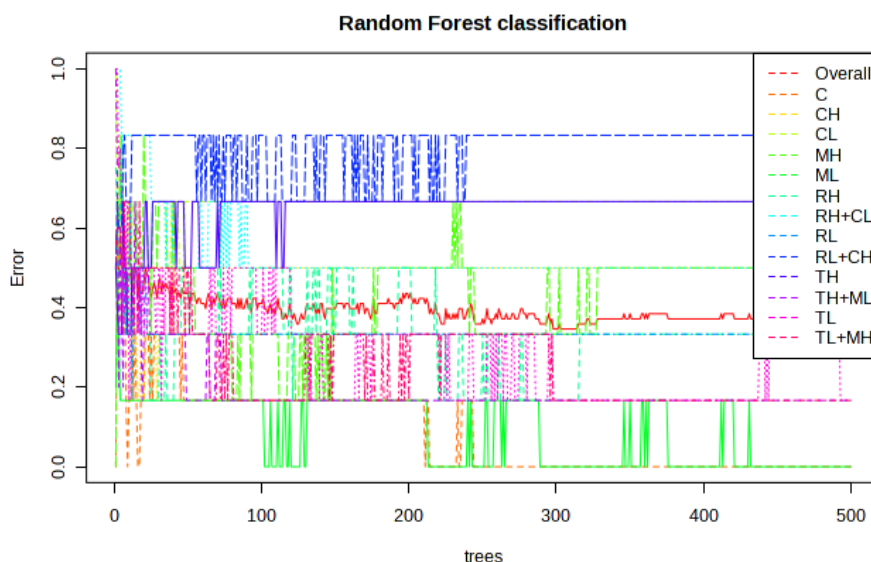


Рис. 5.7. К-кластеринг (А) та класифікація груп за допомогою рендом форест алгоритму (Б) показників ушкоджень мітохондрій та лізосом печінки смугастого данію за впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів.

Визначення індексу сумарної відповіді IBR (Calibri) показало найбільш консолідовану відповідь за впливу раундапу з подальшим її зменшенням у ряді > хлорпірифос ~раундап+хлорпірифос > малатіон ~ тербутилазин ~ малатіон+тербутилазин (Рис. 5.8). Разом з тим, за аналізом окремих показників у взаємозв'язку з проявами цитотоксичності, найвищий рівень ушкодження клітинних структур проявляється за впливу хлорпірифосу.

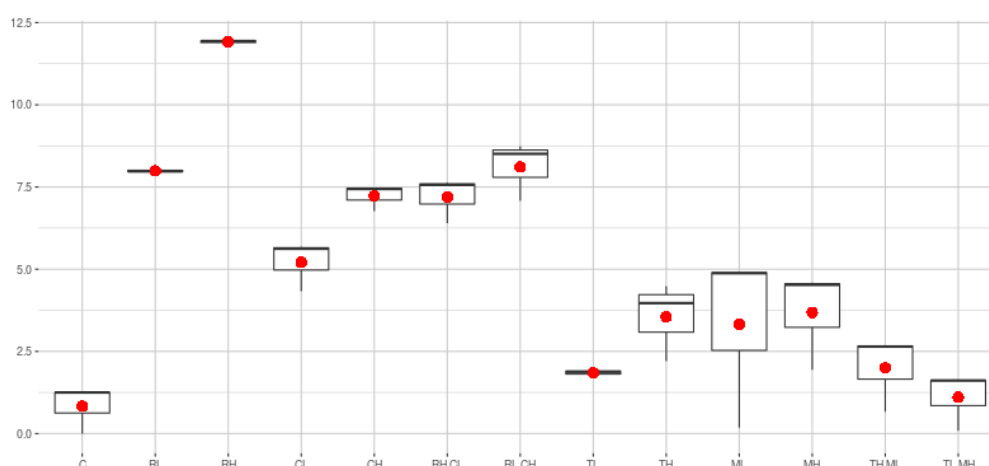


Рис.5.8. Інтегральний індекс IBR (Calibri) сумарної відповіді показників ушкоджень мітохондрій та лізосом печінки смугастого данію за впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів.

Відтак, фосфорорганічні та триазиновий пестициди викликають у данію ознаки морфо-функціональних порушень мітохондрій та лізосом, як універсальну відповідь, незалежну від природи діючого чинника, пов'язаних із порушеннями проникності мембран, розладами ланцюга транспорту електронів, розвитком псевдо-гіпоксичного стану та надмірною генерацією активних форм кисню, які в свою чергу на вищих рівнях біологічної організації можуть проявлятися як метаболічні та імунні розлади. За ознаками морфо-функціональних порушень мітохондрій та лізосом найбільш істотних ушкоджень зазнала група данію за впливу хлорпірифосу.

5.3. Прояви цито- та генотоксичності данію за впливу гербіцидів та інсектицидів класу органофосфатів та триазинів

Фосфорорганічні пестициди викликають токсичність, пригнічуючи активність ацетилхолінестерази в мозку як у хребетних, так і в безхребетних організмів. Ці ферменти відповідають за видалення нейромедіатора ацетилхоліну (ACh) з синаптичних щілин шляхом гідролізу (Fulton and Key, 2001). У хребетних ацетилхолін діє як медіатор збудження для м'язів у соматичній нервовій системі. Ацетилхолін також служить як прегангліонарним, так і постгангліонарним трансмітером у парасимпатичній нервовій системі та як прегангліонарний передавач у симпатичній нервовій системі. Коли холінестераза інактивується шляхом зв'язування з органофосфатами, відбувається накопичення ацетилхоліну в нервовому синапсі, що перешкоджає нормальному функціонуванню нервової системи, у гострих випадках спричинаючи параліч. Пригнічення холінестеразної активності та накопичення ацетилхоліну може сприяти порушенням енергетичного обміну і послаблювати загальну стресостійкість (Bretaud et al., 2000; Vui-Nguyen et al. , 2015). Цікаво, що низькі концентрації раундапу (15 мкг/л) стимулювали, а не знижували активність AChE в мозку рибок данію, що

узгоджується з раніше обговорюваними гормезисно-подібними ефектами раундапа у рибок даніо.

Хлорпірифос та малатіон, незалежно від досліджуваної концентрації, викликали у мозку рибок даніо пригнічення ацетилхолінестеразної активності, що вказує на їх високу нейротоксичність, навіть в екологічно реальних концентраціях. Щодо раундапу та тербутилазину, то зміни активності ферменту були непослідовними. У випадку хлорпірифосу та малатіону (органофосфати для яких ацетилхолінестераза є мішенню впливу) (Ubaid and Rahman et al., 2021), таке пригнічення було очікуваним. Однак активний інгредієнт раундапу, гліфосат, має інший механізм дії та вважається специфічним інгібітором шляху синтезу ароматичних амінокислот у рослинах шикімової кислоти (Kanissery et al., 2019), а тербутилазин належить до хлоротриазинів, мішенню якого є транспорт електронів у рецепторі фотосистеми II. Спостережуване інгібування АСhЕ високими концентраціями (500 мкг/л) раундапу та низькими концентраціями тербутилазину в мозку рибки даніо вказує на те, що гліфосат та тербутилазин можуть мати неспецифічні нейротоксичні ефекти.

Існуючі результати показують, що органофосфати та триазинові пестициди, зокрема атразин, належать до ендокрин-дизрапторів та можуть впливати на рівні кортикостероїдів або гормональний статус щитоподібної залози у риб (Khatib et al., 2022). Результати наших досліджень, однак, не виявили у даніо значних змін ні в рівні тиреотропіну у крові, ні кортизолу. Позаяк кортизол залучається в глюконеогенез, підтримання його стабільного рівня може свідчити про відсутність істотних порушень вуглеводного обміну. З іншого боку, кортизол залежить від адренкортикотропного гормону, який, у свою чергу, може стимулюватися ацетилхоліном (Güven et al., 1999). Саме вплив фосфорорганічних сполук часто пов'язують із підвищенням рівня ацетилхоліну (Trang and Khandhar, 2022). Таким чином, відсутність змін кортизолу може опосередковано вказувати на відсутність змін у холінергічній

системі, не зважаючи на те, що нами було виявлено пригнічення ацетилхолінестерази практично у всіх досліджуваних групах, за окремими винятками.

Вважають, що гострі зміни у гіпоталамо-гіпофізарній системі, пов'язані зі стресом, можуть призводити до системних порушень пов'язаних із щитоподібною залозою, відомими як «синдром порушення функції щитоподібної залози», що в основному проявляється як зниження рівня трийодотироніну. Зміни такого характеру мають здатність швидко прогресувати та часто пов'язані з поганим прогнозом у вищих хребетних, включаючи людину (Želježić et al., 2018). Враховуючи вищезазначене, можна припустити, що вплив низьких, екологічно реалістичних концентрацій досліджуваних фосфорорганічних та триазинового пестицидів поокремо та в суміші був недостатнім, щоб викликати значні зміни в осі гіпоталамус-гіпофіз-щитоподібна залоза у данію та спричинити гострі системні порушення.

Подібне стосується і кортизолу. Відмінності досліджуваних груп від значень контролю не перевищували 10%. Разом з тим, з літератури відомо, що вплив 16,6% LC₅₀ метил-паратіону та тербуконазолу протягом 45 – 180 діб викликає істотне зменшення рівня кортизолу у риби *Rhamdia quelen* (Koakoski et al., 2014). Причому, пригнічення кортизолу пов'язують із пригніченням експресії стероїдогенного гострого регуляторного протеїну *StAR* та *hsp70*. Також, зменшення кортизолу спостерігали у данію за впливу монокротофосу у концентрації 100 мкг/л, однак лише у жіночих особин, тоді як у чоловічих особин не було відзначено ніяких змін (Zhang et al., 2015). Необхідно, однак, відзначити, що пригнічення кортизолу у риб відзначали за умов гостротоксичних концентрацій, тоді як ми використовували екологічно реальні, що підтверджує припущення щодо підпорогового рівня пестицидів для реакції з боку гіпоталамо-інтерреналової системи.

Часто повідомляють, що пестициди викликають ендокринну токсичність у хребетних (Mnif et al., 2011; Kar et al., 2021), пов'язану із

гіпоталамо-адrenalовою системою. Всі досліджувані пестициди та їх суміші призвели до сильного зниження рівнів мРНК вітелогеніну, що свідчить про те, що ці пестициди діють як ксеноандрогеми у самців рибок даніо. На відміну від цих висновків, у морських риб не було виявлено жодного впливу екологічно значущих концентрацій раундапу на експресію вітелогеніну (Le Mer et al., 2013). Відтак, докази андрогенності пестицидів та їх сумішей потребують подальшого дослідження.

Наші дані надають переконливі докази гепатотоксичності досліджуваних пестицидів та їх сумішей, про що свідчить збільшення рівня ЛДГ у сироватці крові риб. Цікаво, що вплив пестицидних сумішей не посилив гепатотоксичність порівняно з відповідними концентраціями окремих забруднюючих речовин у риби даніо. В літературі відсутні уніфіковані дані щодо змін рівня сироваткової ЛДГ за впливу пестицидів на риб. З одного боку, повідомляється про істоте збільшення рівня ЛДГ у сироватці крові коропа за впливу купрум сульфату, параквату та метадіону (Asztalos and Nemcsók, 1985), а також у печінці *Oreochromis mossambicus* за впливу ацетаміприду, тоді як з іншого – її зменшення, зокрема за впливу монокротофосу (0,96 та 1,86 мг/л) у риби *Channa punctatus* (Agrahari et al., 2007). Окрім того, що ЛДГ є маркером цитолізу, збільшення ЛДГ вказує на активацію гліколізу, як основного джерела енергії в умовах стресу, у тому числі й гіпоксичного (Shi et al., 2009). Це узгоджується із змінами утворення активних форм кисню (Рис. 5.9) та розвитком «псевдо-гіпоксичного» стану, незалежно від класу діючого пестициду. Залучення ЛДГ до ініціації вироблення активних форм кисню продемонстрована на прикладі ракових клітинних ліній людини та ссавців (Wu et al., 2021). Було, зокрема, доведено, що ЛДГ у кролика може каталізувати одноелектронне відновлення НАДН з утворенням H_2O_2 , де супероксид є ініціатором реакції. Також, було доведено, що молекулярний кисень, H_2O_2 , пероксинітрит, супероксид – усі вони можуть ініціювати цей ланцюг вільнорадикальних реакцій на комплексі ЛДГ-НАДН кролика, але лише

супероксид може посилити реакції з подальшим утворенням пероксид гідрогену. Необхідно, однак, відзначити що наведені дані, в основному, стосуються умов *in vitro*, тоді як дані за умов *in vivo* значно обмежені, а для нижчих хребетних – практично відсутні. Отримані нами дані вносять вагомий вклад у механістичне розуміння залучення ЛДГ в процес утворення активних форм кисню та прогресування патологічних змін у корошових риб та потребує подальшого детального аналізу.

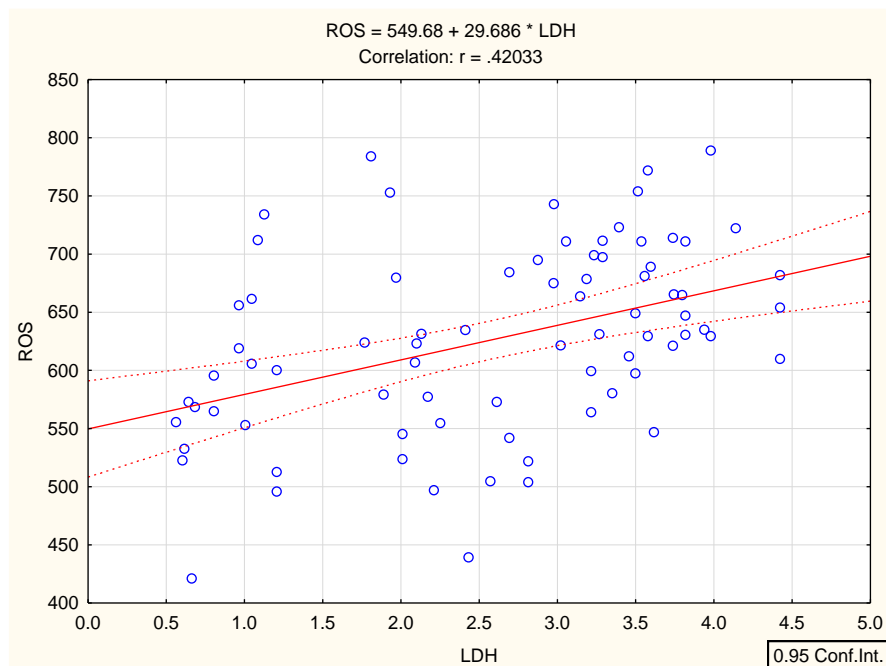


Рис. 5.9. Кореляційна залежність змін рівня утворення активних форм кисню та лактатдегідрогенази у тканинах даніо за впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів.

У риб вроджений імунітет та клітини адаптивного імунітету, такі як лейкоцити та Т-кілери, відіграють важливу роль в імунологічній відповіді на вплив стресорних чинників. IgM є найдавнішим з імуноглобулінів хребетних і найбільш поширеним імуноглобуліном у плазмі риб (Mashoof and Criscitiello, 2016). IgM сприяє як вродженому, так і адаптивному імунітету та опосередковує аглютинацію, видалення патогенів, а також взаємодію з власними антигенами, що беруть участь у кліренсі апоптичних клітин (Ehrenstein and Notley, 2010). Зокрема, було показано, що гостра експозиція

коропових риб і цихлід у присутності фосфорорганічних пестицидів призводила до зниження кількості IgM, фагоцитарної активності, але посилювала експресію IL-6, IL-8 і TNF- α (Díaz-Resendiz et al., 2015; Girón-Pérez et al., 2007; Li et al., 2013). Тим часом дані щодо дії триазинових гербіцидів обмежені й описують переважно морфологічні та функціональні зміни в імунокомпетентних клітинах (Díaz-Resendiz et al., 2015). Згідно з нашим дослідженням, лише тербутилазин не викликав змін з боку імунної системи данію, тоді як фосфорорганічні пестициди призводили до збільшення рівня IgM з інтенсивністю дії, яка зменшувалася в ряду хлорпірифос > малатіон > раундап.

Хоча імунна відповідь риби змінюється залежно від пестициду, часу впливу та концентрації, найбільш послідовною реакцією рівнів IgM на органофосфатні пестициди є пригнічення, особливо під час гострого впливу, як показано на звичайному коропі *C. carpio*, нільській тилляпії *O. niloticus* і рідкісних китайських миноу (Li et al., 2013; Zhang et al., 2019; Díaz-Resendiz and Girón-Pérez, 2014). Зі збільшенням рівня малатіону та раундапу в навколишньому середовищі зростає його потенціал пригнічувати вроджений імунітет у рибок данію, про що свідчать значно нижчі рівні IgM у групі MH/RH порівняно з групою ML/RL, а також пригнічення гуморальної імунної відповіді після гострого впливу малатіону на риб (Plumb and Areechon, 1990). Все це може послабити здатність риб протистояти вірусним і бактеріальним захворюванням. Хлорпірифос, в свою чергу, із збільшенням діючої концентрації проявляє імуностимулюючу дію, яка, однак, в сукупності з істотними окисними ушкодженнями та проявами цитотоксичності, може демонструвати пік мобілізації імунної системи, після чого очікуваним є зрив адаптивних можливостей та системні ушкодження, що можуть призвести навіть до загибелі особин. З іншого боку, тербутилазин, як видається, є імуноіндиферентним для риб у реальних концентраціях навколишнього

середовища, оскільки він не впливає на синтез імуноглобуліну, хоча гострий вплив може призвести до шкідливих наслідків (Dezfuli et al., 2006).

Відтак, інтегральний аналіз даних продемонстрував, що раундап в екологічно реальній концентрації у даніо викликає гормезисну відповідь, спрямовану на активацію захисних сил організму, знешкодження активних форм радикалів, видалення продуктів окисного ушкодження та активацію детоксикаційних процесів. Саме ця група за набором всіх визначуваних показників утворювала спільний кластер з групою інтактних тварин (Рис. 5.10) з 100% точністю класифікації.

Наступна група об'єднує тварин за сумісного впливу тербутилазину та малатіону, які в площині дискримінантного аналізу та теплової матриці відділялися від інших експериментальних груп згідно високого рівня експресії RAD51 та Vtg а також метилгліоксалу і карбонільних похідних протеїнів. Сепаратна локалізація досліджуваних груп від індивідуально-експонованих в присутності ідентичних пестицидів вказує на антагоністичний характер взаємодії між ними, яка однак, призвела до ап-регуляції RAD51, відповідального за репарацію ушкоджених ділянок ДНК та вітелогеніну Vtg. Власне TL+MH це була єдина комбінація досліджуваних пестицидів, яка зумовила «класичну» ксеноестрогенну реакцію даніо – активацію вітелогенезу у самців смугастика, що вимагає детального подальшого вивчення. На даний час механізми цього явища відсутні, а інформація щодо вітелогенезу риб за впливу малатіону та тербутилазину дуже обмежена (за даними PubMed).

Особливою видається і реакція TH+ML групи, в якій особливо істотно з-поміж інших розвинувся карбонільний стрес узгоджено із збільшенням рівня активних форм кисню. З погляду на те, що тербутилазин використовується як замітник атразину, гербіциду забороненого у ЄС з погляду на високу ендокринну активність, та обмеження інформації щодо його впливу для нецільових організмів, дані результати дають поштовх та створюють надійне підґрунтя до подальших механістичних досліджень.

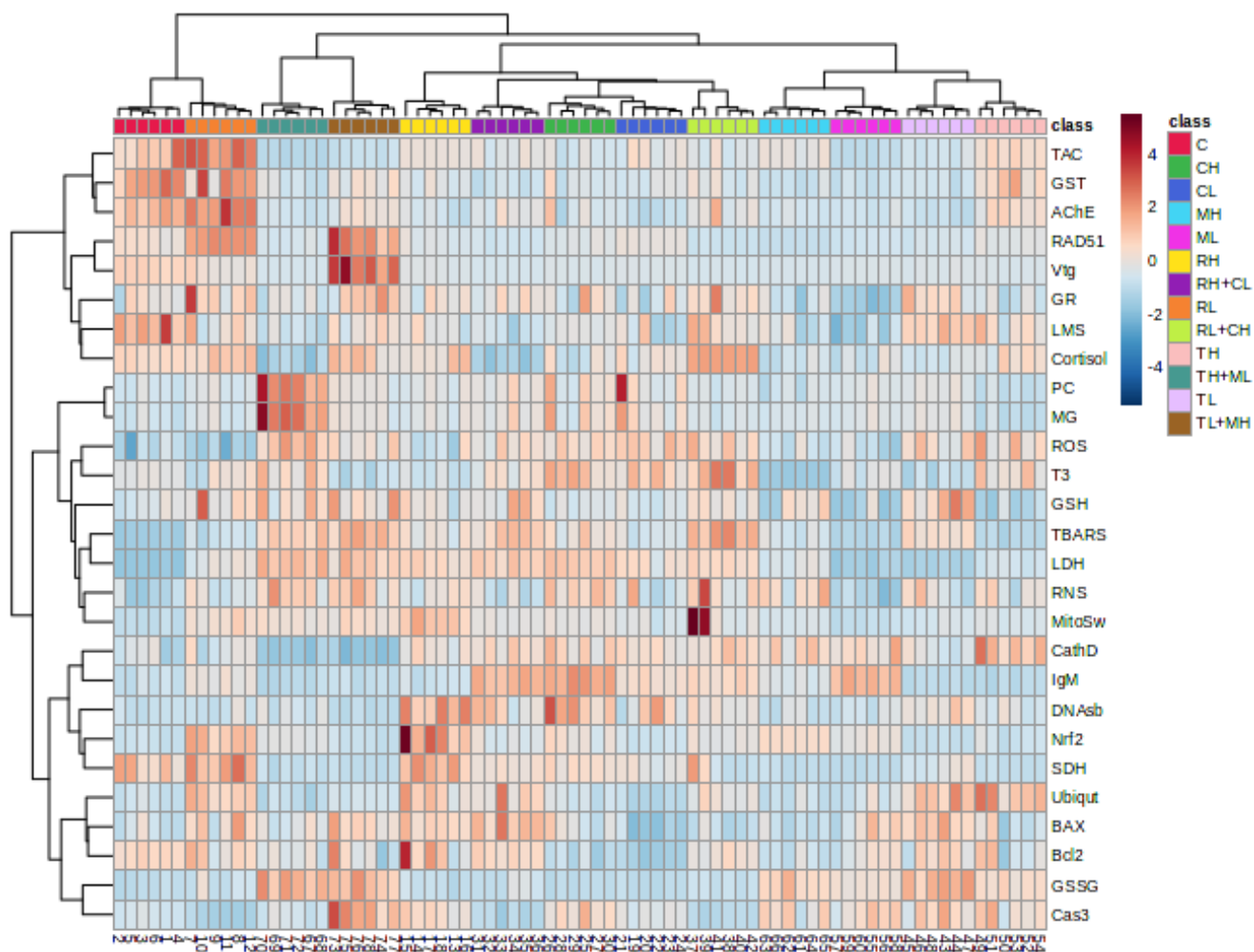


Рис. 10. Теплова карта (Heat map) реакцій коропової рибки смугастого даніо до впливу фосфорорганічних та триазинового пестицидів в екологічно реальних концентраціях.

Найбільш численний кластер, який утворює дві гілки, об'єднує 9 груп. З одного боку спільні риси відповіді об'єднали раундап та хлорпірифос, а з іншого – тербутилазин і малатіон. Група раундап-хлорпірифос, в основному, характеризувалася активацією окисного стресу та змінами показників мітохондрій, тоді як група тербутилазин-малатіон – активацією апоптозу/аутофагії та порушеннями стабільності лізосомальних мембран. Необхідно відзначити, що за сумою всіх даних рівень токсичності зменшується у ряді ЧЧ.

Проведені нами дослідження дозволили визначити мінімальний набір біомаркерів, які з високим рівнем вірогідності (помилка класифікації згідно рендом форест аналізу становить 0,062) дозволяють визначити природу діючого чинника та ступінь ураження організму. До мінімального набору ввійшли показники імунної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін Vtg), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (LDH). Для більш детального аналізу цінним є визначення показників окисного стресу (ТБК-АП, Nrf2, загальної антиоксидантної здатності, GSSG), стрес-гормону кортизолу та ключового ензиму апоптозу Cas3.

Відтак, проведені нами дослідження з використанням моделі рибок даніо, надають переконливі докази оксидативного стресу, як важливого токсичного механізму та клітинної відповіді за впливу раундапу (гліфосат), хлорпірифосу та їх сумішей в екологічно реальних концентраціях (Рис. 5.11).

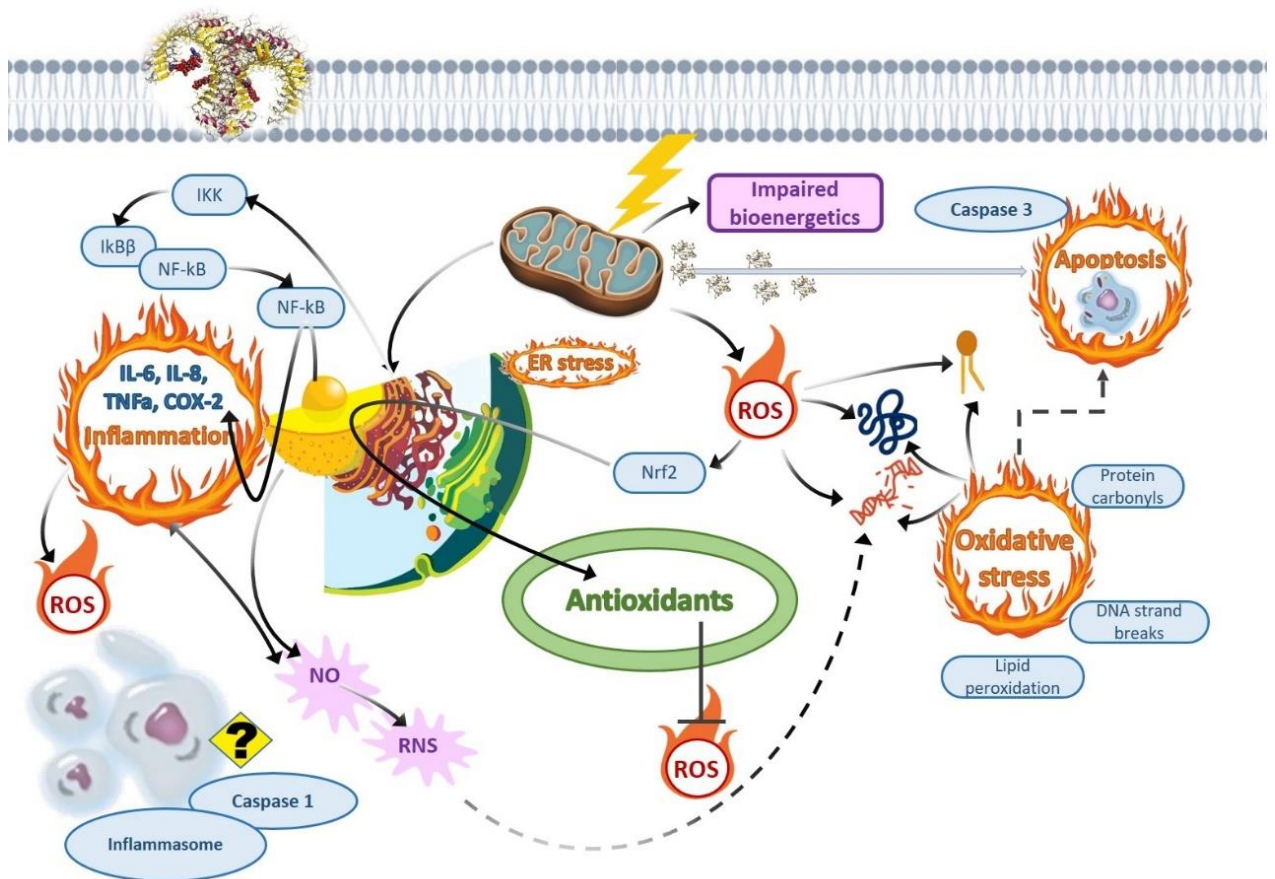


Рис. 5.11. Карта фізіолого-біохімічних реакцій даніо на дію фосфорорганічних пестицидів та триазинів.

Досліджувані пестициди та їх суміші викликали у даніо пригнічення антиоксидантів, надлишкове вироблення активних форм кисню, накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів і підвищений рівень фрагментації ДНК (Рис. 5.11). Хлорпірифос був значно токсичнішим, ніж раундап, і додатково викликав нітрозативний і карбонільний стрес. У групах тербутилазину і малатіону ознаки окисного стресу поєднуються із порівняно більш інтенсивними процесами апоптозу та аутофагії, що забезпечує в експонованих тварин більш ефективне виведення продуктів окисного ушкодження, зокрема фрагментованих молекул ДНК. Прояви окисного стресу, особливо істотні за впливу хлорпірифосу та тербутилазину, на рівні організму зумовлюють розвиток ознак гепато- та нейротоксичності.

За сумою ознак, раундап продемонстрував стимуляцію клітинних захисних механізмів під час впливу низьких концентрацій, яка, однак, була нівельована за комбінованого впливу пестицидів, в присутності хлорпірифосу, що означає, що індукований раундапом гормезис малоймовірний під час типового впливу агрохімічних сумішей на навколишнє середовище.

Досліджувані нами пестициди проявляли помірні ознаки ендокрин-дизруптивної дії. Найбільш істотними докази ендокринних порушень, спричинених пестицидами, були за сумісного впливу тербутилазину і малатіону, однак обмежувалися вітелогенезом та віссю НРА, з незначним впливом або його відсутністю на осі НРІ або НРТ. Зважаючи на приналежність тербутилазину до класу хлоротриазинів, до яких належить атразин, відомий ендокрин-дизраптор, відсутність істотних розладів гормонального дзеркала вказує на переваги його використання, як замісника атразину.

Пошкодження мітохондрій та лізосом можна віднести до неспецифічних ознак впливу досліджуваних фосфорорганічних пестицидів та тербутилазину, які, в свою чергу, створюють передумови до метаболічних розділів та енергодефіциту. Зважаючи на те, що мобілізація захисних механізмів в умовах стресу є енергоємним процесом, енергодефіцит може

бути лімітуючим чинником виживання особин в умовах зростаючого антропогенного пресу.

Комбіновані ефекти досліджуваних пестицидів для смугастого даніо мали характер антагонізму. Логічно припустити, що в таких випадках ефекти поокремих пестицидів, які входять до складу сумішей, можна спрогнозувати на основі окремих ефектів більш токсичного пестициду. Для хлорпірифосу це відповідає дійсності, однак у випадку тербутилазину та його поєднання з малатіоном призводить до виникнення ознак, які не були характерні для індивідуальної їх дії. Кілька нещодавніх звітів показали адитивні або синергетичні ефекти сумішей пестицидів, включаючи суміші фосфорорганічних кислот/карбаматів і фосфорорганічних кислот/купрум сульфату (Heys et al., 2016; Laetz et al., 2009; Weeks Santos et al., 2021), що означає, що антагоністичні взаємодії не можна поширювати на всі пестициди та, з іншого боку, передбачати очікувані ефекти суміші за більш токсичним компонентом. Навіть якщо моніторинг більш токсичних пестицидів (таких як хлорпірифос) може бути виправданим, коли ресурси обмежені, майбутні оцінки токсичності пестицидних сумішей на основі біологічного аналізу необхідні для покращення оцінки ризику для навколишнього середовища та здоров'я, зосереджуючись на найбільш релевантних біомаркерах, такі як окислювальний стрес, гепато- та нейротоксичність.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено дані щодо впливу фосфорорганічних пестицидів (раундап, хлорпірифос, малатіон) та триазинів (тербутилазин) на функціональний стан ключових параметрів окисного стресу, біотрансформації ксенобіотиків, нейро-ендокринної та імунної систем, а також морфофункціональні характеристики мітохондрій та лізосом коропової риби даніо та встановлено що у *D. rerio* окисний і карбонільний стрес, поряд із розладами ендокринної та імунної систем, є важливими механізмами токсичності фосфорорганічних пестицидів та триазинів.

- 1) Досліджувані пестициди окремо та в суміші спричиняли виснаження загальної антиоксидантної здатності та пулу клітинних тіолів, що узгоджувалося із надлишковим утворенням активних форм кисню, накопиченням продуктів окисної деструкції ліпідів та протеїнів і підвищеним рівнем фрагментації ДНК. Лише низька концентрація раундапу (діюча речовина гліфосат), яка знаходиться в межах рівня гліфосату у природних водоймах, викликала гормезис-подібний ефект, стимулюючи у печінці смугатого даніо захисні клітинні механізми.
- 2) Хлорпірифос виявляв сильнішу прооксидантну дію, ніж раундап, і додатково викликав у смугатого даніо нітрозативний і карбонільний стрес. На організмовому рівні досліджувані пестициди та їхні суміші індукували гепато- та нейротоксичність.
- 3) Досліджувані пестициди за умов індивідуального впливу не спричиняли змін гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдній осі у *D. rerio*. Тербутилазин, однак, як індивідуально так і в за умов співдії призводив до посилення вітелогенезу у самців риб (до 300-600 %).
- 4) Досліджувані пестициди у ряді хлорпірифос > раундап > малатіон > тербутилазин з діапазоном варіабельності до 470 % викликали морфофункціональні порушення у мітохондріях та лізосомах коропової риби даніо, узгоджено із інтенсифікацією апоптозу та аутофагії.

- 5) Співдія пестицидів хлорпірифос / раундап та тербутилазин / малатіон носить характер антагонізму з мінімальним ефектом взаємного впливу компонентів. Токсичний вплив суміші хлорпірифос / раундап був переважно зумовлений хлорпірифосом. Поєднання тербутилазину з малатіоном призводить до виникнення ознак, які не були характерні для індивідуальної їх дії.
- 6) Раундап та малатіон в екологічно релевантних концентраціях та хлорпірифос у концентраційно-залежному аспекті активують вроджений та адаптивний імунітет смугастого данію (до 200%). Тербутилазин, особливо у високій концентрації, проявляє супресивну дію та нівелює активаторну дію малатіону за сумісного впливу.
- 7) Хлорпірифос > раундап > тербутилазин > малатіон проявляють генотоксичну та цитотоксичну дії залежно від концентрації.
- 8) За допомогою методів машинного навчання встановлено мінімальний набір біомаркерів, які з високим рівнем вірогідності (помилка класифікації згідно рендом форест аналізу становить 0,062) дозволяють визначити природу діючого пестициду та ступінь ураження організму. До мінімального набору увійшли показники імунної системи (IgM), ендокринних розладів (вітелогенін), репарації ДНК (RAD51) та цитотоксичності (лактатдегідрогеназа). Для більш детального аналізу важливим є визначення показників окисного стресу (рівень пероксидації ліпідів, Nrf2, загальної антиоксидантної здатності, окисненого глутатіону), стрес-гормону кортизолу та ключового ензиму апоптозу каспази 3.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Abass, K.; Pelkonen, O.; Rautio, A. Chloro-s-triazines-toxicokinetic, Toxicodynamic, Human Exposure, and Regulatory Considerations. *Curr. Drug Metab.* **2021**, *22* (8), 645-656. <https://doi.org/10.2174/1389200222666210701164945>.
- Abdel-Daim, M. M.; Dawood, M. A. O.; Elbadawy, M.; Aleya, L.; Alkahtani, S. Spirulina platensis Reduced Oxidative Damage Induced by Chlorpyrifos Toxicity in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals (Basel)* **2020**, *10*, 473.
- Abhijith, B. D.; Ramesh, M.; Poopal, R. K. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *J. Basic Appl. Zool.* **2016**, *77*, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.11.002>.
- Adedara, I. A.; Owoeye, O.; Awogbindin, I. O.; Ajayi, B. O.; Rocha, J. B. T.; Farombi, E. O. Diphenyl diselenide abrogates brain oxidative injury and neurobehavioural deficits associated with pesticide chlorpyrifos exposure in rats. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *296*, 105-116. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.016>.
- Aebi, H.; Wyss, S. R.; Scherz, B.; Skvaril, F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *48*, 137-145. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03751.x>.
- Agathokleous, E. European Union's imminent ban on glyphosate: Hormesis should be considered in new chemical screening and selection. *J. Res.* **2022**, *33*, 1103–1107. <https://doi.org/10.1007/s11676-022-01474-5>.
- Agrahari, S.; Pandey, K. C.; Gopal, K. Biochemical Alterations Induced by Monocrotophos in the Blood Plasma of Fish *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2007**, *88*, 268-272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.001>.

- Albuquerque, A. F.; Ribeiro, J. S.; Kummrow, F.; Nogueira, A. J. A.; Montagner, C. C.; Umbuzeiro, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2016**, *18*, 779-787.
- Ali, M. F.; Soliman, A. A.; Gewaily, M. S.; Abdel-Kader, T. Y.; Amer, A. A.; Zaineldin, A. I.; Al-Asgah, N. A.; Younis, E. M.; Abdel-Warith, A. A.; Sewilam, H.; Dawood, M. A. O. Isatis phytoenic relieved atrazine induced growth retardation, hepato-renal dysfunction, and oxidative stress in Nile tilapia. *Saudi J. Biol. Sci.* **2022**, *29*, 190-196.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.072>.
- Alu, A.; Han, X.; Ma, X.; Wu, M.; Wei, Y.; Wei, X. The role of lysosome in regulated necrosis. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10* (10), 1880-1903.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.07.003>.
- Alvarez, M.; Du Mortier, C.; Jaureguiberry, S.; Venturino, A. Joint Probabilistic Analysis of Risk for Aquatic Species and Exceedence Frequency for the Agricultural Use of Chlorpyrifos in the Pampean Region, Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* **2019**, *38*, 1748-1755.
- Amin, K. A.; Hashem, K. S. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Vet. Res.* **2012**, *8*, 45.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-45>.
- Anderson, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 548-555.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13073-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13073-9).
- Antić, N.; Radišić, M.; Radović, T.; Vasiljević, T.; Grujić, S.; Petković, A.; Dimkić, M.; Laušević, M. Pesticide Residues in the Danube River Basin in Serbia – a Survey during 2009–2011. *Clean Soil Air Water* **2015**, *43*, 197-204.
<https://doi.org/10.1002/clen.201200360>.

- Aquilano, K.; Baldelli, S.; Ciriolo, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 196. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>.
- Asztalos, B.; Nemcsók, J. Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio* L.) sera. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* **1985**, *82* (1), 217-219. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90233-6](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90233-6).
- Azevedo, R. D.; Falcão, K. V.; Assis, C. R.; Martins, R. M.; Araújo, M. C.; Yogui, G. T.; Neves, J. L.; Seabra, G. M.; Maia, M. B.; Amaral, I. P.; Leite, A. C. R.; Bezerra, R. S. Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase. *Chemosphere* **2021**, *263*, 128029. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128029>.
- Backhaus, T.; Brack, W.; Van den Brink, P. J.; Deutschmann, B.; Hollert, H.; Posthuma, L.; Segner, H.; Seiler, T.-B.; Teodorovic, I.; Focks, A. Assessing the ecological impact of chemical pollution on aquatic ecosystems requires the systematic exploration and evaluation of four lines of evidence. *Environ. Sci. Eur.* **2019**, *31*, 98.
- Bailey, H. C.; Miller, J. L.; Miller, M. J.; Wiborg, L. C.; Deanovic, L.; Shed, T. Joint acute toxicity of diazinon and chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, *16*, 2304-2308. <https://doi.org/10.1002/etc.5620161115>.
- Baillie, B. R. Herbicide concentrations in waterways following aerial application in a steepland planted forest in New Zealand. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res.* **2016**, *50*, 125-136. <https://doi.org/10.1080/00288330.2015.1112815>.
- Banks, K. E.; Hunter, D. H.; Wachal, D. J. Chlorpyrifos in Surface Waters before and after a Federally Mandated Ban. *Environ. Int.* **2005**, *31*, 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.003>.
- Barata, C.; Baird, D. J.; Nogueira, A. J.; Soares, A. M.; Riva, M. C. Toxicity of Binary Mixtures of Metals and Pyrethroid Insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for Multi-Substance Risks Assessment. *Aquatic Toxicol.* **2006**, *78*,

- 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.01.009>.
- Barrera, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol.* **2012**, 2012, 137289. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>.
- Barrett, A. J. Lysosomal Acid Proteinase of Rabbit Liver. *Biochem. J.* **1967**, 104, 601–608. <https://doi.org/10.1042/bj1040601>.
- Bergmeyer, H. U.; Bernt, E. UV-Assay with Pyruvate and NADH. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Bergmeyer, H. U., Ed.; 2nd ed.; Academic Press, 1974; pp 574–579. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50010-4>.
- Berkoz, M.; Ozkan-Yilmaz, F.; Ozluer-Hunt, A.; Gunduz, S. G.; Yıldırım, M.; Yalın, S. Influence of Sublethal Chlorpyrifos Exposure on Oxidative Stress and Acetylcholinesterase Activity in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Fresenius Environ. Bull.* **2019**, 28, 4642-4649.
- Bester, M. J.; Potgieter, H. C.; Vermaak, W. J. H. Cholate and pH Reduce Interference by Sodium Dodecyl Sulfate in the Determination of DNA with Hoechst. *Anal. Biochem.* **1994**, 223, 299-305. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1588>.
- Bhardwaj, A. K.; Chandra, R. K.; Tripathi, M. K. Analysis of Suppressive Effects of Pesticide Triazophos on Leucocyte Immune Responses in a Teleost, *Channa Punctatus*. *Drug Chem. Toxicol.* **2022**, 45, 1833-1839. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1886306>.
- Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, 5, 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- Bjørning-Poulsen, M.; Andersen, H. R.; Grandjean, P. Potential Developmental Neurotoxicity of Pesticides Used in Europe. *Environ. Health* **2008**, 7, 50. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-50>.
- Blount, J. R.; Shields, J. N.; Wu, C.-C.; Akemann, C.; Baker, B. B.; Siddiqua, Z.; Meyer, D. N.; Hijazi, N.; Tolbert, Z.; Pitts, D. K., et al. Phenotypic and Transcriptomic Effects of Developmental Exposure to Nanomolar Levels of

- Pesticides in Zebrafish. *Environ. Adv.* **2021**, *7*, 100151. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100151>.
- Bodnar, O.; Horyn, O.; Khatib, I.; Falfushynska, H. Multibiomarker Assessment in Zebrafish *Danio rerio* after the Effects of Malathion and Chlorpyrifos. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* **2021**, *13*, 165-174. <https://doi.org/10.1007/s13530-021-00099-1>.
- Bodnar, O.; Horyn, O.; Soroka, O.; Nimko, K.; Falfushynska, H. Pesticide Pollution of Aquatic Ecosystems: Environmental Risks and Mechanisms of Impact on Aquatic Organisms (a Review). *Hydrobiol. J.* **2022**, *58*, 62-78. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v58.i2.60>.
- Bojakowska, I.; Gliwicz, T. Chloroorganic Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in River Sediments in Poland. *Przegląd Geol.* **2005**, *53*, 649-655.
- Bojakowska, I.; Stasiuk, M.; Gąsior, J.; Wołkiewicz, W. Assessment of DDT, HCH and PCB Pollution of Lake Sediments in Poland. *Limnol. Rev.* **2014**, *2*, 63-74. <https://doi.org/10.2478/limre-2014-0007>.
- Bonansea, R. I.; Marino, D. J. G.; Bertrand, L.; Wunderlin, D. A.; Amé, M. V. Tissue-Specific Bioconcentration and Biotransformation of Cypermethrin and Chlorpyrifos in a Native Fish (*Jenynsia multidentata*) Exposed to These Insecticides Singly and in Mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* **2017**, *36*, 1764–1774. <https://doi.org/10.1002/etc.3613>.
- Bonomini, S.; Dottori, L.; Amoroso, A.; Arduini, A.; Sirolli, V. Increased Platelet Phosphatidylserine Exposure and Caspase Activation in Chronic Uremia. *J. Thromb. Haemost.* **2004**, *2*(8), 1275–1281. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00837.x>.
- Bonomo, M. M.; Fernandes, J. B.; Carlos, R. M.; Fernandes, M. N. Mitochondrial and Lysosomal Dysfunction Induced by the Novel Metal-Insecticide [Mg(hesp)2(phen)] in the Zebrafish (*Danio rerio*) Hepatocyte Cell Line (ZF-L). *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *307*, 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.002>.

- Borgwardt, F.; Robinson, L.; Trauner, D.; Teixeira, H.; Nogueira, A. J. A.; Lillebø, A. I.; Piet, G.; Kuemmerlen, M.; O'Higgins, T.; McDonald, H. Exploring Variability in Environmental Impact Risk from Human Activities across Aquatic Ecosystems. *Sci. Total Environ.* **2019**, *652*, 1396-1408.
- Bortoluzzi, E.; Rs, F.; Danilo, B.; dos Santos, D.; Goncalves, C.; Pellegrini, J.; Maroneze, A.; Kurz, M.; Bacar, N.; Zanella, R. Investigation of the Occurrence of Pesticide Residues in Rural Wells and Surface Water Following Application to Tobacco. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1872-1876.
- Botthof, J. G.; Bielczyk-Maczyńska, E.; Ferreira, L.; Cvejic, A. Loss of the Homologous Recombination Gene *rad51* Leads to Fanconi Anemia-like Symptoms in Zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*(22), E4452-E4461. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620631114>.
- Bretau, S.; Toutant, J. P.; Saglio, P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, *47*, 117-124.
- Bui-Nguyen, T. M.; Baer, C. E.; Lewis, J. A.; Yang, D.; Lein, P. J.; Jackson, D. A. Dichlorvos Exposure Results in Large Scale Disruption of Energy Metabolism in the Liver of the Zebrafish, *Danio rerio*. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 853. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1941-2>.
- Camacho-Pérez, M. R.; Covantes-Rosales, C. E.; Toledo-Ibarra, G. A.; Mercado-Salgado, U.; Ponce-Regalado, M. D.; Díaz-Resendiz, K. J. G.; Girón-Pérez, M. I. Organophosphorus Pesticides as Modulating Substances of Inflammation through the Cholinergic Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4523. <https://doi.org/10.3390/ijms23094523>.
- Carles, L.; Gardon, H.; Joseph, L.; Sanchís, J.; Farré, M.; Artigas, J. Meta-analysis of Glyphosate Contamination in Surface Waters and Dissipation by Biofilms. *Environ. Int.* **2019**, *124*, 284-293. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.064>.
- Ccancapa, A.; Masiá, A.; Navarro-Ortega, A.; Picó, Y.; Barceló, D. Pesticides in the Ebro River Basin: Occurrence and Risk Assessment. *Environ. Pollut.* **2016**,

211, 414-424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>.

Chen, D.; Zhang, Z.; Yao, H.; Cao, Y.; Xing, H.; Xu, S. Pro- and Anti-inflammatory Cytokine Expression in Immune Organs of the Common Carp Exposed to Atrazine and Chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2014**, *114*, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.07.011>.

Chen, L.; Cai, X.; Cao, M.; Liu, H.; Liang, Y.; Hu, L.; Yin, Y.; Li, Y.; Shi, J. Long-term Investigation of Heavy Metal Variations in Mollusks along the Chinese Bohai Sea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2022**, *236*, 113443. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113443>.

Chen, Z.; Yin, D.; Hu, S.; Hou, Y. Immunotoxicity of Pentachlorophenol on Macrophage Immunity and IgM Secretion of the Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *73*, 153-160. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0407-z>.

Chenxu, G.; Minxuan, X.; Yuting, Q.; Tingting, G.; Jing, F.; Jinxiao, L.; Sujun, W.; Yongjie, M.; Deshuai, L.; Qiang, L.; Linfeng, H.; Xuyuan, N.; Mingxing, W.; Ping, H.; Jun, T. Loss of RIP3 Initiates Annihilation of High-fat Diet Initialized Nonalcoholic Hepatosteatosis: A Mechanism Involving Toll-like Receptor 4 and Oxidative Stress. *Free. Radic. Biol. Med.* **2019**, *134*, 23-41. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.034>.

Chidya, R.; Derbalah, A.; Abdel-Dayem, S.; Kaonga, C.; Tsuji, H.; Takeda, K.; Sakugawa, H. Contamination, Dynamics, and Health Risk Assessment of Pesticides in Seawater and Marine Samples from the Seto Inland Sea, Japan. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20617-z>.

Chung, Y. L.; Hou, Y. C.; Wang, I. K.; Lu, K. C.; Yen, T. H. Organophosphate Pesticides and New-Onset Diabetes Mellitus: From Molecular Mechanisms to a Possible Therapeutic Perspective. *World J. Diabetes* **2021**, *12*(11), 1818-1831. <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i11.1818>.

Climent, M. J.; Sánchez-Martín, M. J.; Rodríguez-Cruz, M. S.; Pedreros, P.; Urrutia, R.; Herrero-Hernández, E. Determination of Pesticides in River Surface Waters

- of Central Chile Using SPE-GC-MS Multi-residue Method. *J. Chil. Chem. Soc.* **2018**, *63*, 4023-4031. <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072018000204023>.
- Corrigendum to Commission Regulation (EU) 2020/1085 of 23 July 2020 Amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as Regards Maximum Residue Levels for Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-methyl in or on Certain Products. *Official Journal of the European Union* **2020**, L 239, 24 July 2020. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32020R1085R%2801%29> (accessed 07 July 2022).
- Costa, C.; Rapisarda, V.; Catania, S.; Di Nola, C.; Ledda, C.; Fenga, C. Cytokine Patterns in Greenhouse Workers Occupationally Exposed to α -Cypermethrin: An Observational Study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *36*, 796-800. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.004>.
- Curchod, L.; Oltramare, C.; Junghans, M.; Stamm, C.; Dalvie, M. A.; Rössli, M.; Fuhrmann, S. Temporal Variation of Pesticide Mixtures in Rivers of Three Agricultural Watersheds during a Major Drought in the Western Cape, South Africa. *Water Res. X* **2019**, *6*, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2019.100039>.
- D'Costa, A. H.; Shyama, S. K.; Praveen Kumar, M. K.; Fernandes, T. M. Induction of DNA Damage in the Peripheral Blood of Zebrafish (*Danio rerio*) by an Agricultural Organophosphate Pesticide, Monocrotophos. *Int. Aquat. Res.* **2018**, *10*, 243-251. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0201-x>.
- Dalzochio, T.; Rodrigues, G. Z. P.; Petry, I. E.; Gehlen, G.; da Silva, L. B. The Use of Biomarkers to Assess the Health of Aquatic Ecosystems in Brazil: A Review. *Int. Aquat. Res.* **2016**, *8*, 283-298.
- Darvishi, M.; Safari, R.; Hoseinifar, S. H.; Shabani, A.; Dadar, M.; Jarayedi, Z.; Paolucci, M. Sublethal Doses of Diazinon Affected Reproductive, Immune, and Oxidative Status in Female Zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Reports* **2022**, *22*, 100944.

- Das, B. K.; Mukherjee, S. C. Chronic Toxic Effects of Quinalphos on Some Biochemical Parameters in *Labeo rohita* (Ham.). *Toxicol. Lett.* **2000**, *114*, 11-18. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00185-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00185-X).
- De Anna, J. S.; Castro, J. M.; Darraz, L. A.; Elías, F. D.; Cárcamo, J. G.; Luquet, C. M. Exposure to Hydrocarbons and Chlorpyrifos Alters the Expression of Nuclear Receptors and Antioxidant, Detoxifying, and Immune Response Proteins in the Liver of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *208*, 111394. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111394>.
- de Brito Rodrigues, L.; de Oliveira, R.; Abe, F. R.; Brito, L. B.; Moura, D. S.; Valadares, M. C.; Grisolia, C. K.; de Oliveira, D. P.; de Oliveira, G. A. R. Ecotoxicological Assessment of Glyphosate-based Herbicides: Effects on Different Organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* **2017**, *36*(7), 1755-1763. <https://doi.org/10.1002/etc.3580>.
- de la Torre, F. R.; Salibián, A.; Ferrari, L. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. *Chemosphere* **2007**, *68*, 1582-1590.
- Destro, A. L. F.; Silva, S. B.; Gregório, K. P.; de Oliveira, J. M.; Lozi, A. A.; Zuanon, J. A. S.; Salaro, A. L.; da Matta, S. L. P.; Gonçalves, R. V.; Freitas, M. B. Effects of Subchronic Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of the Herbicide Atrazine in the Neotropical Fish *Astyanax altiparanae*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *208*, 111601. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111601>.
- Deus, C. M.; Yambire, K. F.; Oliveira, P. J.; Raimundo, N. Mitochondria-Lysosome Crosstalk: From Physiology to Neurodegeneration. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 71-88. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.009>.
- Dezfuli, B. S.; Simoni, E.; Giari, L.; Manera, M. Effects of Experimental Terbutylazine Exposure on the Cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere* **2006**, *64*(10), 1684-1694. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.023>.

- Dhama, K.; Latheef, S. K.; Dadar, M.; Samad, H. A.; Munjal, A.; Khandia, R.; Karthik, K.; Tiwari, R.; Yattoo, M. I.; Bhatt, P.; Chakraborty, S.; Singh, K. P.; Iqbal, H. M. N.; Chaicumpa, W.; Joshi, S. K. Biomarkers in Stress Related Diseases/Disorders: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Values. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*, 91. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00091>.
- Di Nica, V.; González, A.B.M.; Lencioni, V.; Villa, S. Behavioural and biochemical alterations by chlorpyrifos in aquatic insects: an emerging environmental concern for pristine Alpine habitats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2020**, *27*, 30918-30926. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06467-2>.
- Díaz-Resendiz, K.J.; Toledo-Ibarra, G.A.; Girón-Pérez, M.I. Modulation of immune response by organophosphorus pesticides: fishes as a potential model in immunotoxicology. *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, 213836. <https://doi.org/10.1155/2015/213836>.
- Díaz-Resendiz, K.J.G.; Girón-Pérez, M.I. Effect of chlorpyrifos on the immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Revista. Bio. Ciencias.* **2014**, *3*, 59–64. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.03.01.07>.
- Dua R, Gill KD (2004) Effect of aluminium phosphide exposure on kinetic properties of cytochrome oxidase and mitochondrial energy metabolism in rat brain. *Biochim Biophys Acta* **1674**(1):4– 11. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.05.003>
- Dupuy, C.; Cabon, J.; Louboutin, L.; Le Floch, S.; Morin, T.; Danion, M. Cellular, humoral and molecular responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a herbicide and subsequently infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Aquatic. Toxicol.* **2019**, *215*, 105282. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105282>.
- ECOTOX Knowledgebase. Recent chemicals with full searches completed and data extracted. (<https://cfpub.epa.gov/ecotox> 2022

- Eddy, F.B. Role of nitric oxide in larval and juvenile fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **2005**, *142*, 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.05.038>.
- Ehrenstein, M.R., Notley, C.A., 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 778-786.
- El-Amrani, S.; Pena-Abaurrea, M.; Sanz-Landaluze, J.; Ramos, L.; Guinea, J.; Cámara, C. Bioconcentration of pesticides in zebrafish eleutheroembryos (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* **2012**, *425*, 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.065>.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., **1961**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Environmental Transport and Fate Data Analysis for Malathion <https://www3.epa.gov/pesticides/nas/final/malathion/appendix-3-1.docx> (assessed 07 July 2022).
- Erickson, B.E. US EPA to impose atrazine restrictions, 2022. Available at: <https://cen.acs.org/environment/pesticides/US-EPA-impose-atrazine-restrictions/100/web/2022/07>. Assessed 04 February 2023.
- EU pesticide database. Active substances, safeners and synergists. EU Pesticides Database (v.2.2) Search Active substances, safeners and synergists (europa.eu) (assessed 07 July 2022).
- Falfushynska, H.; Gnatyshyna, L.L.; Stoliar, O. In situ exposure history modulates the molecular responses to carbamate fungicide Tattoo in bivalve mollusk. *Ecotoxicology.* **2013**, *22*, 433-445. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-012-1037-6>.
- Falfushynska, H.; Gnatyshyna, L.L.; Stoliar, O. Population-related molecular responses on the effect of pesticides in *Carassius auratus gibelio*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *155*, 396-406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.11.001>.

- Falfushynska, H.; Khatib, I.; Kasianchuk, N.; Lushchak, O.; Horyn, O.; Sokolova, I.M. Toxic effects and mechanisms of common pesticides (Roundup and chlorpyrifos) and their mixtures in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* **2022**, *833*, 155236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155236>.
- FAO. Pesticides use. Global, regional and country trends, 1990–2018. FAOSTAT Analytical Brief Series. **2021**, No. 16. Rome. Available at: <https://www.fao.org/3/cb3411en/cb3411en.pdf>. Assessed 07 July 2022.
- FAOSTAT analytical brief. Pesticides use Global, regional and country trends, 1990–2018. **2020**. <https://www.fao.org/3/cb3411en/cb3411en.pdf> (assessed 07 July 2022).
- Farag, M.R.; Alagawany, M.; Taha, H.S.A.; Ismail, T.A.; Khalil, S.R.; Abou-Zeid, S.M. Immune response and susceptibility of Nile tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* infection following the exposure to Bifenthrin and/or supplementation with *Petroselinum crispum* essential oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *216*, 112205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112205>.
- Farkhondeh, T.; Mehrpour, O.; Buhrmann, C.; Pourbagher-Shahri, A.M.; Shakibaei, M.; Samarghandian, S. Organophosphorus Compounds and MAPK Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4258. <https://doi.org/10.3390/ijms21124258>.
- Feltracco, M.; Barbaro, E.; Morabito, E.; Zangrando, R.; Piazza, R.; Barbante, C.; Gambaro, A. Assessing glyphosate in water, marine particulate matter, and sediments in the Lagoon of Venice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2022**, *29*, 16383-16391. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16957-x>.
- Finizio, A.; Vighi, M.; Sandroni, D. Determination of n-octanol/water partition coefficient (Kow) of pesticide critical review and comparison of methods. *Chemosphere* **1997**, *34*, 131-161. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(96\)00355-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(96)00355-4).
- Fisher, N. S.; Hook, S. E. Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicol* **2002**, *181/182*, 531–536.

- Fosu-Mensah, B.Y., Okoffo, E.D., Darko, G., Gordon, C., 2016. Organophosphorus pesticide residues in soils and drinking water sources from cocoa producing areas in Ghana. *Environ. Syst. Res.* **2016**, 5, 10.
- Fulton, M. H.; Key, P. B. Acetylcholinesterase Inhibition In Estuarine Fish And Invertebrates As An Indicator Of Organophosphorus Insecticide Exposure And Effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, 20 (1), 37-45.
- Gaur, H.; Bhargava, A. Glyphosate induces toxicity and modulates calcium and NO signaling in zebrafish embryos. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **2019**, 513, 1070-1075. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.074>.
- Georgieva, E.; Yancheva, V.; Stoyanova, S.; Velcheva, I.; Iliev, I.; Vasileva, T.; Bivolarski, V.; Petkova, E.; László, B.; Nyeste, K.; Antal, L. Which Is More Toxic? Evaluation of the Short-Term Toxic Effects of Chlorpyrifos and Cypermethrin on Selected Biomarkers in Common Carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758). *Toxics.* **2021**, 9, 125. <https://doi.org/10.3390/toxics9060125>.
- Gillezeau, C., van Gerwen, M., Shaffer, R.M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., Taioli, E., 2019. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environ. Health.* **2019**, 18, 2.
- Giron-Perez, M.I.; Santerre, A.; Gonzalez-Jaime, F.; Casas-Solis, J.; Hernandez-Coronado, M.; Peregrina-Sandoval, J.; Takemura, A.; Zaitseva, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, 23, 760-769. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.02.004>.
- Global glyphosate market - growth, trends, covid-19 impact, and forecasts (2022 - 2027). Glyphosate Market | 2022 - 27 | Industry Share, Size, Growth - Mordor Intelligence (assessed 07 July 2022).
- Golshani, R.; Mashinchian Moradi, A.; Mosavi Nodoshan, R.; Fatemi, S.M.; Ghavam Mostafavi, P. Organophosphorus pesticides (diazinon, malathion and azinfos methyl) accumulation in three fish species, in south coasts of the Caspian Sea,

- Iran. *Iranian J. Fish Sci.* **2020**, *19*, 3050-3062.
<https://doi.org/10.22092/ijfs.2020.122933>.
- Goulart, T. L.; Boyle, R. T.; Souza, M. M. Cytotoxicity of the Association of Pesticides Roundup Transorb® and Furadan 350 SC® on the Zebrafish Cell Line, ZF-L. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29* (7), 1377–1384.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.007>.
- Griffith, O. W. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **1980**, *106* (1), 207–212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6).
- Guilherme, S.; Gaivão, I.; Santos, M. A.; Pacheco, M. DNA Damage in Fish (*Anguilla anguilla*) Exposed to a Glyphosate-Based Herbicide - Elucidation of Organ-Specificity and the Role of Oxidative Stress. *Mutat. Res.* **2012**, *743* (1-2), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017>.
- Guilherme, S.; Gaivao, I.; Santos, M. A.; Pacheco, M. European Eel (*Anguilla anguilla*) Genotoxic and Prooxidant Responses Following Short-Term Exposure to Roundup® - A Glyphosate-Based Herbicide. *Mutagenesis* **2010**, *25* (5), 523–530. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq038>.
- Gunkel, G.; Streit, B. Mechanisms of Bioaccumulation of a Herbicide (Atrazine, s-Triazine) in a Freshwater Mollusc (*Ancylus fluviatilis* Müll.) and a Fish (*Coregonus fera* Jurine). *Water Res.* **1980**, *14* (11), 1573–1584.
[https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90061-5).
- Güven, M.; Bayram, F.; Unlühizarci, K.; Keleştimur, F. Endocrine Changes in Patients with Acute Organophosphate Poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* **1999**, *18* (10), 598–601. <https://doi.org/10.1191/096032799678839419>.
- Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249* (22), 7130–7139.
- Hanke, I.; Singer, H.; Hollender, J. Ultratrace-Level Determination of Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid and Glufosinate in Natural Waters by Solid-

Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Performance Tuning of Derivatization, Enrichment and Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (6), 2265–2276. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2134-5>.

Hanson, M. L.; Solomon, K. R.; Van Der Kraak, G. J.; Brian, R. A. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Reptiles: Update of the Analysis Based on Quantitative Weight of Evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* **2019**, *49* (8), 670–709. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1701985>.

Hara, A.; Hiramatsu, N.; Fujita, T. Vitellogenesis and Choriogenesis in Fishes. *Fish Sci.* **2016**, *82* (2), 187–202. <https://doi.org/10.1007/s12562-015-0957-5>.

Hassan, M. A.; Hozien, S. T.; Abdel Wahab, M. M.; Hassan, A. Ameliorative Effect of Selenium Yeast Supplementation on the Physio-Pathological Impacts of Chronic Exposure to Glyphosate and/or Malathion in *Oreochromis niloticus*. *BMC Vet. Res.* **2022**, *18* (1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03261-0>.

Hayes, T. B.; Khoury, V.; Narayan, A.; Nazir, M.; Park, A.; Brown, T.; Adame, L.; Chan, E.; Buchholz, D.; Stueve, T.; Gallipeau, S. Atrazine Induces Complete Feminization and Chemical Castration in Male African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (10), 4612–4617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>.

Health Effects of These Pesticides Are Among the Top 10 Most Heavily Used Pesticides in the Home and Garden Sector from 2006-2007, According to the Latest Sales and Usage Data Available from EPA (2011). Available at <https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/lawn/factsheets/30health.pdf>.

Heys, K. A.; Shore, R. F.; Glória Pereira, M.; Jones, K. C.; Martin, F. L. Risk Assessment of Environmental Mixture Effects (Review Article). *RSC Adv.* **2016**, *6* (51), 47844–47857. <https://doi.org/10.1039/C5RA20708A>.

- Hollert, H.; Keiter, S. H. Danio rerio as a Model in Aquatic Toxicology and Sediment Research. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, *22* (21), 16243–16246. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5297-8>.
- Holzer, G.; Besson, M.; Lambert, A.; François, L.; Barth, P.; Gillet, B.; Hughes, S.; Piganeau, G.; Leulier, F.; Viriot, L.; Lecchini, D.; Laudet, V. Fish Larval Recruitment to Reefs Is a Thyroid Hormone-Mediated Metamorphosis Sensitive to the Pesticide Chlorpyrifos. *Elife* **2017**, *6*, e27595. <https://doi.org/10.7554/eLife.27595>.
- Howe, K.; Clark, M. D.; Torroja, C. F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J. E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome. *Nature* **2013**, *496* (7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.
- Husak, V.; Strutynska, T.; Burdyliuk, N.; Pitukh, A.; Bubalo, V.; Falfushynska, H.; Strilbytska, O.; Lushchak, O. Low-Toxic Herbicides Roundup and Atrazine Disturb Free Radical Processes in Daphnia in Environmentally Relevant Concentrations. *EXCLI J.* **2022**, *21*, 595–609. <https://doi.org/10.17179/excli2022-4690>.
- Intayoung, U.; Wunnapuk, K.; Kohsuwan, K.; Sapbamrer, R.; Khacha-Ananda, S. Effect of Occupational Exposure to Herbicides on Oxidative Stress in Sprayers. *Saf. Health Work* **2021**, *12* (1), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2020.09.011>.
- Jackson, M. P.; Hewitt, E. W. Cellular Proteostasis: Degradation of Misfolded Proteins by Lysosomes. *Essays Biochem.* **2016**, *60* (2), 173–180. <https://doi.org/10.1042/EBC20160005>.
- Jang, S.; Javadov, S. Association between ROS Production, Swelling and the Respirasome Integrity in Cardiac Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *630*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.009>.
- Jarvinen, A. W.; Nordling, B. R.; Henry, M. E. Chronic Toxicity of Dursban (Chlorpyrifos) to the Fathead Minnow (*Pimephales Promelas*) and the

- Resultant Acetylcholinesterase Inhibition. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1983**, *7*, 423–434. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(83\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(83)90008-8).
- Jayaraj, R.; Megha, P.; Sreedev, P. Organochlorine Pesticides, Their Toxic Effects on Living Organisms and Their Fate in the Environment. *Interdiscip. Toxicol.* **2016**, *9* (3–4), 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>.
- Jia, Z. Q.; Zhang, Y. C.; Huang, Q. T.; Jones, A. K.; Han, Z. J.; Zhao, C. Q. Acute Toxicity, Bioconcentration, Elimination, Action Mode and Detoxification Metabolism of Broflanilide in Zebrafish, *Danio Rerio*. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *394*, 122521. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122521>.
- Jin, Y.; Liu, Z.; Peng, T.; Fu, Z. The Toxicity of Chlorpyrifos on the Early Life Stage of Zebrafish: A Survey on the Endpoints at Development, Locomotor Behavior, Oxidative Stress and Immunotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *43*, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.010>.
- Kamrin, M. A. *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1997.
- Kanissery, R.; Gairhe, B.; Kadyampakeni, D.; Batuman, O.; Alferez, F. Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition. *Plants (Basel)* **2019**, *8*, 499.
- Kannan, K.; Jain, S. K. Oxidative Stress and Apoptosis. *Pathophysiology* **2000**, *7*, 153–163.
- Kar, S.; Sangem, P.; Anusha, N.; Senthilkumaran, B. Endocrine Disruptors in Teleosts: Evaluating Environmental Risks and Biomarkers. *Aquaculture Fisheries* **2021**, *6*, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.07.013>.
- Karlsson, A. S.; Lesch, M.; Weihermüller, L.; Thiele, B.; Disko, U.; Hofmann, D.; Vereecken, H.; Spielvogel, S. Pesticide Contamination of the Upper Elbe River and an Adjacent Floodplain Area. *J. Soils Sediments* **2020**, *20*, 2067–2081. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02571-w>.

- Kaszkowiak, K.; Kubacki, T.; Olejniczak, J.; Bondarenko, I. The Concentration of Glyphosate in the Tap Water in Greater Poland Region. *Eur. J. Biol. Res.* **2021**, *11*, 57–64. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4310255>.
- Katagi, T. Bioconcentration, Bioaccumulation, and Metabolism of Pesticides in Aquatic Organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2010**, *204*, 1–132. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1440-8_1.
- Kaur, M.; Jindal, R. Oxidative Stress Response in Liver, Kidney and Gills of Ctenopharyngodon Idellus (Cuvier & Valenciennes) Exposed to Chlorpyrifos. *MOJ Biol. Med.* **2017**, *1*, 103–112. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2017.01.00021>.
- Khatib, I.; Rychter, P.; Falfushynska, H. Pesticide Pollution: Detrimental Outcomes and Possible Mechanisms of Fish Exposure to Common Organophosphates and Triazines. *J. Xenobiot.* **2022**, *12* (3), 236–265. <https://doi.org/10.3390/jox12030018>.
- Kirsten, K. S.; Canova, R.; Soveral, L. F.; Friedrich, M. T.; Frandoloso, R.; Kreutz, L. C. Reduced Expression of Selective Immune-Related Genes in Silver Catfish (*Rhamdia Quelen*) Monocytes Exposed to Atrazine. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *64*, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.006>.
- Ko, E. Y.; Cho, S. H.; Kwon, S. H.; Eom, C. Y.; Jeong, M. S.; Lee, W.; Kim, S. Y.; Heo, S. J.; Ahn, G.; Lee, K. P.; Jeon, Y. J.; Kim, K. N. The Roles of NF- κ B and ROS in Regulation of Pro-Inflammatory Mediators of Inflammation Induction in LPS-Stimulated Zebrafish Embryos. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *68*, 525–529. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.041>.
- Korkmaz, C.; Dönmez, A. E. Effects of Diazinon on 17 β -Estradiol, Plasma Vitellogenin and Liver and Gonad Tissues of Common Carp (*Cyprinus Carpio*, L., 1758). *Turkish J. Fisheries Aquat. Sci.* **2017**, *17*, 627–638. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_3_19.
- Kruć-Fijałkowska, R.; Dragon, K.; Drożdżyński, D.; Górski, J. Seasonal Variation of Pesticides in Surface Water and Drinking Water Wells in the Annual Cycle in

- Western Poland, and Potential Health Risk Assessment. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 3317. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07385-z>.
- Laetz, C. A.; Baldwin, D. H.; Collier, T. K.; Hebert, V.; Stark, J. D.; Scholz, N. L. The Synergistic Toxicity of Pesticide Mixtures: Implications for Risk Assessment and the Conservation of Endangered Pacific Salmon. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 348–353.
- Lau, E. S.; Zhang, Z.; Qin, M.; Ge, W. Knockout of Zebrafish Ovarian Aromatase Gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 Leads to All-Male Offspring Due to Failed Ovarian Differentiation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37357. <https://doi.org/10.1038/srep37357>.
- Le Mer, C.; Roy, R. L.; Pellerin, J.; Couillard, C. M.; Maltais, D. Effects of Chronic Exposures to the Herbicides Atrazine and Glyphosate to Larvae of the Threespine Stickleback (*Gasterosteus Aculeatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, *89*, 174–181.
- Ledda, C.; Cannizzaro, E.; Cinà, D.; Filetti, V.; Vitale, E.; Paravizzini, G.; Di Naso, C.; Iavicoli, I.; Rapisarda, V. Oxidative Stress and DNA Damage in Agricultural Workers after Exposure to Pesticides. *J. Occup. Med. Toxicol.* **2021**, *16*, 1. <https://doi.org/10.1186/s12995-020-00290-z>.
- Leemans, M.; Couderq, S.; Demeneix, B.; Fini, J. B. Pesticides with Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 743. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00743>.
- Leung, M. C. K.; Meyer, J. N. Mitochondria as a Target of Organophosphate and Carbamate Pesticides: Revisiting Common Mechanisms of Action with New Approach Methodologies. *Reprod. Toxicol.* **2019**, *89*, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.007>.
- Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **2008**, *132*, 27–42.
- Li, J.; Xu, Y.; Li, N.; Zuo, R.; Zhai, Y.; Chen, H. Thyroid Hormone Disruption by Organophosphate Esters Is Mediated by Nuclear/Membrane Thyroid Hormone

- Receptors: In Vitro, In Vivo, and In Silico Studies. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56*, 4241–4250. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05956>.
- Li, X.; Liu, L.; Zhang, Y.; Fang, Q.; Li, Y. Toxic Effects of Chlorpyrifos on Lysozyme Activities, the Contents of Complement C3 and IgM, and IgM and Complement C3 Expressions in Common Carp (*Cyprinus Carpio* L.). *Chemosphere* **2013**, *93*, 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.023>.
- Liess, M.; Henz, S.; Shahid, N. Modeling the Synergistic Effects of Toxicant Mixtures. *Environ. Sci. Eur.* **2020**, *32*, 119.
- Lionetto, M. G.; Caricato, R.; Giordano, M. E. Pollution Biomarkers in the Framework of Marine Biodiversity Conservation: State of Art and Perspectives. *Water* **2021**, *13*, 1847.
- Liu, J.; Gupta, R. C.; Goad, J. T.; Karanth, S.; Pope, C. Modulation of Parathion Toxicity by Glucose Feeding: Is Nitric Oxide Involved? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *219*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.005>.
- Liu, Z.; Peng, T.; Fu, Z. The Toxicity of Chlorpyrifos on the Early Life Stage of Zebrafish: A Survey on the Endpoints at Development, Locomotor Behavior, Oxidative Stress and Immunotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *43*, 405–414.
- Liu, Z.; Zhang, H.; Tao, M.; Yang, S.; Wang, L.; Liu, Y.; Ma, D.; He, Z. Organochlorine Pesticides in Consumer Fish and Mollusks of Liaoning Province, China: Distribution and Human Exposure Implications. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2010**, *59*, 444–453. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9504-7>.
- Loboda, A.; Damulewicz, M.; Pyza, E.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. Role of Nrf2/HO-1 System in Development, Oxidative Stress Response and Diseases: An Evolutionarily Conserved Mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>.
- Lowry, O. H.; Rosbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.

- Lungu-Mitea, S.; Oskarsson, A.; Lundqvist, J. Development of an Oxidative Stress In Vitro Assay in Zebrafish (*Danio Rerio*) Cell Lines. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12380.
- Lushchak, O. V.; Kubrak, O. I.; Storey, J. M.; Storey, K. B.; Lushchak, V. I. Low Toxic Herbicide Roundup Induces Mild Oxidative Stress in Goldfish Tissues. *Chemosphere* **2009**, *76*, 932–937. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>.
- Lushchak, V. I. Contaminant-Induced Oxidative Stress in Fish: A Mechanistic Approach. *Fish Physiol. Biochem.* **2016**, *42*, 711–747.
- Lushchak, V. I. Environmentally Induced Oxidative Stress in Aquatic Animals. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *101*, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
- Lushchak, V. I.; Matviishyn, T. M.; Husak, V. V.; Storey, J. M.; Storey, K. B. Pesticide Toxicity: A Mechanistic Approach. *EXCLI J.* **2018**, *17*, 1101–1136. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>.
- Ma, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 401–426.
- Maheshwari, N.; Mahmood, R. Protective Effect of Catechin on Pentachlorophenol-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Isolated Human Blood Cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2020**, *27*, 13826–13843. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07969-0>.
- Mangas, I.; Estevez, J.; Vilanova, E.; França, T.C. New Insights on Molecular Interactions of Organophosphorus Pesticides with Esterases. *Toxicology* **2017**, *376*, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.06.006>.
- Marins, A.T.; Cerezer, C.; Leitemperger, J.W.; Severo, E.S.; Costa, M.D.; Fontoura, D.O.; Nunes, M.E.M.; Ribeiro, L.C.; Zanella, R.; Loro, V.L. A Mixture of Pesticides at Environmental Concentrations Induces Oxidative Stress and Cholinergic Effects in the Neotropical Fish *Rhamdia Quelen*. *Ecotoxicology* **2021**, *30*, 164–174. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02300-6>.

- Marsillach, J.; Costa, L.G.; Furlong, C.E. Protein Adducts as Biomarkers of Exposure to Organophosphorus Compounds. *Toxicology* **2013**, *307*, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.007>.
- Martínez, M.C.; Andriantsitohaina, R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants Redox Signal.* **2009**, *11*, 669–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>.
- Mashoof, S.; Criscitiello, M.F. Fish Immunoglobulins. *Biology (Basel)* **2016**, *5*, 45. <https://doi.org/10.3390/biology5040045>.
- Medalie, L.; Baker, N.T.; Shoda, M.E.; Stone, W.W.; Meyer, M.T.; Stets, E.G.; Wilson, M. Influence of Land Use and Region on Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Streams in the USA. *Sci. Total Environ.* **2020**, *707*, 136008. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136008>.
- Mesnager, R.; Defarge, N.; Spiroux de Vendômois, J.; Séralini, G.E. Potential Toxic Effects of Glyphosate and Its Commercial Formulations Below Regulatory Limits. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *84*, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>.
- Minnesota Department of Health. Protecting, Maintaining, and Improving the Health of All Minnesotans. <https://www.health.state.mn.us> (accessed Jan 15, 2022).
- Mishra, A.; Singh, A. Chlorpyrifos Effect on Vitellogenin, Ovarian Steroid in Adult and Nr5a1 Expression in Fry of the Freshwater Catfish, *Heteropneustes Fossilis* (Bloch, 1794). *Asian J. Biol. Life Sci.* **2021**, *10*, 65–75. <http://dx.doi.org/10.5530/ajbls.2021.10.11>.
- Mitchel, R.E.J.; Birnboim, H.C. The Use of Girard-T Reagent in a Rapid and Sensitive Method for Measuring Glyoxal and Certain Other α -Dicarbonyl Compounds. *Anal. Biochem.* **1977**, *81* (1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90597-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90597-8).
- Mitchelmore, C.L.; Chipman, J.K. DNA Strand Breakage in Aquatic Organisms and the Potential Value of the Comet Assay in Environmental Monitoring. *Mutat. Res.* **1998**, *399* (2), 135–147. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00252-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00252-2).

- Mnif, W.; Hassine, A.I.; Bouaziz, A.; Bartegi, A.; Thomas, O.; Roig, B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, *8*, 2265–2303.
- Modesto, K.A.; Martinez, C.B. Roundup Causes Oxidative Stress in Liver and Inhibits Acetylcholinesterase in Muscle and Brain of the Fish *Prochilodus Lineatus*. *Chemosphere* **2010**, *78*, 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>.
- Moore, M.N.; Icarus Allen, J.; McVeigh, A. Environmental Prognostics: An Integrated Model Supporting Lysosomal Stress Responses as Predictive Biomarkers of Animal Health Status. *Mar. Environ. Res.* **2006**, *61* (3), 278–304. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2005.10.005>.
- Moreno, C.; Santos, R.M.; Burns, R.; Zhang, W.C. Succinate Dehydrogenase and Ribonucleic Acid Networks in Cancer and Other Diseases. *Cancers (Basel)* **2020**, *12* (11), 3237. <https://doi.org/10.3390/cancers12113237>.
- Moss, J.J.; Hammond, C.L.; Lane, J.D. Zebrafish as a Model to Study Autophagy and Its Role in Skeletal Development and Disease. *Histochem. Cell Biol.* **2020**, *154*, 549–564. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01917-2>.
- Moustafa, G.G.; Shaaban, F.E.; Hadeed, A.H.; Elhady, W.M. Immunotoxicological, Biochemical, and Histopathological Studies on Roundup and Stomp Herbicides in Nile Catfish (*Clarias Gariepinus*). *Vet. World* **2016**, *9*, 638–647. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.638-647>.
- Nabi, M.; Tabassum, N. Role of Environmental Toxicants on Neurodegenerative Disorders. *Front. Toxicol.* **2022**, *4*, 837579. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.837579>.
- Nassar, A.M.K.; Abdel-Halim, K.Y.; Abbassy, M.A. Mitochondrial Biochemical and Histopathological Defects Induced by the Herbicide Pendimethalin in Tilapia Fish (*Oreochromis Niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2021**, *242*, 108949. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108949>.

- National Report About the Current State of Environment in Ukraine, 2020–2021. - Ministry of Environmental Protection and Natural Resources of Ukraine (MEPR) (accessed Jul 07, 2022). <https://mepr.gov.ua/diyalnist/napryamky/ekologichnyj-monitoryng/natsionalni-dopovidi-pro-stan-navkolyshnogo-pryrodnogo-seredovyshha-v-ukrayini/>.
- Naughton, S.X.; Terry, A.V. Jr. Neurotoxicity in Acute and Repeated Organophosphate Exposure. *Toxicology* **2018**, *408*, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>.
- Noble, A. Partition Coefficients (n-Octanol—Water) for Pesticides. *J. Chromatography A* **1993**, *642*, 3–14. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80072-G](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80072-G).
- Nunes, M.E.M.; Müller, T.E.; Murussi, C.; do Amaral, A.M.B.; Gomes, J.L.C.; Marins, A.T.; Leitemperger, J.; Rodrigues, C.C.R.; Fiuza, T.L.; Costa, M.D.; Severo, E.S.; Rosemberg, D.B.; Loro, V.L. Oxidative Effects of the Acute Exposure to a Pesticide Mixture of Cypermethrin and Chlorpyrifos on Carp and Zebrafish - A Comparative Study. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *206–207*, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.002>.
- Nur, G.; Deveci, H.A. Histopathological and Biochemical Responses to the Oxidative Stress Induced by Glyphosate-Based Herbicides in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Chemosphere* **2019**, *225*, 625–634. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.072>
- Nwani, C.D.; Lakra, W.S.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Kushwaha, B.; Srivastava, S.K. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2010**, *7*, 3298–312. <https://doi.org/10.3390/ijerph7083298>.

- Oğuz, A.R.; Kaval Oğuz, E.; Özok, N. Effects of chlorpyrifos on primary gill cell culture of Lake Van fish (*Alburnus tarichi* Güldenstaadt 1814). *Toxicol Res (Camb)* **2020**, *9*, 741-745. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa076>.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Okada, E.; Pérez, D.; De Gerónimo, E.; Aparicio, V.; Massone, H.; Costa, J.L. Non-point source pollution of glyphosate and AMPA in a rural basin from the southeast Pampas, Argentina. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2018**, *25*, 15120-15132. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1734-7>.
- Okwuosa, O.B.; Eyo, J.E.; Omovwohwovie, E.E. Role Of Fish as Bioindicators: A Review. *Iconic Res. Engineering J.* **2019**, *2*, 354-368.
- Olive, P.L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Molec. Mutagen.* **1988**, *11*, 487-495. <https://doi.org/10.1002/em.2850110409>.
- Olsvik, P.A.; Larsen, A.K.; Berntssen, M.H.G.; Goksøyr, A.; Karlsen, O.A.; Yadetie, F.; Sanden, M.; Kristensen, T. Effects of Agricultural Pesticides in Aquafeeds on Wild Fish Feeding on Leftover Pellets Near Fish Farms. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 794. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00794>.
- Otênio, J.K.; Souza, K.D.; Alberton, O.; Alberton, L.R.; Moreno, K.G.T.; Gasparotto Junior, A.; Palozi, R.A.C.; Lourenço, E.L.B.; Jacomassi, E. Thyroid-disrupting effects of chlorpyrifos in female Wistar rats. *Drug Chem. Toxicol.* **2022**, *45*, 387-392. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1701487>.
- PAN-EU list of chemicals that provoke endocrine disruption. <https://www.pan-europe.info/>.
- Panis, C.; Candiotti, L.Z.P.; Gaboardi, S.C.; Gurzenda, S.; Cruz, J.; Castro, M.; Lemos, B. Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. *Environ. Int.* **2022**, *165*, 107321. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107321>.

- Park, S.E.; Lim, S.R.; Choi, H.K.; Bae, J. Triazine herbicides inhibit relaxin signaling and disrupt nitric oxide homeostasis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *307*, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.07.010>.
- Parny, M.; Coste, A.; Aubouy, A.; Rahabi, M.; Prat, M.; Pipy, B.; Treilhou, M. Differential immunomodulatory effects of six pesticides of different chemical classes on human monocyte-derived macrophage functions. *Food Chem. Toxicol.* **2022**, *163*, 112992. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112992>.
- Parvez, S.; Raisuddin, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *20*, 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.002>.
- Pearson, J.N.; Patel, M. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2016**, *1378*, 17-24.
- Peruzzo, P.J.; Porta, A.A.; Ronco, A.E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* **2008**, *156*, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>.
- Pesticides Industry Sales and Usage 2008 – 2012 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency. https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf.
- Phillips, P.J.; Ator, S.W.; Nystrom, E.A. Temporal Changes in Surface-Water Insecticide Concentrations after the Phaseout of Diazinon and Chlorpyrifos. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4246-4251.
- Plisetskaya, E.M. Physiology of fish endocrine pancreas. *Fish Physiol Biochem.* **1989**, *7*(1-6), 39-48. <https://doi.org/10.1007/BF00004688>.
- Plumb, J.A.; Areechon, N. Effect of malathion on humoral immune response of channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **1990**, *14*(3), 355-358. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(90\)90026-B](https://doi.org/10.1016/0145-305X(90)90026-B).

- Poiger, T.; Buerge, I.J.; Bächli, A.; Müller, M.D.; Balmer, M.E. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 1588-1596. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7835-2>.
- Rabbani, N.; Thornalley, P.J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* **2010**, *42*, 1133-1142.
- Rabbani, N.; Xue, M.; Thornalley, P.J. Chapter 36 - Dicarbonyl stress and the glyoxalase system. In *Oxidative Stress*; Sies, H., Ed.; Academic Press, **2020**; pp 759-777.
- Reddam, A.; McLarnan, S.; Kupsco, A. Environmental chemical exposures and mitochondrial dysfunction: a review of recent literature. *Curr. Envir. Health. Rpt.* **2022**, *9*, 631-649. <https://doi.org/10.1007/s40572-022-00371-7>.
- Redondo-López, S.; León, A.C.; Jiménez, K.; Solano, K.; Blanco-Peña, K.; Mena, F. Transient exposure to sublethal concentrations of a pesticide mixture (chlorpyrifos-difenoconazole) caused different responses in fish species from different trophic levels of the same community. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2022**, *251*, 109208. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109208>.
- Ren, H.; Zhai, W.; Lu, X.; Wang, G. The Cross-Links of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 691881. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.691881>.
- Rendon-von Osten, J.; Dzul-Caamal, R. Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2017**, *14*, 595.
- Rico, A.; de Oliveira, R.; Silva de Souza Nunes, G.; Rizzi, C.; Villa, S.; De Caroli Vizioli, B.; Montagner, C.C.; Waichman, A.V. Ecological risk assessment of pesticides in urban streams of the Brazilian Amazon. *Chemosphere.* **2022**, *291*(Pt 1), 132821. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132821>.

- Roberts, J.Z.; Crawford, N.; Longley, D.B. The role of ubiquitination in apoptosis and necroptosis. *Cell. Death. Differ.* **2022**, *29*, 272–284. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00922-9>.
- Rocha, T.L.; Santos, A.P.; Yamada, Á.T.; Soares, C.M.; Borges, C.L.; Bailão, A.M.; Sabóia-Morais, S.M. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40*, 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016>.
- Rohani, Md. Fazle. Pesticides toxicity in fish: Histopathological and hemato-biochemical aspects – A review. *Emerging Contaminants.* **2023**, *9*, 100234. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100234>.
- Ronka, S. Removal of triazine-based herbicides on specific polymeric sorbent: batch studies. *Pure Appl. Chem.* **2016**, *88*, 1167–1177. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-0906>.
- Sagarkar, S.; Gandhi, D.; Devi, S.S.; Sakharkar, A.; Kapley, A. Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. *Indian J. Pharmacol.* **2016**, *48*, 200-207. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.178842>.
- Samanta, P.; Pal, S.; Mukherjee, A.K.; Gosh, A.R. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathion-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* **2014**, *107*, 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.025>.
- Sánchez-Bayo, F.; Baskaran, S.; Kennedy, I.R. Ecological relative risk (EcoRR): Another approach for risk assessment of pesticides in agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2002**, *91*, 37–57. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00258-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00258-4).
- Sánchez-Santed, F.; Colomina, M.T.; Herrero Hernández, E. Organophosphate Pesticide Exposure and Neurodegeneration. *Cortex.* **2016**, *74*, 417-426. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>.

- Sandoval-Herrera, N.; Mena, F.; Espinoza, M.; Romero, A. Neurotoxicity of organophosphate pesticides could reduce the ability of fish to escape predation under low doses of exposure. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10530. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46804-6>.
- Santana, M. S.; Domingues de Melo, G.; Sandrini-Neto, L.; Di Domenico, M.; Prodocimo, M. M. A meta-analytic review of fish antioxidant defense and biotransformation systems following pesticide exposure. *Chemosphere* **2022**, *291* (Pt 1), 132730. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132730>.
- Sarker, S.; Akbor, M.A.; Nahar, A.; Hasan, M.; Islam, A.R.M.T.; Siddique, M.A.B. Level of pesticides contamination in the major river systems: A review on South Asian countries perspective. *Heliyon.* **2021**, *7*(6), e07270. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07270>.
- Schweizer, F. Enhancing uptake of antibiotics into Gram-negative bacteria using nonribosome-targeting aminoglycoside-based adjuvants. *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1519-1522. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0131>.
- Serrano, R.; Hernández, F.; López, F.; Peña, J.B. Bioconcentration and Depuration of Chlorpyrifos in the Marine Mollusc *Mytilus edulis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, *33*, 47–52. <https://doi.org/10.1007/s002449900222>.
- Shah, Z.U.; Parveen, S. Oxidative, biochemical and histopathological alterations in fishes from pesticide contaminated river Ganga, India. *Sci Rep.* **2022**, *12*, 3628. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07506-8>.
- Shi, D.Y.; Xie, F.Z.; Zhai, C.; Stern, J.S.; Liu, Y.; Liu, S.L. The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells. *Mol. Cancer.* **2009**, *8*, 32. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-32>.
- Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annual Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
- Silva de Souza, S.; Machado, R.N.; Custódio da Costa, J.; Campos, D.F.; Sebrenski da Silva, G.; Fonseca de Almeida-Val, V.M. Severe damages caused by

- Malathion exposure in *Colossoma macropomum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *205*, 111340. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111340>.
- Sinhorin, V. D.; Sinhorin, A. P.; Teixeira, J. M.; Miléski, K. M.; Hansen, P. C.; Moreira, P. S.; Kawashita, N. H.; Baviera, A. M.; Loro, V. L. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid *Amazon fish surubim* (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicol Environ Saf* **2014**, *106*, 181-7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.040>.
- Spano, L.; Tyler, C. R.; van Aerle, R.; Devos, P.; Mandiki, S. N.; Silvestre, F.; Thomé, J. P.; Kestemont, P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicol* **2004**, *66*, 369-79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.009>.
- Stara, A.; Zuskova, E.; Kouba, A.; Velisek, J. Effects of terbuthylazine-desethyl, a terbuthylazine degradation product, on red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Sci Total Environ* **2016**, *566-567*, 733-740. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.113>.
- Stipičević, S.; Galzina, N.; Udiković-Kolić, N.; Jurina, T.; Mendaš, G.; Dvorščak, M.; Petrić, I.; Barić, K.; Drevenkar, V. Distribution of terbuthylazine and atrazine residues in crop-cultivated soil: The effect of herbicide application rate on herbicide persistence. *Geoderma* **2015**, *259-260*, 300-309. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.06.018>.
- Stratton, G. W. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. *Arch Environ Contam Toxicol* **1984**, *13*, 35-42. <https://doi.org/10.1007/BF01055644>.
- Strilbyska, O. M.; Tsiumpala, S. A.; Kozachyshyn, I. I.; Strutynska, T.; Burdyliuk, N.; Lushchak, V. I.; Lushchak, O. The effects of low-toxic herbicide Roundup and glyphosate on mitochondria. *EXCLI J* **2022**, *21*, 183-196. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4478>.

- Suárez, B.; Vela-Soria, F.; Castiello, F.; Olivás-Martínez, A.; Acuña-Castroviejo, D.; Gómez-Vida, J.; Olea, N.; Fernández, M. F.; Freire, C. Organophosphate pesticide exposure, hormone levels, and interaction with PON1 polymorphisms in male adolescents. *Sci Total Environ* **2021**, *769*, 144563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144563>.
- Sule, R. O.; Condon, L.; Gomes, A. V. A common feature of pesticides: oxidative stress-the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, *2022*, 5563759. <https://doi.org/10.1155/2022/5563759>.
- Sulukán, E.; Köktürk, M.; Ceylan, H.; Beydemir, Ş.; Işık, M.; Atamanalp, M.; Ceyhun, S. B. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* **2017**, *180*, 77-85.
- Sun, F.; Chen, H. S. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. *Chemosphere* **2008**, *71*, 1866–1869. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.034>.
- Suzawa, M.; Ingraham, H. A. The Herbicide Atrazine Activates Endocrine Gene Networks via Non-Steroidal NR5A Nuclear Receptors in Fish and Mammalian Cells. *PLoS ONE* **2008**, *3*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002117>.
- Székács, A.; Mörtl, M.; Darvas, B. Monitoring Pesticide Residues in Surface and Ground Water in Hungary: Surveys in 1990–2015. *J Chem* **2015**, *2015*, 717948. <https://doi.org/10.1155/2015/717948>.
- Tang, F. H. M.; Lenzen, M.; McBratney, A.; Maggi, F. Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nat Geosci* **2021**, *14*, 206–210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>.
- Taylor, M. D.; Klaine, S. J.; Carvalho, F. P.; Barcelo, D. Pesticide residues in coastal tropical ecosystems: distribution, fate and effects. In: Everaarts J (1st ed.). *CRC Press Boca Raton, London, GB* **2002**, 576. <https://doi.org/10.1201/9780203165584>.

- Thrasher, J. D.; Madison, R.; Broughton, A. Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos: preliminary observations. *Arch Environ Health* **1993**, *48*(2), 89-93. <https://doi.org/10.1080/00039896.1993.9938400>.
- Tian, H.; Ru, S.; Wang, Z.; Cai, W.; Wang, W. Estrogenic effects of monocrotophos evaluated by vitellogenin mRNA and protein induction in male goldfish (*Carassius auratus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **2009**, *150*, 231-236. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.014>.
- Tong, N. X.; Huong, T. T. T.; Huong, M.; Thuy, D. T. Determination of the bioaccumulation factors of organochlorine pesticides (OCPs) at some species of bivalve mollusks in Soai Rap estuary - Ho Chi Minh city. *Vietnam J Mar Sci Tech* **2019**, *18*, 433–442. <https://doi.org/10.15625/1859-3097/13186>.
- Trang, A.; Khandhar, P. B. Physiology, Acetylcholinesterase. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), **2022**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539735/>.
- Trimble, A. J.; Lydy, M. J. Effects of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity in *Hyaella azteca*. *Arch Environ Contam Toxicol* **2006**, *51*(1), 29-34. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0176-7>.
- Tsuda, T.; Kojima, M.; Harada, H.; Nakajima, A.; Aoki, S. Acute toxicity, accumulation and excretion of organophosphorous insecticides and their oxidation products in killifish. *Chemosphere* **1997**, *35*, 939-949. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(97\)00180-x](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(97)00180-x).
- Turton, N.; Heaton, R. A.; Ismail, F.; Roberts, S.; Nelder, S.; Phillips, S.; Hargreaves, I. P. The Effect of Organophosphate Exposure on Neuronal Cell Coenzyme Q10 Status. *Neurochem. Res.* **2021**, *46*, 131-139. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03033-y>.
- Ubaid ur Rahman, H.; Asghar, W.; Nazir, W.; Sandhu, M. A.; Ahmed, A.; Khalid, N. A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Sci. Total Environ.* **2021**, *755*, 142649.

- Van Leeuwen, C. J.; Bro-Rasmussen, F.; Feijtel, T. C.; Arndt, R.; Bussian, B. M.; Calamari, D.; Glynn, P.; Grandy, N. J.; Hansen, B.; Van Hemmen, J. J.; Hurst, P.; King, N.; Koch, R.; Müller, M.; Solbé, J. F.; Speijers, G. A.; Vermeire, T. Risk assessment and management of new and existing chemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1996**, *20*, 243-299.
- Van Stempvoort, D. R.; Roy, J. W.; Brown, S. J.; Bickerton, G. Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments. *Chemosphere* **2014**, *95*, 455-463. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.095>.
- Van Stempvoort, D. R.; Spoelstra, J.; Senger, N. D.; Brown, S. J.; Post, R.; Struger, J. Glyphosate residues in rural groundwater, Nottawasaga River Watershed, Ontario, Canada. *Pest. Manag. Sci.* **2016**, *72*, 1862-1872. <https://doi.org/10.1002/ps.4218>.
- Varó, I.; Serrano, R.; Pitarch, E.; Amat, F.; López, F. J.; Navarro, J. C. Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, *65*, 623-630. <https://doi.org/10.1007/s0012800169>.
- Vasanth, S.; Arul, G.; Karthikeyeni, S.; Kumar, T. S.; Vignesh, V.; Manimegalai, M.; Bupesh, G.; Thirumurugan, R.; Subramanian, P. Influence of Triazine Herbicide Exposure on Guppies (*Poecilia sphenops*) Aromatase Activities, Altered Sex Steroid Concentration and Vitellogenin Induction. *Indian J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 156-162. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.156549>.
- Vazzana, M.; Salerno, G.; Vizzini, A.; Parrinello, D.; Di Bella, M. L.; Arizza, V. Effect of in vitro exposure to cadmium and copper on sea bass blood cells. *Ital. J. Anim. Sci.* **2016**, *8*(Suppl. 2), 884-886. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s2.884>.
- Velisek, J.; Stara, A.; Zuskova, E. Effect of single and combination of three triazine metabolites at environmental concentrations on early life stages of common

- carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 24289-24297. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7689-7>.
- Venkatesan, R.; Park, Y. U.; Ji, E.; Yeo, E. J.; Kim, S. Y. Malathion increases apoptotic cell death by inducing lysosomal membrane permeabilization in N2a neuroblastoma cells: a model for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Cell Death Discov.* **2017**, *3*, 17007. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.7>.
- Vieira, C. E. D.; Pérez, M. R.; Acayaba, R. D.; Raimundo, C. C. M.; Dos Reis Martinez, C. B. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* **2018**, *195*, 125-134.
- Vighi, M.; Di Guardo, A. Predictive approaches for the evaluation of pesticide exposure. In Vighi, M.; Funari, E., Eds. *Pesticide Risk in Groundwater*; CRC: Boca Raton, FL, USA, **1995**; pp 73-85.
- Vinggaard, A. M.; Hnida, C.; Breinholt, V.; Larsen, J. C. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. In Vitro* **2000**, *14*, 227-234. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(00\)00018-7](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(00)00018-7).
- Wang, L. L.; Liu, T.; Wang, C.; Zhao, F. Q.; Zhang, Z. W.; Yao, H. D.; Xing, H. J.; Xu, S. W. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in the brain of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, *93*, 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.007>.
- Wang, L.; Espinoza, H. M.; MacDonald, J. W.; Bammler, T. K.; Williams, C. R.; Yeh, A.; Louie, K. W.; Marcinek, D. J.; Gallagher, E. P. Olfactory transcriptional analysis of Salmon exposed to mixtures of chlorpyrifos and malathion reveal novel molecular pathways of neurobehavioral injury. *Toxicol. Sci.* **2016**, *149*, 145-157. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv223>.
- Wang, S.; Zhang, X.; Gui, B.; Xu, X.; Su, L.; Zhao, Y. H.; Martyniuk, C. J. Comparison of modes of action between fish, cell and mitochondrial toxicity

- based on toxicity correlation, excess toxicity and QSAR for class-based compounds. *Toxicology* **2022**, *470*, 153-155. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153155>.
- Wang, Y. Q.; Li, Y. W.; Chen, Q. L.; Liu, Z. H. Long-term exposure of xenoestrogens with environmental relevant concentrations disrupted spermatogenesis of zebrafish through altering sex hormone balance, stimulating germ cell proliferation, meiosis and enhancing apoptosis. *Environ. Pollut.* **2019**, *244*, 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.079>.
- Wassing, I. E.; Graham, E.; Saayman, X.; Rampazzo, L.; Ralf, C.; Bassett, A.; Esashi, F. The RAD51 recombinase protects mitotic chromatin in human cells. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5380. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25643-y>.
- Weeks Santos, S.; Cachot, J.; Cormier, B.; Mazzella, N.; Gourves, P. Y.; Clérandeau, C.; Morin, B.; Gonzalez, P. Environmentally relevant mixture of pesticides affect mobility and DNA integrity of early life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxics* **2021**, *9*, 174.
- Welling, W.; de Vries, J. W. Bioconcentration kinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1992**, *23*, 64-75. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(92\)90022-u](https://doi.org/10.1016/0147-6513(92)90022-u).
- Wink, D. A.; Mitchell, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 434-456. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00092-6).
- Worldometer. Pesticide Use by Country, **2022**. Available at: <https://www.worldometers.info/food-agriculture/pesticides-by-country/>. Accessed 07 July 2022.
- Wu, C. F.; Chen, C. H.; Wu, C. Y.; Lin, C. S.; Su, Y. C.; Wu, C. F.; Tsai, H. P.; Fan, P. S.; Yeh, C. H.; Yang, W. C.; Chang, G. R. Quinolone and Organophosphorus Insecticide Residues in Bivalves and Their Associated Risks in Taiwan. *Molecules* **2020**, *25*, 3636. <https://doi.org/10.3390/molecules25163636>.

- Wu, H.; Wang, Y.; Ying, M. et al. Lactate dehydrogenases amplify reactive oxygen species in cancer cells in response to oxidative stimuli. *Sig Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 242. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00595-3>.
- Xia, S.; Zhao, Y. B.; Hu Yang, M. Q. J. Y. Induction of vitellogenin gene expression in medaka exposed to glyphosate and potential molecular mechanism. *Zhongguo Huanjing Kexue* **2013**, *33*, 1656.
- Xiao X, Clark JM, Park Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol.* **2017**, *105*, 456-474. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.003>.
- Yan, E. B.; Unthank, J. K.; Castillo-Melendez, M.; Miller, S. L.; Langford, S. J.; Walker, D. W. Novel method for in vivo hydroxyl radical measurement by microdialysis in fetal sheep brain in utero. *J. Appl. Physiol. (1985)* **2005**, *98*, 2304-2310. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00617.2004>.
- Yang, C.; Lim, W.; Song, G. Immunotoxicological effects of insecticides in exposed fishes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2021**, *247*, 109064. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109064>.
- Yang, C.; Lim, W.; Song, G. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *234*, 108758. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108758>.
- Yang, K. J., Lee, J., Park, H. L. Organophosphate Pesticide Exposure and Breast Cancer Risk: A Rapid Review of Human, Animal, and Cell-Based Studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2020**, *17*, 5030. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145030>.
- Yu, Y.; Wang, Q.; Huang, Z.; Ding, L.; Xu, Z. Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 567941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>.
- Zalba, S.; Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **2017**, *52*, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>.

- Želježić, D.; Žunec, S.; Bjeliš, M.; Benković, V.; Mladinić, M.; Lovaković Tariba, B.; Pavičić, I.; Marjanović Čermak, A. M.; Kašuba, V.; Milić, M.; Pizent, A.; Lucić Vrdoljak, A.; Kopjar, N. Effects of the chloro-s-triazine herbicide terbuthylazine on DNA integrity in human and mouse cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2018**, *25*, 19065-19081. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2046-7>.
- Zhang X, Zhong Y, Tian H, Wang W, Ru S. Impairment of the cortisol stress response mediated by the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to monocrotophos pesticide. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **2015**, *176-177*, 10-6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.07.003>.
- Zhang, C.; Schilirò, T.; Gea, M.; Bianchi, S.; Spinello, A.; Magistrato, A.; Gilardi, G.; Di Nardo, G. Molecular Basis for Endocrine Disruption by Pesticides Targeting Aromatase and Estrogen Receptor. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2020**, *17*, 5664. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165664>.
- Zhang, J.; Liu, L.; Ren, L.; Feng, W.; Lv, P.; Wu, W.; Yan, Y. The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *334*, 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.055>.
- Zhang, L.; Zhao, X.; Yan, S.; Zha, J.; Ma, X. The immune responses of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to environmentally relevant concentrations of cypermethrin and subsequently infected by the bacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Environ. Pollut.* **2019**, *250*, 990-997.
- Zhang, W.; Yang, X.; Chen, L.; Liu, Y. Y.; Venkatarangan, V.; Reist, L.; Hanson, P.; Xu, H.; Wang, Y.; Li, M. A conserved ubiquitin- and ESCRT-dependent pathway internalizes human lysosomal membrane proteins for degradation. *PLoS Biol.* **2021**, *19(7)*: e3001361. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001361>.

- Zhang, X.; Gao, L.; Yang, K.; Tian, H.; Wang, W.; Ru, S. Monocrotophos pesticide modulates the expression of sexual differentiation genes and causes phenotypic feminization in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *157*, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.09.004>.
- Zhao, L.; Tang, G.; Xiong, C.; Han, S.; Yang, C.; He, K.; Liu, Q.; Luo, J.; Luo, W.; Wang, Y.; Li, Z.; Yang, S. Chronic chlorpyrifos exposure induces oxidative stress, apoptosis and immune dysfunction in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Environ. Pollut.* **2021**, *282*, 117010. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117010>.
- Živković Semren T, Žunec, S., Pizent, A. Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. *Arh Hig Rada Toksikol* **2018**, *69*, 109-125. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3118>.
- Деклараційний патент на корисну модель (заявка № u202106908) МПК G01N 33/00, E03B 3/36, G01N 30/38 Спосіб оцінки ступеня пошкоджувального впливу пестицидів на водні екосистеми / Фальфушинська Г.І., Горин О.І. № 151127; опубл. 09.06.2022. Бюл. № 23.
- Луцак В., Багнюкова Т., Луцак О. Показники оксидативного стресу. 1. Тіобарбітуратні активні продукти і карбонільні групи білків. *Укр. Біохім. Журн.* **2004**, *76*(3), 136-141. <http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/journal-archiveac/2004vc/3-may-juneffg/3041-1>.