

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

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

**Вміст протеїнових фракції сироватки крові щурів за дії
екзогенних ксенобіотиків.**

Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконав:

студент 4 курсу, 400А групи

Місюра Степан Віталійович

Керівник:

к.б.н., доцент Кеца О. В.

До захисту допущено

На засіданні кафедри

Протокол № _____ від _____ 2023 р.

Зав. Кафедрою _____ проф. Копильчук Г. П.

Чернівці-2023

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена вивченню змін вмісту протеїнових фракцій сироватки крові щурів за умов введення диетилфталату (ДЕФ).

Показано, що введення препарату протягом двох тижнів спричинило збільшення фракцій альбумінів, α_1 -глобулінів та β -глобулінів. Встановлено зниження рівня α_2 -глобулінів та γ -глобулінів протягом даного періоду за дії різних доз ДЕФ на організм.

Виявлено, що тритижневе введення ДЕФ супроводжується підвищенням рівня альбумінів, α_2 -глобулінів та β -глобулінів у сироватці крові щурів за дії високих та середніх доз ксенобіотика. Водночас, знижувався рівень α_1 -глобулінів та γ -глобулінів.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Загальна характеристика білкових фракцій крові.....	6
1.2. Структура альбуміну та його функція	10
1.3. Глобуліни та їх біологічна роль.....	15
1.4. Класифікація та механізми дії фталатів.....	17
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	22
2.1. Об'єкт та методи досліджень.....	22
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
ВИСНОВКИ	33
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	37

ВСТУП

Фталати належать до хімічних сполук, які широко застосовуються в промисловості як пластифікатори, особливо у виробництві пластикових матеріалів. Ці сполуки додаються до пластикових продуктів, щоб забезпечити їх гнучкість, пружність та стійкість. Оскільки фталатні пластифікатори хімічно не зв'язані з полівінілхлоридними пластмасами, вони можуть вимиватися, мігрувати або випаровуватися в повітря та атмосферу приміщень, харчові продукти, інші матеріали тощо. Споживчі продукти, що містять фталати, можуть призводити до його впливу на людину через ковтання, вдихання та вплив на шкіру протягом усього життя, включаючи внутрішньоутробний розвиток внаслідок вимивання в інші продукти або загальне забруднення навколишнього середовища [1].

Після попадання в організм фталати швидко метаболізуються та виводяться із сечею та фекаліями. Під час біотрансформації відносно полярні та низькомолекулярні фталати, наприклад диетилфталат, переважно метаболізуються у свої гідролітичні моноєфіри шляхом гідролізу одного з складноефірних зв'язків [2].

У дослідженнях на гризунах було виявлено, що фталати мають низьку гостру токсичність, яка в основному зосереджена в печінці, нирках, тканині щитовидної залози. Також вони безпосередньо впливають на протеїнові фракції сироватки крові, змінюючи їхній рівень у крові та їх активність. Крім того, фталати можуть спричинити запалення, змінювати функцію ендотелію та впливати на зсідання крові. Це може призводити до підвищеного ризику розвитку серцево-судинних захворювань [3].

Фталати також можуть впливати на протеїнові фракції крові, які відповідають за функцію імунної системи. Деякі дослідження показують, що фталати можуть спричинити зниження рівня імуноглобулінів, що знижує здатність організму боротися з інфекціями та іншими хворобами [4].

Важливо зауважити, що ефекти фталатів на протеїнові фракції крові можуть бути залежні від конкретного типу фталату, дози, тривалості та шляху

впливу. Деякі фталати можуть бути більш токсичними, ніж інші, і їх вплив може варіюватися в залежності від особливостей кожної людини [5].

Враховуючи вище вказане метою роботи було встановити особливості змін протеїнових фракцій сироватки крові щурів за дії різних доз диетилфталату (ДЕФ). Для досягнення даної мети були поставлені такі завдання:

1. Визначити вміст альбумінів у сироватці крові щурів за умов введення різних доз ДЕФ.
2. Дослідити рівень різних фракцій глобулінів – α_1 -глобулінів, α_2 -глобулінів, β -глобулінів і γ -глобулінів у сироватці крові щурів за умов введення різних доз ДЕФ.

1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

1.1. Загальна характеристика білкових фракцій крові.

Кров – це рідка сполучна тканина організму людей та тварин, що виконує важливі функції в забезпеченні його життєдіяльності. Кров складається з рідкої частини, а саме: плазми та різноманітних формених елементів. Плазма становить від 50 до 60 відсотків складу крові. Решту складають еритроцити, лейкоцити та тромбоцити. Серед основних функцій крові слід зазначити дихальну функцію, оскільки навіть дуже короткочасне переривання цього процесу означає смерть організму [6].

Ця функція обміну кисню і вуглекислого газу між кров'ю, легенями і тканинами, в першу чергу стосується еритроцитів. В ньому плазма виступає в якості незамінного транспортного середовища, в якому еритроцити та білки плазми функціонують як буфери для підтримки стабільності рН (ступінь кислотності або лужності) організму, хоча в цьому відношенні вони відіграють набагато меншу роль, ніж гемоглобін. Обмін рідини між кров'ю і тканинами залежить від балансу між гідростатичним та осмотичним тиском, обумовленим білками плазми, які мають тенденцію відтягувати рідину з тканин назад у кров. Ця осмотична функція білків плазми значною мірою визначається сироватковим альбуміном, який через його відносно низьку молекулярну масу, сферичну форму, низьку в'язкість і його високий негативний заряд при рН крові є набагато ефективнішим за інші білки плазми для підтримки осмотичного тиску [7].

Обмін гормонами між тканинами здійснюється через кров, а плазма є їхнім основним шляхом від тканини, де вони виробляються, до інших тканин, де проявляється їхня дія. Часто, гормони присутні в крові в надзвичайно низькій концентрації і для його визначення потрібно проводити процедуру фракціонування [6].

Зменшення об'єму крові може відбуватися через втрату плазми внаслідок патогенної дії різних речовин, захворюваннях та зовнішніх пораненнях. Механізмом захисту від такої втрати є утворення тромбоцитарного згустку.

Фібриноген і тромбін беруть участь у згортанні крові й утворенні тромбу, що захищає організм від втрати крові під час поранення [8].

Переміщення речовин у крові, лімфі, між клітинами та всередині клітин здійснюють спеціальні білки-переносники. Так, гемоглобін, що знаходиться в еритроцитах, під час проходження крові через легені зв'язує кисень і передає його периферичним тканинам, де кисень звільнюється та використовується для окиснення компонентів їжі. З тканин він забирає вуглекислий газ і переносить його до легень, де останній відщеплюється і виходить з організму. Білки крові церулоплазмін та трансферин переносять до тканин відповідно мідь та залізо. Плазма крові містить ліпопротеїни, які переносять ліпіди з печінки в інші органи. Ряд речовин транспортується альбумінами крові. Деякі білки транспортують кров'ю гормони, мінеральні речовини тощо.

Альбуміни і глобуліни є поширеними у тваринному світі білками та містяться в плазмі крові, клітинах та біологічних рідинах. Білки крові, а саме, альбуміни та глобуліни за формою є глобулярними, вони мають заокруглену форму, що наближається до еліпсоїдної. За формою молекул альбуміни та глобуліни є глобулярними білками, але відрізняються за розчинністю та молекулярною масою. Альбуміни мають невелику молекулярну масу, що становить від 15 до 70 тис. дальтон, в той час у глобулінів вона може перевищувати 150 тис. дальтон.

Через наявність великої кількості глютамінової кислоти альбуміни мають некомпенсований від'ємний заряд і кислі властивості. Ці білки добре розчиняються у воді та сольових розчинах і характеризуються високою гідрофільністю та дисперсністю. Через це альбуміни випадають в осад тільки при високих концентраціях речовин, які зв'язують воду. Альбуміни виконують транспортну функцію завдяки своїй високій адсорбційній здатності, що дозволяє переносити іони металів, ліки, жирні кислоти та пігменти. Залежно від походження, розрізняють сероальбуміни, які утворюються в сироватці крові та міоальбуміни, які є основними білками м'язової тканини [9].

Глобуліни не розчиняються у воді, а тільки в слабких сольових розчинах. Вони належать до слабкокислих або нейтральних білків, які порівняно з альбумінами містять менше кислих амінокислот. Глобуліни, будучи слабогідратованими білками, випадають в осад за менших концентрацій амонію ніж альбуміни, для яких потрібне повне насичення їх сульфатом амонію.

У плазмі крові вміст білків складає від 60 до 85 г/ л. Альбумін становить 40-50 г/л, а на глобуліни - 20-35 г/л. Вони є неоднорідними за структурою й діляться на п'ять фракцій: альбумін, альфа-1глобулін, альфа-2глобулін, бета та гамма глобулін. Кожна з цих фракцій поділяється на декілька десятків підфракцій. Відносно однорідною може бути тільки альбумінова фракція, хоча вона при деяких впливах на організм може розшаровується (рис.1.1).

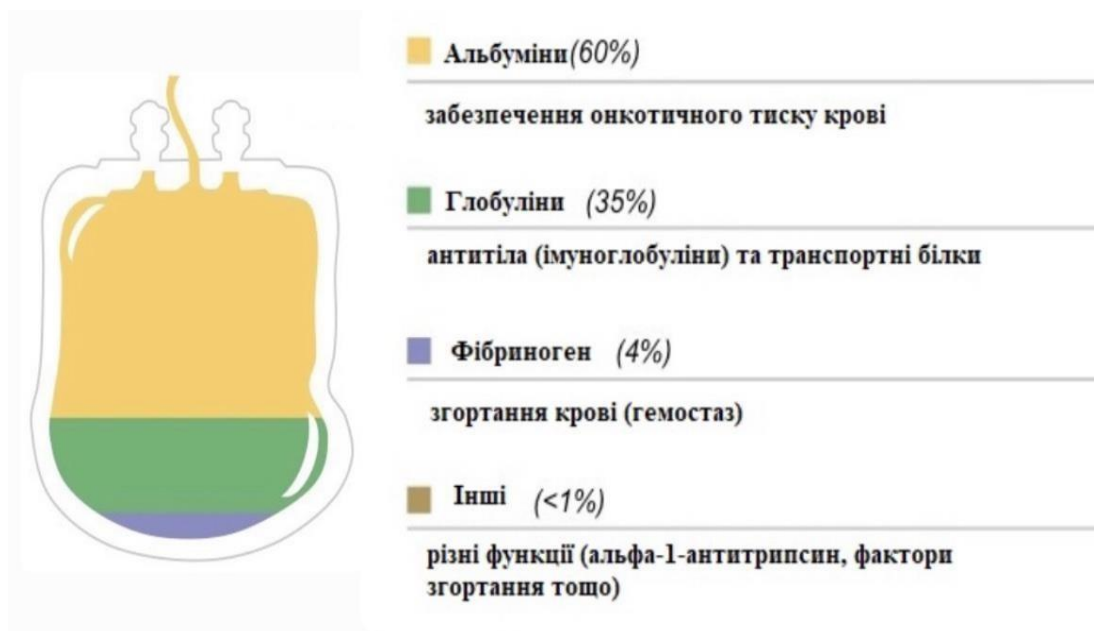


Рис. 1.1. Розподіл білків плазми крові та їх основні функції.

Зменшення вмісту білка в сироватці крові називається гіпопротеїнемією, яка викликається надходженням в організм недостатньої кількості білків внаслідок голодування, порушення травлення та всмоктування в кишечнику, порушенням синтезу білків у печінці, хронічними хворобами нирок, гострими і хронічними крововтратами.

Підвищення вмісту білків крові - гіперпротеїнемія - буває абсолютною і відносно. Відносна супроводжує втрату організмом рідини, загальна кількість білків крові залишається при цьому незмінною, хоча концентрація їх зростає. Зустрічається при профузних проносах, тривалому блюванні, нецукровому діабеті, порушенні гемодинаміки. Гіперпротеїнемія проявляється за умов підвищеного синтезу глобулінів плазми крові, внаслідок потрапляння в організм мікроорганізмів та виробленні імунітету. Порушення співвідношення між фракціями білків крові називається диспротеїнемією, яка виникає внаслідок хронічних захворювань.

Білковий коефіцієнт- це співвідношення вмісту альбумінів до глобулінів. Його зменшення відбувається через зниження кількості альбумінів, яке настає при їхній втраті через нирки внаслідок нефритів та нефрозів або за рахунок зростання глобулінів. Зростання цієї фракції спостерігається при виробленні антитіл у відповідь на попадання інфекції.

Таким чином, альбуміни і глобуліни відрізняються між собою не тільки за молекулярною масою, гетерогенністю, значенням ізоелектричної точки, але і за функціями, походженням та рядом інших властивостей [10].

Альбуміни, α -глобуліни і частково β -глобуліни за походженням є печінковими білками. В лімфатичній системі синтезується γ -глобуліни і частково β -глобуліни. Альбуміни поновлюються і руйнуються за добу. Вони підтримують колоїдно-осмотичний тиск крові, регулюють обмін води між кров'ю і тканинами за рахунок малого розміру молекул, високої гідрофільності та відносно високої концентрації. При зменшенні вмісту альбумінів нижче 130 г/л, онкотичний тиск спадає, внаслідок чого вода виходить з крові в тканини, що супроводжується набряками. За допомогою альбумінів відбувається транспортування кров'ю вуглеводів, жирних кислот, гормонів, пігментів, ліків, мінеральних речовин. Половина вмісту кальцію сироватки крові зв'язана з альбумінами. Динамічна рівновага між іонізованим та зв'язаним кальцієм крові визначається альбумінами.

Звідси, зменшення вмісту альбумінів і поєднаного з ним кальцію супроводжується підвищенням проникності мембран, зростанням збудливості

нервових і м'язових волокон та пригніченням згортання крові. Зв'язуючи токсичні речовини (ліки мінеральні речовини), що потрапили в організм, а також гормони щитовидної залози, стероїдні гормони і жовчні пігменти, альбуміни виконують детоксикаційну функцію. Разом із тим, зустрічаються окремі індивіди, в яких не виявляється альбумінів крові (стан анальбумінемії), але вони практично здорові.

Відомо також, що при деяких захворюваннях або під впливом токсичних екзогенних чинників у сироватці крові методом електрофорезу можна виявити ще одну фракцію, яка розміщується перед альбуміновою. Це так звана преальбумінова фракція, вміст якої дорівнює 0,1-0,4 г/л. Глобуліни сироватки крові у своєму складі містять ще вуглеводні або ліпідні компоненти [8].

1.2. Структура альбуміну та його функція

Сироватковий альбумін людини має масу 66 кДа та складається з 585 амінокислот. Він містить велику кількість амінокислотних залишків Cys, Leu, Glu та Lys, низьку кількість залишків Met, Gly та Ile і лише один Trp. 35 залишків Cys, присутні в HSA (людський сироватковий альбумін), утворюють 17 дисульфідних зв'язків. Cys₃₄ є єдиним неспареним амінокислотним залишком, який піддається дії тіольного розчинника. Переважання іонізованих залишків надає альбуміну високий загальний заряд, що сприяє його розчинності. Через переважання кислих амінокислот при рН 7,0 HSA має негативний заряд. Альбумін не може зберігатися в паренхіматозних клітинах через відсутність бічних вуглеводних ланцюгів. Це основний білковий компонент більшості екстраваскулярних рідин організму, таких як спинномозкова рідина, сеча, амніотична рідина та інтерстиціальна рідина.

Основною функцією сироваткового альбуміну вважається регуляція колоїдно-осмотичного тиску. До інших фізіологічних функцій належить зв'язування та транспорт молекул, а також антиоксидантна та протизапальна дія. Він має здатність зв'язувати нерозчинні речовини, такі як жирні кислоти, порфірини, гем і синтетичні речовини. Ця особливість перетворює цей білок на мішень для фотодинамічної терапії та потенційний переносник кисню [11].

HSA – це мономерний глобулярний білок, що складається з 67% α -спіралей, розташованих у трьох доменах (тобто I, II та III), що охоплюють амінокислоти 1–196, 197–383 та 384–582 відповідно. Кожен домен включає 10 спіралей, організованих у субдомени A і B, які побудовані з шести та чотирьох α -спіралей відповідно, з'єднаних довгою петлею (Рис. 1.2).

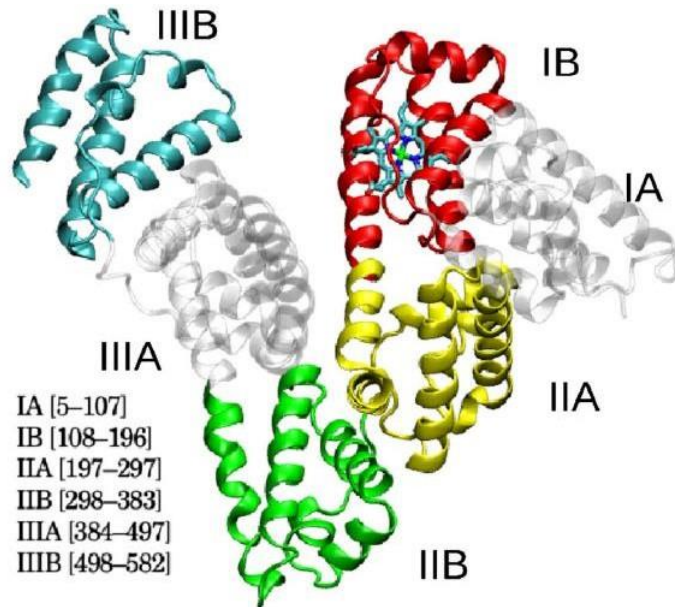


Рис 1.2. Тривимірна структура молекули альбуміну

Альбумін синтезується в гепатоцитах зі швидкістю $\sim 0,7$ мг/год на грам печінки (тобто ~ 10 – 15 г/добу), концентрація в сироватці крові коливається від 35 до 70 г/л. Швидкість синтезу залежить від онкотичного тиску крові, оскільки його концентрація визначається осморцепторами печінки. Зв'язок між субдоменами IA та IB пов'язаний із субдоменом IIA, водневими зв'язками та гідروفобними взаємодіями. Це призводить до того, що домени I і II розташовуються перпендикулярно один до одного в T-подібній формі. Домен III контактує лише з субдоменом IIB і організовується в Y-подібну конформацію з доменами II і III. Крім того, домени I і III демонструють кілька контактів, розділених субдоменами IA-IB-IIA з одного боку та субдоменами IIB-IIIА-IIIВ з іншого. Розташування доменів I-II та II-III у формі серця створює кілька сайтів, здатних зв'язувати ендогенні та екзогенні молекули.

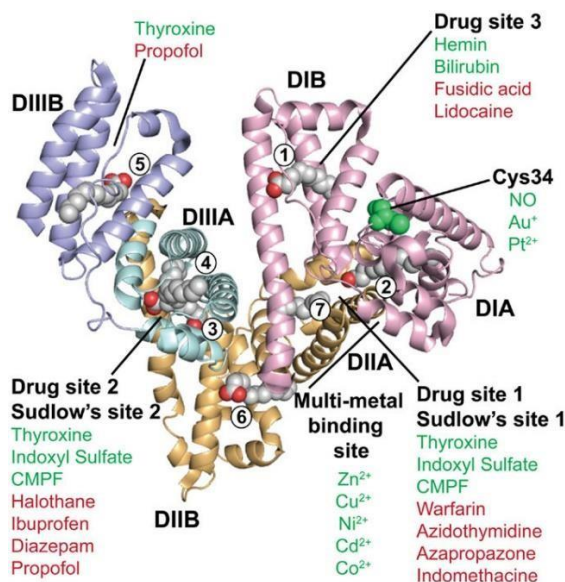


Рис 1.3. Кристалічна структура альбуміну людини

На малюнку показано кристалічну структуру людського альбуміну, розчиненого в присутності насиченої кількості пальмітинової кислоти. α -спіральні структури трьох доменів (DI, DII і DIII) розділені на субдомени (A і B). DI рожевого кольору містить сайт зв'язування жирної кислоти 1, вільний цистеїн і сайт зв'язування ліків 3. Сайт жирної кислоти 2 розташований на межі між DI та DII. Сайт зв'язування металу розташований між субдоменами DIA і DIIA. DII, який позначений помаранчевим кольором, містить сайт зв'язування ліків 1 (сайт Судлоу 1), а також сайти жирних кислот 6 і 7. DIII, позначений синім кольором, містить сайти зв'язування жирних кислот 3 і 4, сайт зв'язування ліків 2 (сайт Судлоу 2) у DIIIA, і сайт зв'язування жирної кислоти 5 у DIIIB. Приклади сайтів зв'язування для ендогенних і екзогенних лігандів, для яких було розкрито кристалічні структури, перераховані відповідно зеленим і червоним кольором (рис. 1.3).

Багато широко використовуваних препаратів із кислотними або електронегативними властивостями, наприклад: варфарин, діазепам, ібупрофен, також зв'язуються з HSA, як правило, в одному з двох первинні сайтах, розташованих в субдоменах ІІА і ІІІА [12].

Дансилова група зв'язується в ділянці 1 у субдоміні ІІА між бічними ланцюгами Ala-291 і Leu-238; . Таким чином, ця група зв'язується в такому

самому положенні та планарній орієнтації, як це спостерігається для основних ароматичних фрагментів багатьох інших лікарських засобів, таких як варфарин та азапропазон [13].

Хоча сироватковий альбумін в основному мономерний, димери, тримери та олігомери вищого порядку зустрічаються при його високих концентраціях. Димери HSA виникають при фізіологічних значеннях рН і концентрації HSA. Димери виходять із кровоносних судин у позасудинні рідини, які містять набагато нижчі рівні мономерного HSA, таким чином сприяючи дисоціації димерів і зсуву рівноваги в бік вищих рівнів мономерів порівняно з димерами.

Процес самоолігомеризації визначається нековалентними оборотними взаємодіями при низьких фізіологічних концентраціях альбуміну. Утворення нековалентних димерів і олігомерів відбувається у відповідь на високу температуру, екстремальні значення рН та інші стреси. Сайт зв'язування нековалентних димерів включає субдомен ІА, який розміщує залишок Cys34, та ІВ двох молекул HSA. Дисульфідний димер потребує молекулярної зміни мономерів, щоб наблизити залишки Cys34 достатньо близько для утворення прямого дисульфідного зв'язку. Деякі нековалентні та ковалентні димери є незворотними, нерозчинними, і майже всі демонструють зменшення α -спіралей і збільшення β -листів. У димерному HSA деякі сайти зв'язування мономерної форми недоступні для розчинників. Крім того, структурні зміни після утворення димеру можуть викликати алостеричні зміни, що впливають на зв'язування ліганду або каталітичні властивості [14].

Високі рівні димерів HSA присутні в циркулюючій крові пацієнтів із хронічним захворюванням нирок порівняно зі здоровими особами відповідного віку. Крім того, у тих самих пацієнтів також повідомлялося про концентрацію продуктів окисного відновлення в крові, що свідчить про те, що концентрація димерів HSA може бути використана як біомаркер оксидативного стресу. Крім того, при деяких захворюваннях залишок Cys34 зазнає хімічних модифікацій, що, можливо, впливає на рівновагу мономер/димер і, у свою чергу, на

поглинання та вивільнення лігандів, а також на регуляцію онкотичного тиску. [13].

Загалом, димери можуть модулювати деякі функції HSA. Рівновага мономерів та димерів чутлива до зв'язування деяких лігандів, а також до посттрансляційних або хімічних модифікацій Cys34. Таким чином, лікарський засіб, що сприяє утворенню димеру, може, у свою чергу, посилити подальше зв'язування та транспортування специфічних лігандів. У свою чергу, модуляція рівноваги мономер/димер HSA може впливати на його фізіологічні та терапевтичні функції [15].

HSA демонструє псевдо-естеразну активність по відношенню до: α - і β -нафтилацетату та *n*-нітрофенілацетату, ефірів жирних кислот з довгим і коротким ланцюгом (наприклад, *p*-нітрофенілмірилат (NphOMy), *n*-нітрофенілові ефіри гексаноату (NphOHe), деканоату (NphODE) і *n*-нітрофенілацетату (NphOAc), (iii) аспірин, (iv) кетопрофену глюкуронід, (v) циклофосфамід, (vi) ефіри нікотинової кислот, (vii) октаноїлгрелін, (viii) нітроацетанлід, (ix) нітротрифторацетанлід та (x) фосфорорганічні сполуки [16].

HSA оборотно або необоротно зв'язує глюкуронідні кон'югати, знижуючи їхні рівні в плазмі і полегшуючи їх ізомеризацію та стереоселективний гідроліз. Аналіз конкурентного зв'язування показує, що глюкуронідазна активність HSA знаходиться у сайтах Судлоу. HSA оборотно або необоротно зв'язує глюкуронідні кон'югати, знижуючи їхні рівні в плазмі і полегшуючи їх ізомеризацію та стереоселективний гідроліз. Є два основних сайти зв'язування. Перший знаходиться в ядрі субдомену ІА, а другий в субдомені ІІА. Крім цих двох сайтів, є ще п'ять сайтів з високою спорідненістю до жирних кислот. Відомі дві конформації HSA, перша відповідає знежиреному HSA, а друга - знежиреному білку. Жирні кислоти в субдомені ІА можуть сприяти досягненню проміжної конформації. [17]

HSA демонструє тіол-специфічні антиоксидантні властивості, які запобігають зниженню активності глютамінсинтетази та пероксидному

окисненню ліпідів. Альбумін відновлює H_2O_2 у присутності відновленого глутатіону, що призводить до вироблення окисненого глутатіону (рис 1.4.).

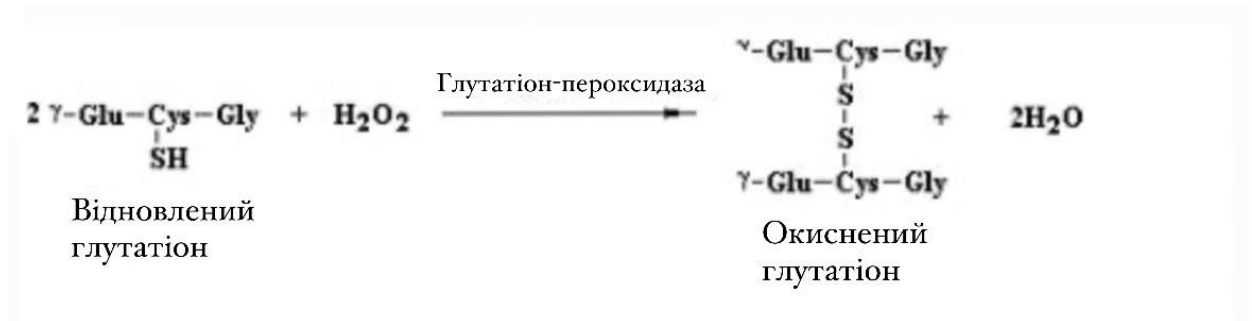


Рис 1.4. Реакція окиснення глутатіону.

Крім того, тиол-специфічні антиоксидантні властивості HSA значно активуються галогенідними іонами, особливо хлорид-іонами, і повністю скасовуються реакцією з *N*-етилмалеїмідом і йодоацетатом[12].

1.3. Глобуліни та їх біологічна роль

Глобулінова фракція включає сотні сироваткових білків, включаючи білки-носії, ферменти, комплемент та імуноглобуліни. Більшість з них синтезується в печінці, хоча імуноглобуліни синтезуються плазматичними клітинами. За допомогою електрофорезу глобуліни поділяють на чотири групи. Чотири фракції - це α_1 , α_2 , β і γ , залежно від їхньої міграційної моделі між анодом і катодом. Збільшення фракції глобулінів зазвичай є результатом збільшення імуноглобулінів, але може спостерігатися збільшення інших білків у патологічних станах, які мають характерні електрофоретичні моделі. Недоїдання і вроджена імунна недостатність можуть викликати зниження загальних глобулінів через зниження синтезу, та нефротичний синдром може викликати зниження через втрату білка через нирки [18].

α -глобуліни є одним з найпоширеніших підкласів глобулінів у плазмі крові. Вони виконують різні функції, зокрема транспортують різні речовини, такі як гормони та ліпіди, по кровоносній системі. Крім того, деякі альфа-глобуліни

можуть мати протизапальні властивості та брати участь у регуляції імунної відповіді організму.

β -глобуліни також виконують різні функції, включаючи транспорт заліза та імунну відповідь. Наприклад, глобулін трансферин є основним бета-глобуліном, який здатний зв'язувати залізо, транспортувати його до органів і тканин, регулювати засвоєння заліза та захищати організм від його токсичної дії. (Рис. 1.5). При залізодефіцитній анемії рівень трансферину підвищується, а в разі виникнення злоякісних пухлин або запалень – знижується.[19]

До складу молекули γ -глобулінів входить 18 амінокислот, левову частку яких становлять оксіамінокислоти, дикарбонові амінокислоти, глутамін, аспарагін, треонін, серин і валін. γ -глобуліни та імуноглобуліни різних класів відрізняються за вмістом амінокислот, які входять до їхнього складу. γ -Глобуліни, які розчиняються за умов низької іонної сили, називаються псевдоглобулінами, а ті, що є стійкими до цих умов та випадають в осад, – еуглобулінами. γ -глобуліни імунної сироватки мають здатність з'єднуватися зі специфічним антигеном, та відрізняються від звичайної значеннями константи седиментації, більшою в'язкістю та стійкістю до протеолізу. γ -Глобуліни беруть участь в імунних реакціях як фракція імуноглобулінів. Імуноглобуліни – це білки плазми, які синтезуються В-лімфоцитами у відповідь на потрапляння в кров та інші тканини білків інших видів, бактеріальних або вірусних збудників та токсинів. Антитіла нейтралізують їх або зв'язуються з ними, в результаті чого утворюється осад. Токсичні речовини розкладаються у лізосомах за допомогою їхніх ферментів, які виробляють активні форми кисню, за допомогою яких руйнують мембрани мікроорганізмів.

Імуноглобуліни становлять 15–20 % білків плазми. Кожна молекула імуноглобуліну складається з двох важких ланцюгів і двох легких ланцюгів. Кожен важкий ланцюг має варіабельну ділянку і константну ділянку. Різні типи імуноглобулінів позначаються великими літерами, які відповідають типу важкого ланцюга: IgG, IgA, IgM, IgE та IgD. Більшість

імуноглобулінів у нормальній сироватці є IgG, які є антитілами до бактерій і вірусів [18].

Отже, глобуліни- це білки крові, які виробляються печінкою та імунною системою у відповідь на подразники.

1.4. Класифікація та механізми дії фталатів.

До численних факторів, що впливають на здоров'я людини є забруднення хімічними речовинами. До числа цих забруднювачів належать ксенобіотики, які надходять в організм та є чужорідними для нього, а саме, не використовуються для побудови клітин і тканин, або для вироблення енергії. До цих речовин відносяться лікарські препарати, пестициди, промислові отрути, відходи виробництв, харчові добавки та косметичні засоби. Ксенобіотики поділяються на біологічні, хімічні та фізичні. До ксенобіотиків біологічного походження належать бактерії та віруси. Хімічні включають в себе різноманітні речовини і сполуки які є нетиповими для живих організмів. Фізичними ксенобіотками є шум, вібрація, радіація або випромінювання. Ксенобіотики хімічного походження є стійкими в навколишньому середовищі та здатні накопичуватися в різноманітних природних об'єктах, а потім потрапляти з їжею в організм [20].

До їхнього числа відносяться фталати - сполуки синтетичного походження, які найчастіше використовують як добавки до різних пластмас з метою поліпшення їх механічних властивостей, особливо м'якості, гнучкості та розтяжності. Як добавки для пластифікації вони присутні в численних продуктах загального користування, таких як: дитячі іграшки, косметика, упаковки харчових продуктів, декоративні вироби, медичні пристрої та засоби для переливання крові, Також даний токсин виявлено у нелегальних алкогольних напоях, де він використовується для денатурації етанолу. Завдяки тому, що вони хімічно не зв'язані з пластиком, фталати легко вимиваються, швидко випаровуються в повітря і легко мігрують у їжу, напої та питну воду, найчастіше з пакувального матеріалу, але можливі й інші джерела забруднення фталатами, наприклад, викиди виробництв. Як промислові хімікати, ефіри фталевої кислоти

стали повсюдними забруднювачами навколишнього середовища через їх широке використання. Через потенційну небезпеку для здоров'я людини та навколишнього середовища кілька міжнародних організацій із захисту здоров'я та навколишнього середовища віднесли кілька фталатів до групи пріоритетних забруднюючих речовин [21].

Фталати - це складні ефіри фталевої кислоти, які легко мігрують у навколишнє середовище. Ті, що мають у своїй структурі короткі алкільні групи, наприклад метильні та бутильні групи, мають властивість розчинятися у воді, а фталати з довгими алкільними або ароматичними структурами в бічних ланцюгах погано розчиняються у воді. Діетилгексилфталат (DEHP) відносно нерозчинний у воді, як і інші довголанцюгові фталатові ефіри. Завдяки ліпофільній властивості, найвищий вміст фталатів виявлено в жирній їжі, такій як: молоко та молочні продукти, риба, м'ясо та рослинні олії. Вони згубно впливають на нервову та ендокринну систему, сприяють утворенню пухлин, застою у фертильності та порушенням у розвитку дитини. Вони діють на організм людини, як гормональні руйнівники, а це означає, що вони порушують баланс гормонів, і, в підсумку, викликають зростаючу фемінізацію чоловіків та навіть зниження типової чоловічої поведінки у хлопчиків. Фталати спричиняють різні вади розвитку тканини яєчок і знижують фертильність у чоловічої популяції, а також було встановлено зв'язок із збільшенням аногенітальної відстані у дітей чоловічої статі, які зазнали впливу фталатів під час вагітності матері. Внаслідок людської діяльності, фталати потрапляють у навколишнє середовище, де вони піддаються біодеградації, фотодеградації та анаеробній деградації. Це означає, що вони не зберігаються довго в навколишньому середовищі [22].

Фталати потрапляють в організм шляхом ковтання, вдихання та через шкіру протягом життя, а також під час внутрішньоутробного життя. Використання дитячого лосьйону для тіла, дитячої присипки та дитячого шампуню було пов'язано з підвищенням концентрації фталатів, зокрема їх метаболітів (моноетилфталат – МЕР, монометилфталат – ММР, моно-

ізобутилфталат – МІВР) у сечі дітей. Однак, кількість наявних фталатів у тканинах, відібраних для досліджень, може бути неточною, через можливе зараження біологічного матеріалу під час його обробки в лабораторії, внаслідок контактування з пластмасовими приладами або ємкостями .

Фталати швидко метаболізуються в організмі людини вже на першій фазі біотрансформації до моноефірів, вони можуть метаболізуватися до окислювальних сполук ліпофільної частини ланцюга. Моноефіри та окислювальні метаболіти фталатів у другій фазі біотрансформації можуть бути кон'юговані з глюкуронідом, і обидва, вільний моноефір та кон'югований, можуть виводитися з сечею або калом (Рис. 1.5).

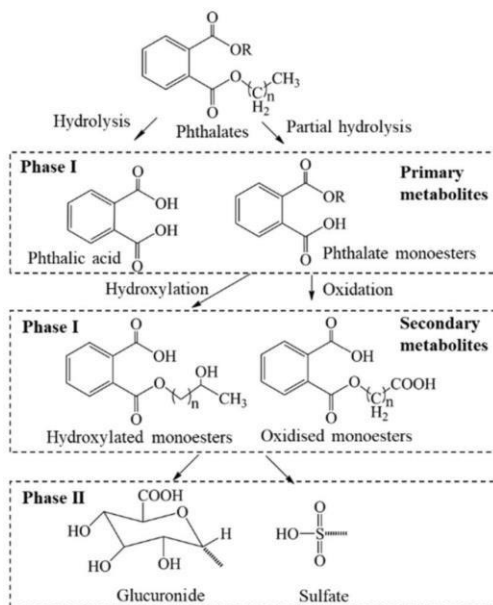


Рис. 1.5. Метаболічні шляхи фталатних естерів в організмі людини.

Менше 10 % початкової дози ДЕНР виводиться із сечею у вигляді моноефіру (МЕНР), а решта виводиться у вигляді вторинного окисленого метаболіту. Усі ці метаболіти можуть бути виявлені в сечі та сироватці крові у вигляді вторинних метаболітів ДЕНР. Однак окислювальні метаболіти ДЕНР не були виявлені в навколишньому середовищі або в полівінілхлоридних мішках, але враховуючи, що вони були визначені в сечі людини, вони, безумовно, є придатними біомаркерами для моніторингу впливу на населення ефірів фталатів, а також для можливого дослідження токсикологічного ризику для репродукції людини.

Діетилфталат отримують реакцією фталевого ангідриду з етанолом у присутності каталітичної кількості концентрованої сірчаної кислоти. (Рис. 1.6)

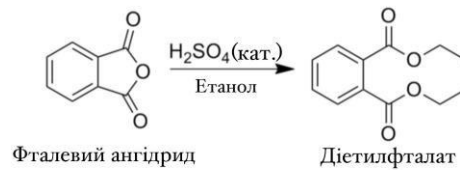


Рис. 1.6. Синтез діетилфталату.

DEP в основному використовується в продуктах особистої гігієни, таких як дезодоранти, ароматизатори після гоління, шампуні, засоби для укладання волосся, догляду за шкірою та нігтями. Завдяки своєму використанню в даних продуктах, часто відбувається шкірний контакт, і призводить до проникнення в організм токсинів[21].

Основними метаболітами діетилфталату у щурів є моноетилфталат та фталева кислота.

Моноетилфталат метаболізується шляхом глюкуронідації. Це ферментативна реакція, що каталізується UDP-глюкуронозинтрансферазами у різних тварин, включаючи людей. Процес глюкуронізації приєднує глюкуронідну частину до субстрату, утворюючи високогідрофільний продукт. Потім глюкуроніди часто виводяться з жовчю або сечею (Рис. 1.7) [23].

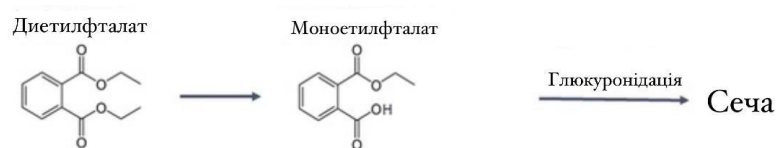


Рис.1.7. Метаболізм діетилфталату.

В деяких дослідженнях розкривається вплив фталатів на розвиток ішемічної хвороби серця у літніх людей. До факторів ризику виникнення серцево-судинних захворювань належить вплив різноманітних фталатних метаболітів. Після збільшення концентрації цих метаболітів ризик виникнення ішемічної хвороби серця зростає. Також було досліджено взаємозв'язок між циркулюючими рівнями метаболітів фталатів і атеросклерозом. Рівень враження фталатами був пов'язаний з наявністю або відсутністю виражених

атеросклеротичних бляшок, рівнем метаболітів фталату в сечі та ехогенністю судинних бляшок, що свідчить про роль хімічних речовин, пов'язаних із бляшками, в атеросклерозі.

Виявлено потенційний вплив на скорочувальну здатність серцевого м'яза людини. Метаболіти проявляють негативний інотропний ефект на передсердя людини. Високий рівень фталатного метаболіту у сироватці може мати кардіотоксичну дію на людей. Проте, його швидкий метаболізм мінімізує ймовірність виникнення негативного інотропного ефекту. У дітей і вагітних жінок ураження фталатами призводило до підвищення артеріального тиску та виникнення ендометріозу.

DEP має значний негативний вплив на мишей, і може спричинити пригнічення центральної нервової системи та явне ураження нирок.

Природними шляхами розпаду DEP є переважно гідроліз, фоторозпад і мікробна деградація. Процес гідролізу здебільшого зустрічається у водному середовищі і не може повністю мінералізувати DEP. Фоторозпад відбувається дуже повільно, а період напіврозпаду коливається від кількох років до кількох сотень років. В даний час біодеградація вважається основним шляхом метаболічного руйнування DEP, оскільки він може повністю мінералізувати DEP у середовищі за короткий час[24].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт та методи досліджень

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою тіла 90-120г, які знаходились на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води, по 6 тварин в клітці. Всі маніпуляції над тваринами здійснювали згідно міжнародно-правових стандартів проведення експериментів із тваринами, а саме: “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових інших цілей” (18 березня 1986 р., м. Страсбург) та “Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», схвалених Першим національним конгресом з біоетики (20 вересня 2001 р., м. Київ).

Тварин розділили на 3 групи:

- I група — Інтактні тварини, які вважалися контрольною групою (К).

Цим тваринам препарат не вводився.

- II група — тварини, яким вводили препарат Діетилфталат у дозі 2,5 міліграм на кілограм маси тіла тварин.

- III група — тварини, яким вводили препарат Діетилфталат у дозі 5,4 міліграм на кілограм маси тіла тварин.

Введення препарату здійснювали протягом 21-ї доби. Евтаназію тварин проводили на 14-у та 21-у добу після початку введення препарату під легким ефірним наркозом, для чого тварин поміщали у замкнений простір. На кожну добу відбирали по 6 тварин з кожної групи.

Відбір крові та виділення білкових фракцій

Кров у тварин відбирали натще з сонної артерії у завчасно пронумеровані стерильні пробірки, які не містили антикоагулянтів. Відбір проводили стерильними інструментами. Для евтаназії тварин, що вийшли з експерименту була відведена спеціальна кімната, обладнана відповідно її призначенню і забезпечена водопроводом. Труп тварин здавали утильзаводу у водонепроникних металевих ящиках з обов'язковим оформленням відповідно

документації. Після відбору крові у пробірки їх центрифугували з частотою 1000 об/хв. протягом 15 хвилин. При цьому формені елементи осідають, а зверху залишається жовтого кольору плазма. Для отримання сироватки процентрифуговані пробірки поміщають у штатив та витримують 15-20 хвилин на холоді. Після проведення процедури, виділену плазму обережно відбирали в еппендорфи автоматичною піпеткою, використовуючи нові стерильні носици для кожного зразка. Відбір проводився точно, щоб запобігти потраплянню в носик осілих формених елементів крові. Проводили визначення білкових фракцій у плазмі крові.

Визначення білкових фракцій

Визначення співвідношення білкових фракцій сироватки крові проводилось за допомогою набору фосфатних буферів, виготовлених українською компанією “Філісіт- Діагностика”. Всі розчини готові до роботи.

До складу набору входить:

1. Основний фосфатний буфер «О» - 3,347 М, рН (6,5 ± 0,1)
2. Фосфатний буфер №1 - 3,084 М, рН (6,5 ± 0,1)
3. Фосфатний буфер №2 - 2,496 М, рН (6,5 ± 0,1)
4. Фосфатний буфер №3 - 2,359 М, рН (6,5 ± 0,1)
5. Фосфатний буфер №4 - 1,959 М, рН (6,5 ± 0,1)
6. Фосфатний буфер №5 - 1,622 М, рН (6,5 ± 0,1)

Принцип методу заснований на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують різні білкові фракції сироватки крові з утворенням дуже дрібної суспензії. За ступенем каламутності розчинів роблять висновок про співвідношення білків у дослідному матеріалі.

Для цього у штатив потрібно помістити 7 пробірок ємністю 10 мл., для кожної проби. Пробірки позначали цифрами “0”-“6”. У “0” пробірку додаємо 2,5 мл дистильованої води, а в пробірки “5”-“1” - по 5 мл відповідних Фосфатних буферів (N5 - N1). У “6”-у пробірку вносять 3,75 мл розчину Основного фосфатного буферу «О», 0,75 мл дистильованої води, ретельно перемішують і

потім додають 0,5 мл сироватки. Вміст пробірки змішують 5-6-кратним перевертанням її, уникаючи утворення при цьому бульбашок повітря.

Потім у "0" - "5"-у пробірки переносять по 0,5 мл отриманої суміші. Перед додаванням у кожен пробірку, суміш в пробірці «б» ще раз ретельно перемішують, від цього залежить точність вимірювань. Вміст кожної пробірки обережно перемішують і через 15 хв вимірюють оптичну щільність - розчинів (E1 - E5) з пробірок "1" - "5" проти розчину з пробірки "0" на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 640 нм. в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм. Перед вимірюванням вміст пробірок необхідно ще раз ретельно перемішати, обережно піднімаючи з дна осад [25].

Розрахунок

1. Обчислюють показник оптичної щільності (E) альбумінів. Для цього з показника (E1) "1-ї" проби віднімають показник (E2) "2-ї" проби.

2. Обчислюють показник оптичної щільності (E) α 1-глобулінів. Для цього з показника (E2) "2-ї" проби віднімають показник (E3) "3-ї" проби.

3. Обчислюють показник оптичної щільності (E) α 2-глобулінів. Для цього з показника (E3) "3-ї" проби віднімають показник (E4) "4-ї" проби.

4 Обчислюють показник оптичної щільності (E) β -глобулінів. Для цього з показника (E4) "4-ї" проби віднімають показник (E5) "5-ї" проби.

5. Показник (E5) "5-ї" проби є показником (E5) γ -глобулінів

6. Обчислюємо співвідношення кожної фракції у відносних або в абсолютних відсотках.

Приклад розрахунку: для простоти розрахунку отримані значення оптичних щільностей множимо на 100, одержуємо (E) "1-ї" проби - 78, (E) "2-ї" - 35, (E) "3-ї" - 30, (E) "4-ї" - 24, (E) "5-ї" - 13.

Обчислюємо фракцію альбумінів $78 - 35 = 43$, глобулінів: α 1 $35 - 30 = 5$, α 2 $30 - 24 = 6$, β $24 - 13 = 11$, $\gamma = 13$. Отриману суму фракцій $43 + 5 + 6 + 11 + 13 = 78$ приймаємо за 100 %, 43 - за X %, тоді $X = (100 \times 43) / 78 = 55,1$ % альбумінів.

Для вираження результату в абсолютних відсотках суму фракцій приймаємо за концентрацію загального білку в г %, визначеного Біуретовим методом, тоді вміст кожної фракції буде відповідати її концентрації в г %.

Визначення вмісту загального білка проводили за методом Лоурі [26].

Статистична обробка результатів

Для аналізу цифрового матеріалу експериментальних біохімічних досліджень проводили математичну обробку, що дало можливість оцінити достовірність результатів. Статистична обробка одержаних результатів здійснювалася на основі t-критерію Ст'юдента, використовуючи програму MicrosoftExcel.

За допомогою "Таблиці Т", запропонованої Ст'юdentом визначали імовірність можливої похибки в оцінці експериментальних результатів. Достовірними в біохімії, як правило, вважаються значення, для яких $P \leq 0,05$. Під час користування таблицею стандартних значень критерію Ст'юдента розраховували число ступенів свободи n' за формулою:

$$n' = n_1 + n_2 - 2,$$

де n_1 і n_2 кількість варіантів у рядах.

У таблиці стандартних значень критерію Ст'юдента в першому горизонтальному ряді наведені значення P , а в першому вертикальному ряді – значення n' . Цифри інших вертикальних рядів таблиці означають значення показника T . Вірогідною вважали різницю, якщо $P = < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток патологічних процесів у організмі може бути причиною зміни співвідношення кількості різних фракцій білків в сироватці крові між собою. ДЕФ є біологічно активною речовиною, яка швидко метаболізується до моноефірних метаболітів у печінці. Це може призводити до порушення синтезу клітинами печінки та тканинними макрофагами білків плазми крові у відповідь на дію введеного ксенобіотика [30].

Результати проведених досліджень показали, що введення ДЕФ піддослідним щурам в дозі 2,5 мг/кг маси тіла протягом 14-и діб не призводило до статистично достовірної різниці вмісту альбумінів у сироватці крові порівняно з показниками контролю (рис. 3.1). Водночас, введення протягом цього періоду ксенобіотичного засобу в дозі 5,4 мг/кг призводило до підвищення вмісту альбумінів у сироватці крові у 1,2 рази порівняно із показниками інтактних тварин (рис. 3.1). З виявлених результатів випливає, що застосування ДЕФ у дозі 2,4 мг/кг протягом двох тижнів є малотоксичним на організм. Тоді як застосування високих доз досліджуваного ксенобіотика вже на 14-у добу показує його негативний вплив на організм.

Аналіз результатів показав, що подальше введення досліджуваних доз препарату на 21-у добу призводило до більш суттєвого підвищення вмісту альбумінів у сироватці крові. Так, введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг сприяло підвищенню вмісту альбумінів у сироватці крові в 1,4 рази, а введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг – у 2,1 рази (рис. 3.1). Імовірно, в результаті тривалої дії ксенобіотика на організм піддослідних тварин спостерігалася його токсична дія, що сприяло посиленому виділенню води та розвитку гіперальбумінемії. Причиною гіперальбумінемії переважно є втрата рідини, внаслідок чого вироблення та концентрація усіх білків крові в організмі збільшується, а об'єм плазми зменшується. Це явище зумовлено розвитком гемоконцентрації [31].

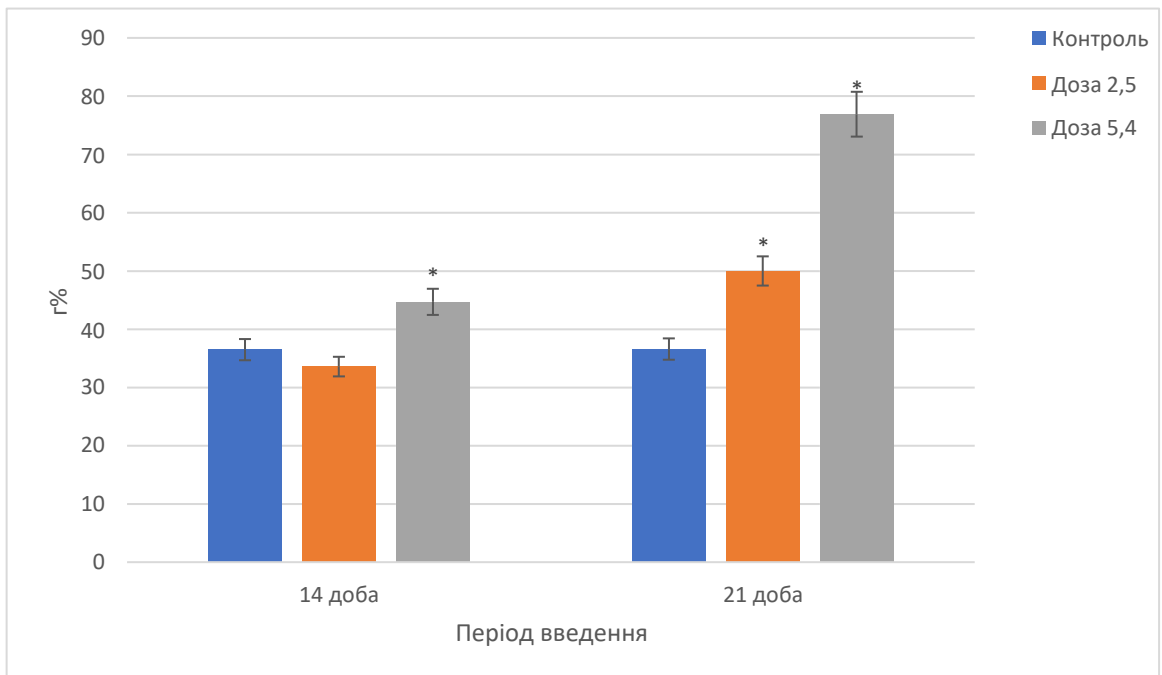


Рис.3.1. Вміст альбумінів у сироватці крові після введення диетилфталату

*Примітка (тут і надалі): * - статистично достовірна різниця порівняно з показниками інтактних тварин (контролю), $p \leq 0,05$.*

Іншими білковими фракціями крові, крім альбумінів, є глобуліни, основна частина з яких відноситься до білків гострої фази. Відомо, що глобулінова фракція крові містить α -, β - та γ -глобуліни. α -Глобуліни виконують транспортні та захисні функції. Розрізняють дві фракції даних білків, а саме α_1 -глобуліни та α_2 -глобуліни.

Результати визначення рівня α_1 -глобулінів у сироватці крові показали їх підвищення на 14-у добу введення диетилфталату в організм *per os*. Встановлено, що за дії ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг рівень α_1 -глобулінів підвищується у 1,2 рази, а за дії дози 5,4 мг/кг – в 1,5 рази (рис. 3.2). Підвищення вмісту білків α_1 -глобулінової фракції у сироватці крові може вказувати на порушення функціонування внутрішніх органів, зокрема про розвиток гострих запальних процесів оскільки ураження препаратом спричиняє процеси розпаду тканин організму та інтенсивний поділ клітин. Збільшення вмісту α_1 -глобулінів свідчить про інтенсивність реакції організму на запальні процеси, особливо в гострих стадіях. Білки гострої фази індукуються білковими гормонами та гормоноподібними

речовинами, а саме, цитокинами та діють як месенджери між локальним місцем пошкодження та гепатоцитами [32].

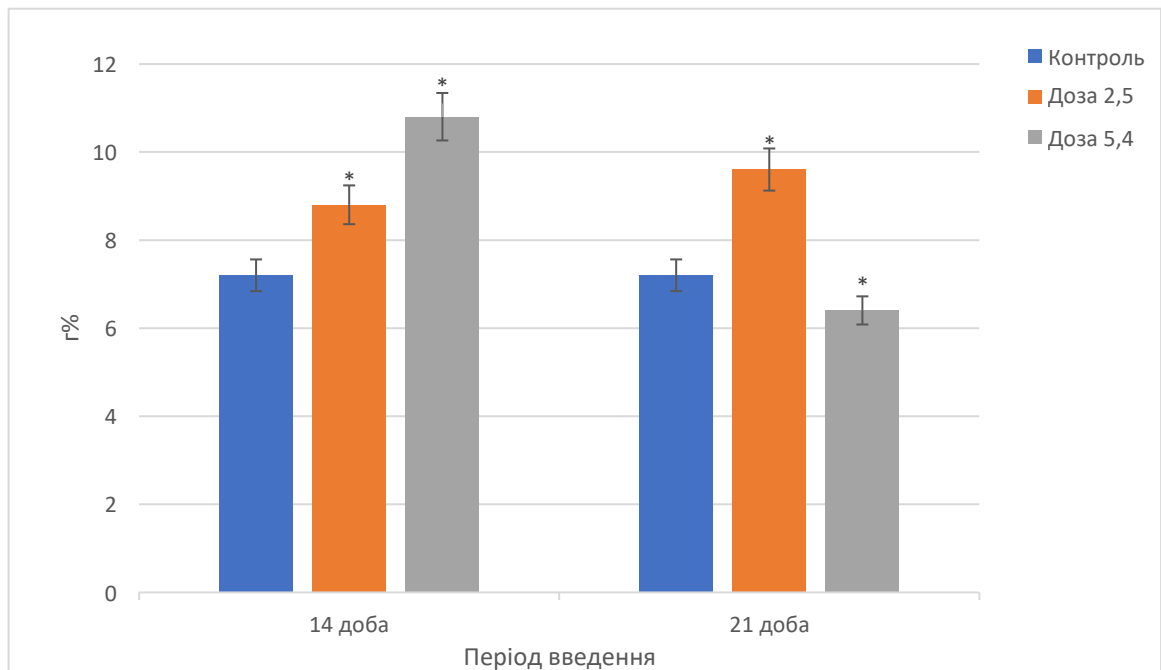


Рис.3.2. Вміст α_1 -глобулінів у сироватці крові після введення диетилфталату

Тритижневе введення ДЕФ показало різноспрямованість рівня α_1 -глобулінів у сироватці крові за дії різних доз досліджуваного ксенобіотику. Так, якщо за введення нижчих доз ДЕФ (2,5 мг/кг) спостерігалось підвищення α_1 -глобуліну в сироватці крові у 1,3 рази порівняно з показниками контролю, то за введення високих доз ДЕФ (5,4 мг/кг) спостерігалось зниження рівня досліджуваних глобулінів (рис. 3.2). Зниження α_1 -глобулінів за тривалої дії високих доз ДЕФ може бути пов'язано із порушенням ферментативних систем організму. Зниження даної білкової фракції спостерігається при нестачі α_1 -антитрипсину та α_1 -ліпопротеїнемії. Також при патології нирок дана фракція виділяється із сечею через свою високу гідрофільність.

Поряд із α_1 -глобулінами важливе значення має фракція α_2 -глобулінів, що також виконують захисну функцію.

Аналізуючи результати дослідження рівня α_2 -глобулінів, встановлено, що при введенні ДЕФ у дозах 2,5 мг/кг та 5,4 мг/кг протягом двох тижнів рівень даної

фракції поступово знижується у 1,6 разів та у 1,9 разів порівняно з показниками контролю, відповідно (рис. 3.3). Це може свідчити про розвиток гострих паренхіматозних змін у печінці, що супроводжується розпадом клітин печінки та її дестрофією за дії ДЕФ, оскільки даний ксенобіотик в першу чергу метаболізується у печінці.

Протягом тритижневого введення препарату спостерігалось незначне підвищення даної фракції відносно контрольної групи (рис. 3.3.) Причиною цього може бути збільшення рівня α_2 -макроглобуліну у відповідь на розвиток фіброзних процесів у печінці та нефротичного синдрому. При нефротичному синдромі підвищення рівня α_2 -макроглобуліну відбувається внаслідок зниження об'єму плазми та зниження онкотичного тиску, що призводить до виведення більш низькомолекулярних білків із сечею. Також це свідчить про підвищення гаптоглобіну, який блокує виведення вільного гемоглобіну з організму із сечею [33].

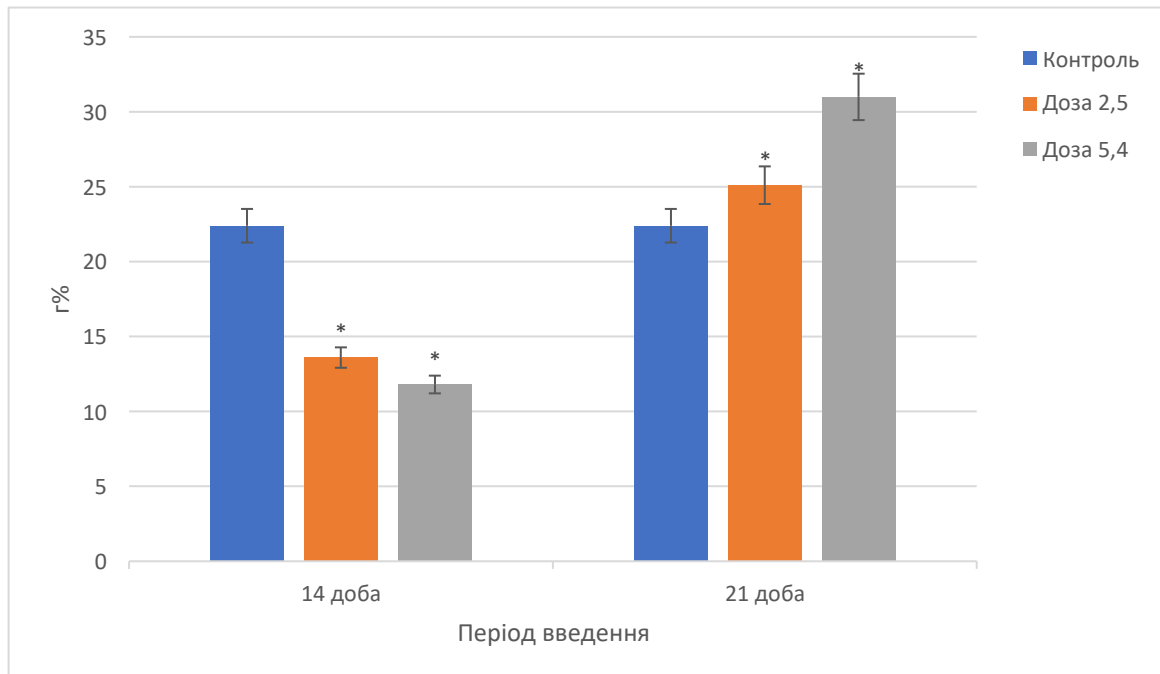


Рис.3.3. Вміст α_2 -глобулінів у сироватці крові після введення диетилфталату

До глобулінової фракції також належать β -глобуліни, що беруть участь у транспорті ліпідів, вільного та гемового заліза. Основною складовою β -глобулінів є β -ліпопротеїни та трансферин.

Встановлено, що рівень білків фракції β -глобулінів після 14 днів введення препарату залишається відносно стабільним за дії ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг та призводить до незначного їх підвищення за дії ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг – у 1,3 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин. На 21-у добу експерименту показник β -глобулінів, виділених з плазми крові щурів, уражених дозою 2,5 мг/кг, підвищується у 1,3 рази. При застосуванні дози 5,4 мг/кг спостерігалось більш суттєве підвищення рівня досліджуваних білків у сироватці крові (в 2,5 рази) порівняно з показниками групи інтактних тварин (рис. 3.4).

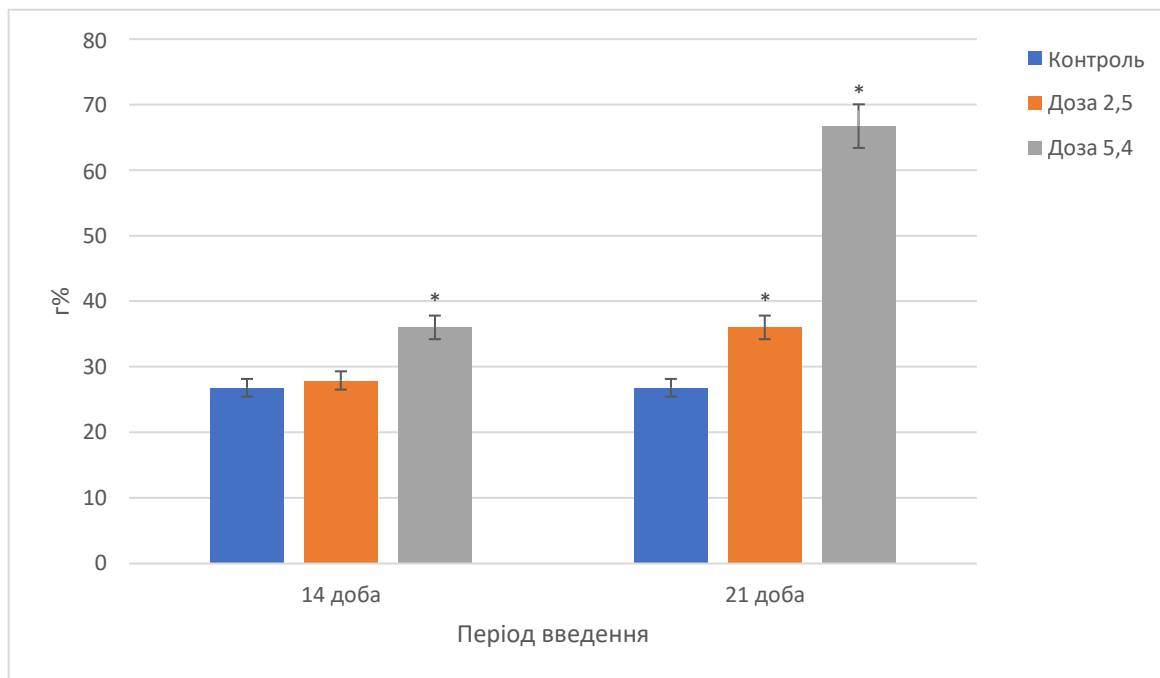


Рис.3.4. Вміст β -глобулінів у сироватці крові після введення диетилфталату.

Підвищення β -глобулінів спричинене системним запаленням, яке викликає дія токсину. Основні білки, що мігрують у β_2 -глобуліновому регіоні, включають комплемент та імуноглобуліни. Зв'язування антитіл з патогенами, що вторглися, залучає різні типи білих кров'яних тілець і систему білків крові, що і називають комплементом. У відповідь на подразник кістковий мозок починає виробляти плазматичні клітини, які у свою чергу виробляють імуноглобуліни, що і є причиною підвищення показників β -глобулінів. Через рецептор В-клітин вони розпізнають антиген на поверхні збудника, шляхом прямого зв'язування вони здатні нейтралізувати чужорідний матеріал і запобігти його негативному

впливу на організм. До причин підвищення цієї фракції відноситься розвиток залізодифіцитної анемії, що супроводжується підвищенням трансферину в сироватці крові, очевидно, пов'язане із посиленням синтезом його в гепатоцитах для забезпечення насичення кров'яним пігментом еритроцитів (рис. 3.4) [31].

Дослідження рівня білків іншої фракції – γ -глобулінів показало, що введення дози ДЕФ 2,5 мг/кг призводить до їхнього підвищення у 1,5 рази в сироватці крові на 14-у добу експерименту порівняно з контролем з подальшим їх зниженням на 21-у добу експерименту (рис. 3.5).

У γ -глобулінову фракцію білків входять різні антитіла, які захищають організм від інфекційних агентів (бактерій та вірусів), а також від різних чужорідних речовин. Такі зміни, очевидно, є показником підвищення резистентності організму піддослідних тварин до дії на них фталату та виробленням білка. Ці зміни викликають вироблення імуноглобулінів, які є антитілами, що виводять патогенні речовини з крові.

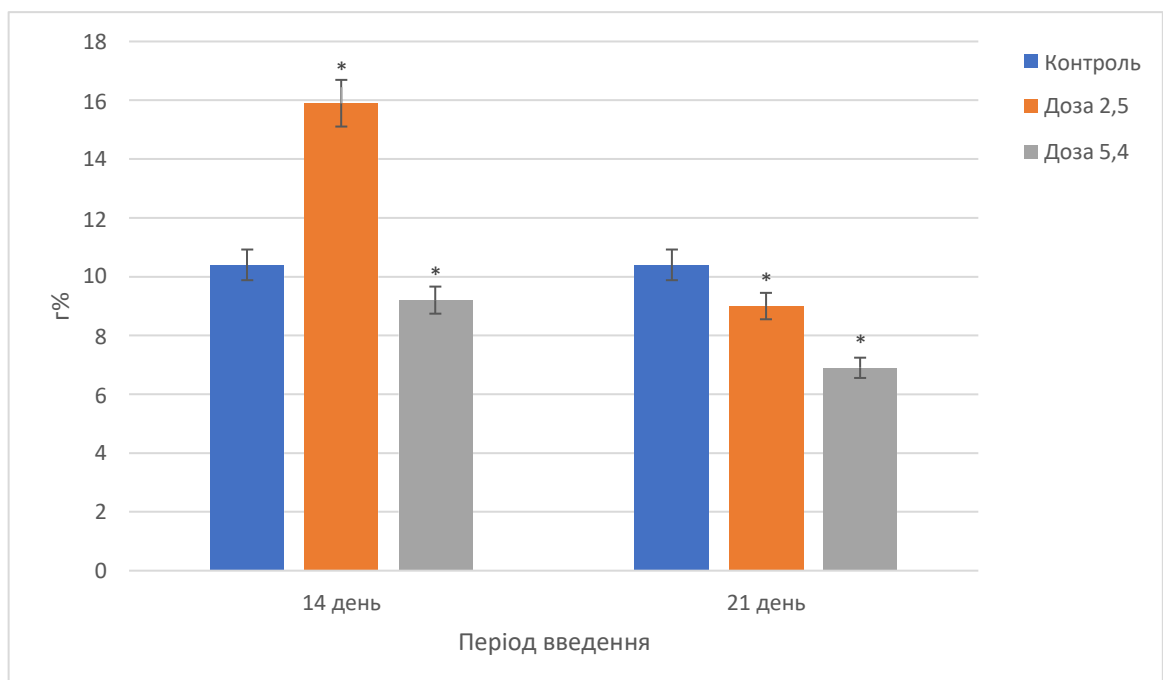


Рис.3.5. Вміст γ -глобулінів у сироватці крові після введення диетилфталату.

Введення вищих доз досліджуваного ксенобіотика (5,4 мг /кг) призводило до незначного зниження рівня γ -глобулінів у сироватці крові на 14-у добу

експерименту, та до зниження – у 1,5 рази на 21 добу експерименту порівняно з контрольними показниками. Зниження γ -глобулінової фракції в сироватці крові на 21-й день експерименту може бути наслідком зниження імунорезистентності та частковим припиненням вироблення IgG, IgA, IgM, IgE внаслідок виснаження імунної системи.

Отже, введення препарату протягом двох тижнів спричинило збільшення фракцій альбумінів, α_1 -глобулінів та β -глобулінів. Рівень α_2 -глобулінів та γ -глобулінів протягом даного періоду знижувався. Тритижневе введення ДЕФ призвело до підвищення альбумінів, α_2 -глобулінів та β -глобулінів. Вміст α_1 -глобулінів та γ -глобулінів знизився.

ВИСНОВКИ

1. Після двотижневого введення ДЕФ рівень α_1 -глобулінів підвищується при застосуванні обох досліджуваних доз. Після тритижневого введення ДЕФ виявлено різноспрямованість дії різних доз ксенобіотика, оскільки при введенні дози 2,5 мг/кг концентрація α_1 -глобулінів залишається на високому рівні, а при введенні дози вище 5 мг/кг виявлено зниження рівня α_1 -глобулінів.

2. Найбільше підвищення вмісту α_2 -глобулінової фракції спостерігається на 21-у добу введення ксенобіотика з максимальними значеннями при введенні високих доз ДЕФ.

3. По мірі збільшення терміну введення ДЕФ рівень білків β -глобулінової фракції підвищується.

4. При тривалому введенні ДЕФ рівень γ -глобулінової фракції знижується з найнижчими показниками при введенні високих доз ксенобіотика, що може бути пов'язано зі зниженням імунорезистентності та частковим припиненням вироблення імуноглобулінів, які належать до цієї фракції.