

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

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

**АКТИВНІСТЬ КОМПОНЕНТІВ МІКРОСОМНОЇ ЦИТОХРОМ Р450-
ГІДРОКСИЛЮЮЧОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ
ДИЕТИЛФТАЛАТУ**

**Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)**

Виконала:

студентка 6 курсу, 600 М групи

Банарь Ірина Вікторівна

Керівник:

к.б.н., доцент Кеца О. В.

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри

протокол № _____ від „_____” _____ 2024 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню активностей компонентів редуказного та оксигеназного ланцюгів монооксигеназної системи в мікросомній фракції печінки щурів за дії на організм різних доз та термінів введення диетилфталату (ДЕФ).

Встановлено, що двотижневе введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тварин не призводило до змін активності флавоензимів та вмісту гемопротеїнів МОС у мікросомній фракції печінки щурів. Триваліше надходження в організм досліджуваного ксенобіотика протягом 21-ї доби супроводжувалося активацією NADH-цитохром b_5 -редуктази та NADPH-цитохром P450-редуктази з одночасним зниженням вмісту їхніх редокс-партнерів – цитохрому b_5 та цитохрому P450 (CYP) відповідно.

Показано, що надходження в організм ДЕФ у дозі 5,4 мг/мл спочатку супроводжувалося активацією мікросомних NADH- та NADPH-залежних флавопротеїнредуктаз, проте при подальшому введенні ксенобіотика до 21-ї доби послаблювалась функціональна активність редуказного та оксигеназного ланцюгів МОС. При цьому в мікросомній фракції печінки виявлено зниження активності NADH-цитохром b_5 -редуктази та вмісту цитохрому b_5 як компонентів редуказного ланцюга та зниження NADPH-цитохром P450-редуктазної активності та вмісту CYP як компонентів оксигеназного ланцюга МОС.

Ключові слова: цитохром b_5 , NADH-цитохром b_5 -редуктаза, NADPH-цитохром P450-редуктаза, цитохром P450, мікросомна фракція печінки, диетилфталат.

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

_____ І. В. Банарь

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study of the activities of the components of the reductase and oxygenase chains of the monooxygenase system in the microsomal fraction of rat liver under the influence of different doses and terms of administration of diethylphthalate (DEF).

It was established that two-week administration of DEF at a dose of 2.5 mg/kg of animal weight did not lead to changes in the activity of flavoenzymes and the content of MOS hemoproteins in the microsomal fraction of rat liver. Longer intake of the studied xenobiotic into the body for 21 days was accompanied by the activation of NADH-cytochrome b_5 -reductase and NADPH-cytochrome P450-reductase with a simultaneous decrease in the content of their redox partners - cytochrome b_5 and cytochrome P450 (CYP), respectively.

It was shown that the intake of DEF at a dose of 5.4 mg/ml was initially accompanied by the activation of microsomal NADH- and NADPH-dependent flavoprotein reductases, however, with further administration of the xenobiotic up to the 21st day, the functional activity of the reductase and oxygenase chains of MOS was weakened. At the same time, a decrease in the activity of NADH-cytochrome b_5 -reductase and the content of cytochrome b_5 as components of the reductase chain and a decrease in the NADPH-cytochrome P450-reductase activity and the content of CYP as components of the oxygenase chain of MOS were detected in the microsomal fraction of the liver.

Keywords: cytochrome b_5 , NADH-cytochrome b_5 -reductase, NADPH-cytochrome P450-reductase, cytochrome P450, liver microsomal fraction, diethyl phthalate.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Структурно-функціональна характеристика цитохром Р450 - гідроксилуючої системи	8
1.2. Особливості функціонування компонентів оксигеназного ланцюга цитохром Р450-гідроксилуючої системи	10
1.3. Участь компонентів редуктазного ланцюга цитохром Р450-гідроксилуючої системи у передачі електронів	16
1.4. Механізми дії диетилфталату та його біотрансформація в організмі	20
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
2.1. Об'єкт та методи досліджень	25
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	32
ВИСНОВКИ	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	43
ДОДАТКИ	50

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ

CPR – NADPH-цитохром P450 редуктаза

CYB5 – цитохром b₅

CYB5R – NADH-цитохром b₅ редуктаза

CYP – цитохром P450

ДЕФ – діетилфталат

ЕР – ендоплазматичний ретикулум

МЕФ – моноетилфталат

МОС – монооксигеназна система

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

ВСТУП

Порушення роботи багатьох органів і систем організму людини відбувається внаслідок дії різноманітних ксенобіотиків, серед яких особливої уваги заслуговують пластифікатори, що використовуються з метою надання полімерним сполукам еластичності, гнучкості та довговічності [1]. До таких речовин відноситься діетилфталат (ДЕФ), який додають до багатьох споживчих засобів [2]. ДЕФ найчастіше використовується як ароматичний інгредієнт у парфумах, дезодорантах, милах, шампунях, лосьйонах та інших продуктах особистої гігієни. Оскільки фталати не ковалентно зв'язуються з продуктами, вони легко вимиваються та забруднюють навколишнє середовище, потрапляючи в організм людини. Тому, вплив ДЕФ на організм людини і тварин відбувається через пряме вживання продуктів, що містять цю хімічну речовину, а також через вдихання забрудненого повітря. Відкритими залишаються питання впливу на організм різних доз та термінів надходження ДЕФ.

Метаболізм ДЕФ відбувається в печінці за дії ензимів біотрансформації ксенобіотиків, у результаті чого цей ксенобіотик біотрансформується до моноетилфталату (МЕФ), що призводить до його токсифікації. При цьому фталати спричиняють різні проблеми зі здоров'ям, такі як канцерогенез [3], кардіотоксичність [4], гепатотоксичність [5], нефротоксичність [6], нейротоксичність [7] і репротоксичність [8]. Гепатотоксична дія фталатів може супроводжуватися порушеннями системи біотрансформації ксенобіотиків, що знизить гомеостатичні функції печінки [1].

Маловивченими залишаються питання впливу фталатів саме на компоненти монооксигеназної системи (МОС), ключовий ензим якої – цитохром P450 (CYP), бере участь у гідроксилюванні ксенобіотиків, роблячи їх доступними для дії ензимів II фази детоксикації [9]. Окрім CYP, до складу МОС входять NADPH-цитохром P450 редуктаза (CPR), цитохром b₅ (CYB5) та NADH-цитохром b₅ редуктаза (CYB5R), які є важливими транспортерами електронів у редуктазному та оксигеназному ланцюгах МОС [10]. Напрямок

змін функціонування протеїнів МОС за дії ДЕФ може визначити інтенсивність процесів детоксикації або токсифікації чужорідних речовин у печінці.

Мета роботи – оцінити особливості функціонування компонентів цитохром Р450-гідроксильуючої системи у мікросомній фракції печінки щурів за дії на організм різних доз диетилфталату.

У зв'язку з цим поставлені наступні **завдання**:

1. Дослідити стан компонентів редуктазного ланцюга МОС – NADH-цитохром b₅-редуктазну активність та вміст CYP5 у мікросомній фракції печінки щурів за дії різних доз та термінів введення ДЕФ.

2. Визначити NADH-цитохром Р450-редуктазну активність та вміст CYP як компонентів оксигеназного ланцюга МОС у мікросомній фракції печінки за дії різних доз та термінів введення ДЕФ.

3. Оцінити інтенсивність окисно-відновних перетворень CYP5 та CYP в мікросомній фракції печінки щурів за дії різних доз та термінів введення ДЕФ.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структурно-функціональна характеристика цитохром Р450-гідроксилюючої системи

Цитохром Р450 (СУР) відіграє ключову роль у метаболізмі як ксенобіотичних сполук, так і ендогенних субстратів, таких як ліпіди, стероїди, поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) тощо. Центральна роль, яку відіграють мітросомальні СУР у метаболізмі ксенобіотиків, робить ці ензими основним об'єктом для вивчення диспозиції токсикантів та ліків, побічних ефектів цих речовин і взаємодії між ними [11]. Однак ці ензими функціонують не самі по собі, а швидше складають частину пов'язаної з мембраною мультиферментної системи – мітросомної МОС. Основні компоненти МОС, які також називають «мітросомним ланцюгом переносу електронів», представлені кількома видами СУР, СРР, СУВ5 і СУВ5R. Початковий етап перенесення електронів відбувається СРР і/або СУВ5, а кінцевий акцептор електронів – СУР. Коли NADPH використовується як єдине джерело відновних еквівалентів у цій системі стає необхідним існування додаткового носія – відновленого NADH та NAD-залежного флавопротеїну. NADH також може окислюватися NADPH-залежною окисно-відновною системою.

Мітросомний ланцюг переносу електронів можна розділити на дві частини:

1. NADH-залежний ланцюг або редуктазний ланцюг, до якого входить NADH-цитохром b_5 -редуктаза і цитохром b_5 ;
2. NADPH-залежний ланцюг або оксигеназний ланцюг, до якого входить NADPH-цитохром Р450-редуктазу (NADPH-цитохром С-редуктазу, NADPH-ферицитохром С-оксидоредуктазу) і СУР.

Транспорт протонів та електронів у мітросомному цитохром Р450-залежному електрон-транспортному ланцюзі відбувається за схемою, представленою на рис.1.1 [12]:

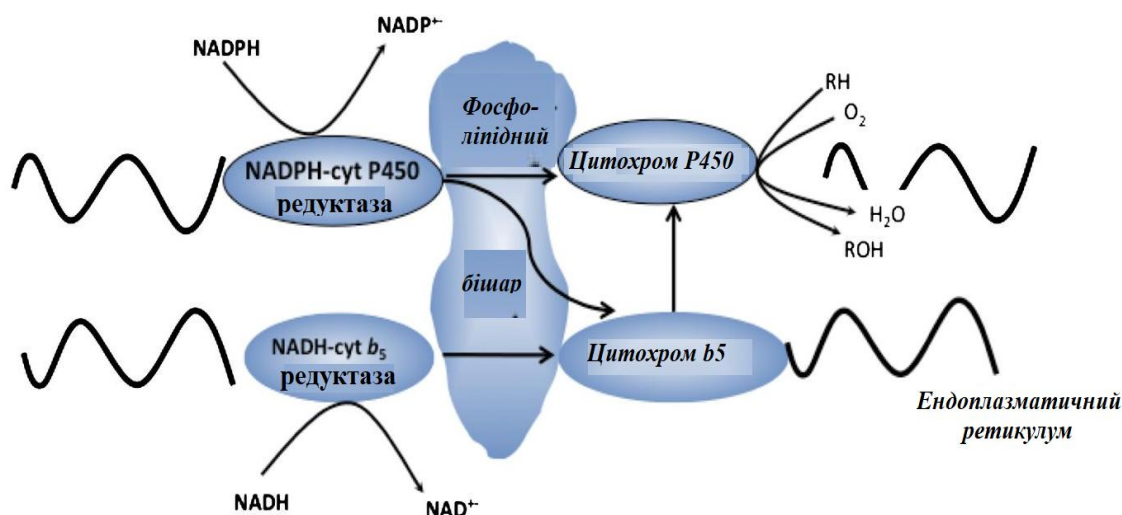


Рис.1.1. Схема структури монооксигеназної системи

З усіх представлених компонентів МОС лише СYP здатний зв'язувати ліпофільну хімічну речовину або лікарський засіб та перетворювати його на полярний, більш гідрофільний продукт [11]. Для відновлення цього цитохрому донорами електронів є в основному NADPH та NADH. На частку NADH як донора електронів припадає приблизно 10-30% [13].

Оскільки піридинові нуклеотиди не можуть безпосередньо віддавати електрони на гем тривалентного заліза, то до складу МОС повинні входити додаткові білки транспорту електронів. Було виділено NADPH-специфічний флавопротеїн – CPR, який опосередковує перенесення електрона від NADPH до СYP. У експериментах, де інгібували CPR, обробляючи мікросоми печінки трипсином, показали, що не відбувалася повна втрата активності СYP. Його активність підтримувалася за рахунок передачі електронів з редуктазного ланцюга, донором яких є відновлений NADH. Так, NADH-залежна активність залишається після обробки мікросом трипсином, що вказувало на той факт, що задіяна інша система транспорту електронів [13]. Подібні результати отримували, коли використовували антитіла проти мікросомальної CPR, в результаті чого блокувався лише NADPH-залежний шлях передачі електронів, але це не впливало на NADH-залежний шлях передачі електронів.

З іншого боку, виявлено, що використання антитіл проти CYP5 інгібувало NADH-залежне N-деалкілювання. Такі ж результати спостерігалися під час використання антитіл проти CYP5R, коли спостерігалось інгібування O-деалкілювання етоксикумарину, яке підтримується NADH, але не NADPH як косубстратом [14].

Отже, з проаналізованих експериментів видно, що в МОС в якості транспорту електронів працюють два електрон-транспортні ланцюга – редуктазний та оксигеназний. Частка внеску оксигеназного ланцюга у роботу МОС більша ніж редуктазного, який може слугувати, як альтернативний шлях під час передачі електронів під час гідроксильовання деяких ксенобіотиків CYP.

1.2. Особливості функціонування компонентів оксигеназного ланцюга цитохром Р450-гідроксильованої системи

З усіх протеїнів МОС тільки CYP активує молекулярний кисень з використанням електронів, які транспортуються від NADPH або NADH, тому цей ензим ще називають неспецифічною монооксигеназою.

Цитохром Р450 (EC 1.14.14.1, CYP) – один з основних ензимів, який відповідає за детоксикацію органічних та неорганічних ксенобіотиків в організмі тварин та людини. Цей ензим належить до оксидаз змішаної функції, який розташований на мембранах ER (мікросом) та для активації молекулярного кисню використовує NADPH та/або NADH. При цьому він вводить один атом кисню у гідрофобну органічну сполуку (RH) з утворенням полярного продукту (ROH). У цьому випадку другий атом кисню використовується для утворення молекули води [15].

CYP є гем b-зв'язувальними ензимами, в яких гемове залізо зазвичай є двовалентним залізом у стані спокою, в очищеному вигляді, та може бути двовалентним залізом *in vivo* [16]. Гемове залізо проксимально координується залишком цистеїну в його тіолатній (депротонованій) формі, і

цей стан лігування вважається активною формою ензиму. Координований тіолат цистеїну заліза СYP зазвичай має свою основну смугу поглинання при максимумі приблизно 418 нм. У своєму двовалентному стані він зв'язується з інгібітором монооксидом вуглецю (CO), утворюючи Fe(II)-CO – комплекс, в якому основна смуга поглинання лежить при ~ 450 нм — тобто пігмент з піком поглинання при 450 нм [17]. Цей спектральний зсув є основою для назв цих ензимів і відображає збереження проксимальної координації цистеїну тіолата в цій формі ензиму. Протонування тіолата призводить до утворення комплексу Fe(II)-CO з максимальним поглинанням при $\lambda=450$ нм, і цей координований тіол стан часто вважається активованою формою ензиму [15].

Отже, під час обробки мікросом монооксидом карбону утворюється комплекс, який дає нову смугу поглинання при $\lambda=450$ нм, від чого і походить назва СYP. Це досить поширена група ензимів, яка налічує більше 300 родин та більше 2 тис. представників. СYP у родини об'єднують залежно від відсотка спорідненості амінокислотних послідовностей [17].

СYP зазвичай діють як монооксигенази, зв'язуючи дікисень із двовалентним гемовим залізом і, зрештою, вводять атом кисню в субстрат, а інший атом кисню відновлюється до води [14].

Розрізняють різні реакції відповідно до конкретних СYP і типів зв'язаного субстрату. До них належать такі реакції, як гідроксилювання та епоксидування; реакції N- і S-окислення; окисне деметилювання, деалкілювання та дезамінування; окислювальне і відновне дегалогенування; окислювальний розрив зв'язків C–C, ізомеризація, ароматичне гідроксилювання та окиснення спиртів і альдегідів [12].

Окиснення ксенобіотиків за дією різних ізоформ СYP відбувається за однаковою схемою у процесі монооксигеназного циклу, який відбувається за загальною схемою, представленою на рис.1.2 [18].

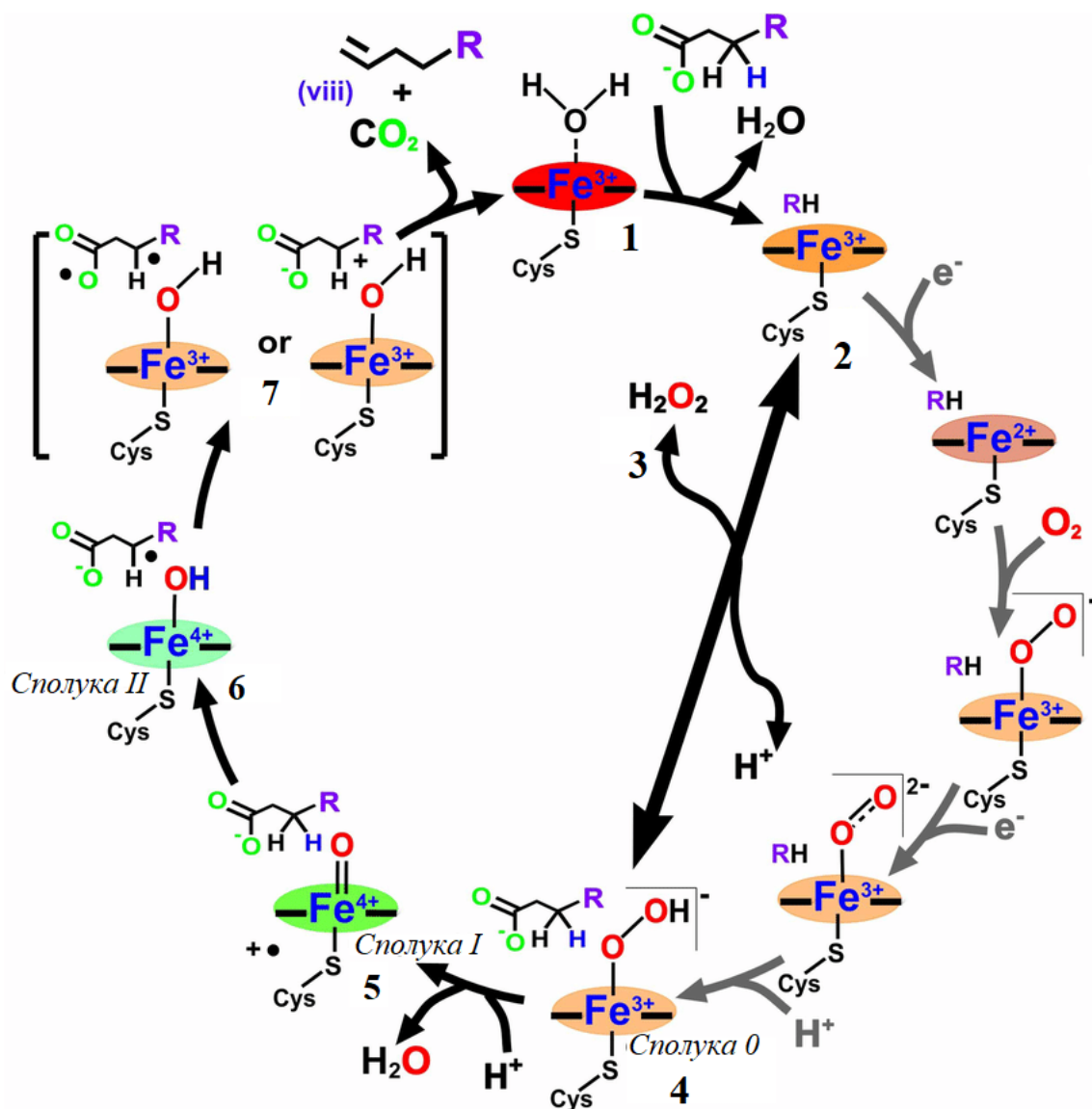


Рис.1.2. Каталітичний цикл монооксигенації за дії цитохрому P450

Як видно з рис.1.2 каталітичний цикл СYP відбуваєть у кілька стадій:

1. СYP знаходиться в стані спокою з низьким обертанням тривалентного заліза, а його гемове залізо аксіально координується тіолатом цистеїну та молекулою H₂O.
2. Зв'язування субстрату витісняє аксіальну воду та перетворює гемове залізо з низькоспінової у високоспінову форму.

3. CYP використовує пероксидний шунтовий шлях, який обходить потребу в зовнішніх електронах і взаємодію з H_2O_2 , що сприяє прямому перетворенню, зв'язаного з субстратом, високоспінового CYP.

4. Утворюється пероксикомплекс.

5. Подальші стадії протонування та дегідратації дають реакційноздатний катіон-радикал ферил (Fe_{IV})-оксо порфірину (сполука I).

6. Від сполуки I відривається атом водню, в результаті чого утворюється радикал субстрату та ферил (Fe_{IV})-гідроксоформа (сполука II).

7. Декарбоксилювання субстрату відбувається шляхом подальшого одноелектронного окислення субстрату сполукою II, генерується субстратний дирадикал або карбокатион.

8. Утворюється кінцева сполука, тобто продукт реакції. Одночасно протон приєднується до гему, що призводить до дистального водно-лігovanого стану CYP [18].

Переважній більшості CYP потрібні окисно-відновні партнерські системи, керовані NAD(P)H , для функціонування *in vivo*. У еукаріот, мікосомні CYP зв'язані з мембраною через N-кінцевий трансмембранний спіральний сегмент, як і їх природний окисно-відновний партнер CPR [13].

Іншим компонентом оксигеназного ланцюга МОС є CPR (EC:1.6.2.4) – це дифлавіновий ензим з двома основними доменами [FAD/NADP(H)-зв'язування та FMN-зв'язування]. NADPH доставляє електрони (як гідрид-іон) до FAD домену, щоб відновити його до стану гідрохінону. Ці два електрони потім послідовно переносяться на флаводоксиподібний домен FMN, який, у свою чергу, переносить їх по одному до гемового заліза CYP, щоб зменшити його спочатку до стану двовалентного заліза (забезпечуючи зв'язування кисню), а потім далі відновлюючи види супероксо заліза, що призводить до утворення реакційноздатного залізо-пероксостану [19]. На наступних стадіях каталітичного циклу відбуваються дві послідовні стадії протонування — утворюючи спочатку гідропероксозалізо (сполука 0), а потім комплекс піддається дегідратації з утворенням катіонного радикалу

ферил-оксо гема (сполука I), який є вирішальним для хімічного процесу введення кисню в субстрат за дії CYP [20].

Найбільш характерною властивістю CYP-залежних ензимів є те, що вони практично всі метаболізують ксенобіотики.

Отже, редуктази цитохрому P450 (CPR або CYPOR, EC 1.6.2.4) є дифлавіноксидоредуктазами, які постачають електрони до CYP. *In vivo* CPR також знижує кількість інших протеїнів, таких як цитохром b₅, гемоксигеназа та система елонгації жирних кислот; *in vitro* було показано, що він переносить електрони до нефізіологічних акцепторів, таких як цитохром c, фериціанід та різні ліки [21].

CPR присутні у більшості еукаріот, де вони взаємодіють з доменом CYP, у результаті чого відбувається передача електронів на CYP (рис.1.3) [15, 22].

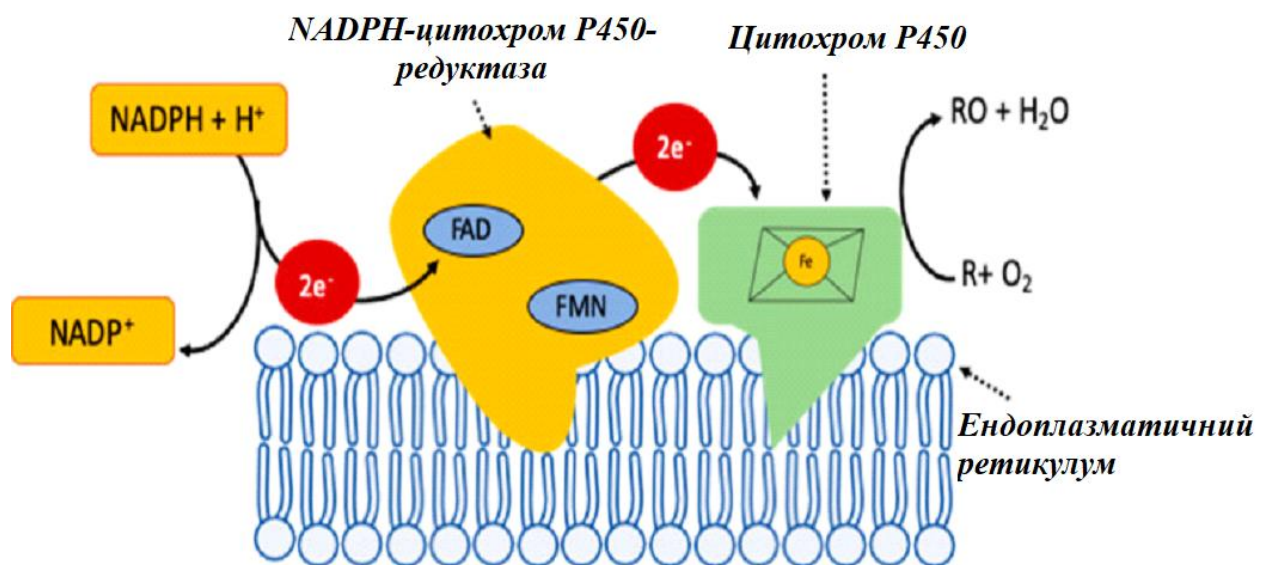


Рис.1.3. Схема передачі електронів в оксигеназному ланцюзі монооксигеназної системи

Структура CPR зберігається серед різних ізформ. CPR має N -кінцевий FMN-зв'язуючий домен, який з'єднаний із С-кінцевим FAD-зв'язуючим доменом через лінкерну ділянку. У більшості CPR N -кінець протеїну (~6

кДа) діє як мембранний якір і відповідає за його локалізацію в ЕР. Ензим переносить електрони від NADPH у типовому порядку через FAD до FMN, який зрештою переміщує електрони до акцепторних протеїнів [23]. Запропонований механізм полягає в тому, що під час перенесення електронів між флавінами ензим знаходиться в компактній замкнутій конформації, що полегшує потік електронів між простетичними групами [24]. Однак ця конформація не є ідеальною для взаємодії з акцепторами протеїна, і тому CPR зазнає конформаційних змін, щоб відновити FMN для взаємодії з CYP [25].

Перехід між відкритим і закритим утвореннями може обмежити перенесення гідрогену від NADPH до FAD, а також перенесення електронів інтерфлавіну, оскільки стан спокою CPR є закритою конформацією, під час якої відбувається зв'язування NADPH. Два домени з'єднані через гнучку шарнірну область, що дозволяє домену FMN повертатися від домену FAD для перенесення електронів до його фізіологічних протеїнів-партнерів [20]. Цій конформаційній свободі необхідно протистояти, щоб, як тільки ензим повертається до закритої конформації, була досягнута правильна взаємодія міжфазного домену. Збережені соляні мости могли б, можливо, спрямувати асоціації доменів для успішних і продуктивних орієнтацій шляхом зменшення потенційних відносних орієнтацій [24].

Дуже важливою характеристикою МОС є великий надлишок CYP над CPR, основним донором електронів. Повідомляється [26], що молярне співвідношення CYP до CPR у мікросомних мембранах печінки гризунів становить близько 10:1–30:1 або навіть до 40:1. Нещодавно опубліковане дослідження зі 150 зразками печінки людини показує, що це співвідношення знаходиться в діапазоні від 2:1 до 27:1 із середнім рівнем 7,1:1. Наявність кількох типів CYP в одній мембрані робить граничну концентрацію CPR надзвичайно важливою для функціонування. Різні види CYP повинні конкурувати за CPR. Крім того, незважаючи на те, що система, що складається з CYP і CPR, є повністю функціональною, повна МОС також

містить CYB5, який, як вважають, проявляє алостеричний ефект на конформацію CYP, а також може служити альтернативним джерелом електронів [17].

Отже, в оксигеназному ланцюзі основними компонентами є CYP і CPR, які є редокс партнерами в передачі електронів, які транспортуються від відновленого NADPH до CYP, який, у свою чергу, гідроксильє субстрат.

1.3. Участь компонентів редуктазного ланцюга цитохром P450-гідроксильюючої системи у передачі електронів

Окисно-відновний баланс в монооксигеназній системі регулюють CYB5R та CYB5.

NADH-цитохром b₅-редуктазf (EC:1.6.2.2, CYB5R) – це родина ензимів, яка складається з п'яти членів і є групою флавопротеїнових редуктаз, які каталізують перенесення електронів від NADH, як правило, через переносник електронів, наприклад, такий як CYB5 до кінцевого субстрату. Ці ензими у великій кількості та повсюдно експресується в різних типах клітин [27].

Структурно CYB5R був кристалізований, у результаті чого виявили «структуру, подібну до мушлі молюска» з двома критичними структурними доменами: NADH- і FAD-зв'язуючий домен. Ці два домени утримуються разом лінкерною ділянкою, яка відіграє важливу роль у підтримці двох доменів у правильній орієнтації та в безпосередній близькості, щоб полегшити перенесення електронів [28]. Було показано, що CYB5R знижує кількість критичних субстратів, таких як гем і коензим Q (CoQ). Однак інші члени родини CYB5R не були повністю вивчені. Таким чином, більша частина розуміння структури та функцій цих протеїнів базується на попередніх дослідженнях і знаннях про CYB5R та великій подібності послідовностей між редуктазами в сімействі CYB5R [29]. Послідовності п'яти редуктаз зберігаються, особливо в межах FAD- і NADH-зв'язуючих доменів, що вказує на важливість взаємодії між цими доменами в ізоформах

CYB5R. Домен, що зв'язує флавін, необхідний для стабільності та функціонування CYB5R. Цікаво, що серед п'яти редуктаз CYB5R1, CYB5R2 і CYB5R3 є структурно найбільш схожими, маючи майже нерозрізнені мотиви в FAD- і NADH-зв'язуючих доменах [29].

Недавня публікація продемонструвала, що CYB5R1, локалізований на мембрані ЕР, функціонує в тандемі з CPR, щоб каталізувати перекисне окислення ліпідів і запускати фероптозу в клітинах HeLa [30].

CYB5R відіграє важливу роль у антиоксидантних реакціях на стрес і може розглядатися як «ензим стійкості», який захищає клітини від стресу. В умовах стресу CYB5R підтримує вбудовані в мембрану α -токоферол і аскорбат, потужні мембранні антиоксиданти в живих клітинах, у відновленому стані. Це досягається за рахунок CYB5R-каталізованого відновлення CoQ в біологічних мембранах. CoQ є молекулою, присутньою у всіх клітинах і мембранах, де він функціонує не тільки як важливий переносник електронів у мітохондріальному дихальному ланцюзі, але також як потужний антиоксидант, який може самостійно гасити АФК або через зниження α -токоферолу та аскорбату вільних радикалів [31].

CYB5R є частиною редуктазного ланцюга та переносить електрони від відновленого NADH на CYB5 (рис.1.4) [32].

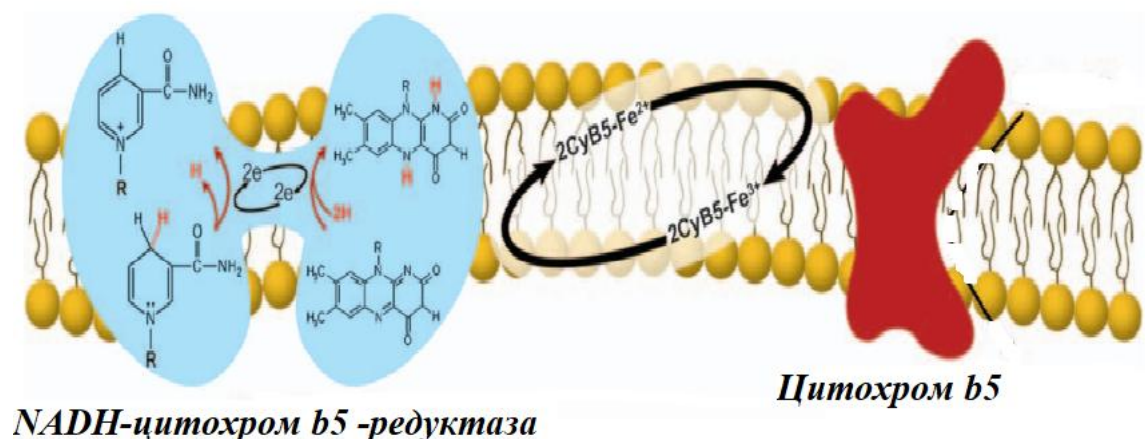
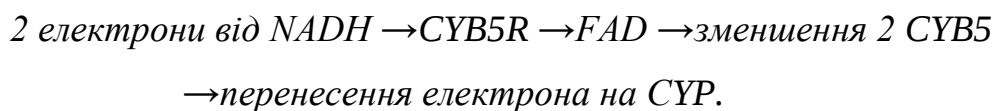


Рис.1.4. Схема перенесення електронів та протонів цитохром- b_5 -редуктазою

Як видно з рис.1.4 ізоалоксазинове кільце FAD отримує два електрони з NADH за механізмом перенесення гідридів. Конформаційні зміни у флавіновій частині ензиму роблять його ідеальним для досягнення гемової групи CYB5. Потім ці електрони відновлюють два еквіваленти атомів заліза до іонів заліза [33].

Отже, найбільшим природний субстрат для редукції є хінони атома заліза кофактора гема в CYB5. У людей підтверджено наявність функціонального комплексу 1:1 між CYB5R і CYB5 [29].

Відмінності електрохімічного градієнта між комплексами FAD і NAD є приблизно -60 мВ; тому CYB5R може брати участь в одному або двох переносах електронів до нового акцептора електронів, і електрони можуть ефективно рухатися через такий електрохімічний градієнт. Послідовність передачі електронів можна відобразити наступним чином [32]:



Етап відновлення флавіну є лімітуючим фактором, що обмежує швидкість цієї ланцюгової реакції.

Іншими компонентами редуктазного ланцюга МОС є CYB5 – це клас протеїнів, що зв'язують гем та широко поширені в клітинах тварин і людини. Як повсюдний міжклітинний транспортер електронів, CYB5 приймає електрони від CYB5R та переносить електрони до протеїнів і активує їх. CYB5R спочатку називали цитохромом m (для мікросом) і було показано, що він присутній у мікросомах, містить протопорфірин IX, не зв'язує CO і, можливо, служить ланкою для перенесення електронів між NADH і цитохромом c [28].

CYB5 відноситься до гемвмісних протеїнів та у своїй структурі містить домен, який «заякорений» в ліпідному бішарі ЕР. Це група невеликих протеїнів мол. масою біля 15 кДа. У клітинах ссавців окрім мікросомних

ізоформ є ще мітохондріальна ізоформа. Структурно ці ізоформи мають N-термінальну гідрофільну та C-термінальну гідрофобну ділянки. Небілковий компонент, який являє собою гем (залізопорфірин IX) розташований в N-термінальному домені, до складу якого входить приблизно 100 амінокислот. Гем в структурі CYB5 зв'язується з протеїновою частиною двома координованими зв'язками через імідазольні групи гістидину [34].

Гідрофільна частина CYB5 повернена в цитозоль, саме через неї здійснюється транспорт електронів в редуказному ланцюзі МОС під час проходження окисно-відновних реакцій. У структурі CYB5 розрізняють середній гідрофобний домен, до складу якого входить біля 20 амінокислот, які розташовуються біля C-кінця. Саме ця ділянка слугує мембранним якорем, який занурюється в ліпідний бішар мембран EP і стабілізує ензим в структурно-функціональній конформації у мембрані. З використанням біоінформаційних методів показано, що дана ділянка CYB5 утворює вигин в ліпідній мембрані [35].

Поркано, що ізоформи CYB5 хоча і мають спільну структурну організацію, проте вони по-різному впливають на активність CYP, оскільки мають різні фізико-хімічні властивості. Це пов'язано з різною будовою гідрофільного домену CYB5. Так, в одних CYB5 гідрофільний домен з жорсткішою структурою, що надає йому більшої стійкості до денатурації, проте, показано, що ці ізоформи менш ефективно взаємодіють з редокс-партнерами [36].

CYB5, окрім EP та мітохондрій, локалізовані в цитоплазмі різних клітин, вони є розчинними і виконують різні функції – відновлення метгемоглобіну, беруть участь у циклі синтезу метіоніну з гомоцистеїну, біосинтезі плазмалгену і стеролів [32].

У реакціях біосинтезу ліпідів ізоформи CYB5 виступають як донори електронів для мікросомних десатураз, які каталізують реакції утворення подвійних зв'язків в молекулах ПНЖК, які забезпечують пластичність мембран та слугують як попередники арахідонової кислоти [34].

CYB5 бере участь у метаболізмі ксенобіотиків за рахунок передачі електронів від його донора через CYB5R на CYP. Тому, можна вважати, що CYB5 стимулює NADH-залежну монооксигеназну активність різних CYP та проявляє селективність по відношенню до положення молекули субстрату під час його гідроксилювання CYP [34].

Отже, аналіз ензимів CYP, CPR та CYB5 свідчить про важливу різницю між інтегральними властивостями МОС та простим підсумовуванням властивостей окремих видів CYP. Це все дозволяє МОС функціонувати як єдине ціле з транспортом електронів на CYP.

1.4. Механізми дії диетилфталату та його біотрансформація в організмі

Фталати – це хімічні речовини, які використовуються в промисловості для надання м'якості, гнучкості і тому вважаються пластифікаторами. Близько 40% усіх споживчих товарів, які використовує людина, містять фталати як один із компонентів. З часом фталати вимиваються з матеріалів, в яких вони присутні і потрапляють в навколишнє середовище, у результаті чого можуть негативно діяти на організм людини [37].

Фталати – це дієфіри фталевої кислоти (1,2-бензолдикарбонової кислоти), які у промисловості виробляються у великих кількостях і використовуються у виробництві пластмас. Різні фталати відрізняються як за структурою, так і за молекулярною масою, що надає їм різних фізико-хімічних властивостей [38]. Така варіація різних фталатів залежить від довжини вуглеводневого ланцюга і ступеня розгалуження. Фталати можуть мати високу молекулярну масу кількість атомів вуглецю у молекуді 8–13 або низьку молекулярну з кількістю атомів вуглецю від 3 до 7 [39].

Найпоширенішими високомолекулярними фталатами є діізононілфталат (DINP), діізодецилфталат (DIDP) і ді(2-етилгексил) фталат

(DEHP), тоді як деякі приклади низькомолекулярних фталатів – це диметилфталат (DMP), диетилфталат (ДЕФ) і дибутилфталат (DBP) [38].

У той час як високомолекулярні фталати використовуються у виробництві товарів, таких як дроти, кабелі, покриття для підлоги, настінних покриттів і самоклеючих плівок, то низькомолекулярні фталати використовуються для виготовлення таких товарів, як засоби особистої гігієни (наприклад, парфуми, лосьйони та косметика), лаки, покриття та чорнила, в капсулах ліків, медичному приладді [40].

Враховуючи, що ДЕФ – найпоширеніший член фталатів, який переважно використовується в промисловості для виробництва товарів для людей, то стає актуальним вивчення механізмів його дії.

Вплив фталатів на людину відбувається через споживання харчових продуктів, вдихання повітря або пилу, забруднених фталатами або через поглинання шкірою (Науковий комітет з Ризику для здоров'я та навколишнього середовища (SCHER), 2008). В організмі фталати метаболізуються за допомогою дії ферментів I та II фаз біотрансформації: фаза I включає реакції гідролізу з наступною фазою II – кон'югації. Під час фази I ліпази та естрази в кишечнику та паренхімі каталізують гідроліз фталатів у біологічно активні моноефірні фталати [41].

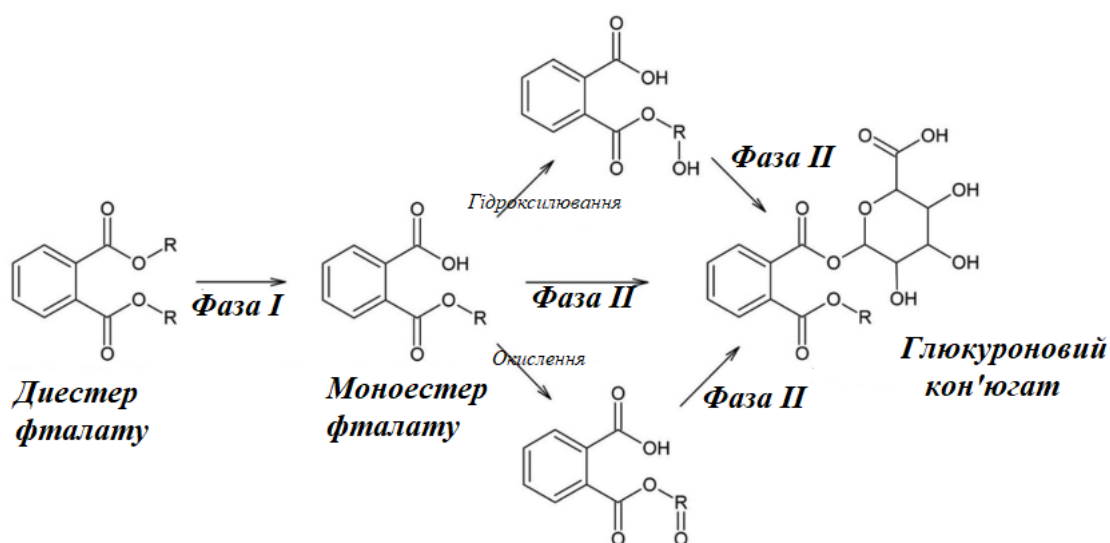


Рис.1.5. Загальна схема метаболізму фталатів у організмі

Фаза II відбувається за рахунок реакції кон'югації, де 5-УДФ-глюкуронілтрансфераза каталізує реакцію кон'югації моноефіру фталатів з глюкуроною кислотою з утворенням біологічно неактивного глюкуроніду. Ці утворені фталатні метаболіти потім виводяться з сечею та фекаліями [41]. Відомо [39], що зазвичай низькомолекулярні фталати виводяться з організму після фази гідролізу I, тоді як високомолекулярні фталати виводяться після фази II метаболізму.

Метаболіти фталатів виявлено в сечі дітей (281 нг/мл) [42], крові (41 нг/мл) [43] та грудному молоці (143 нг/мл) [44].

В організмі фталатні ефіри швидко метаболізуються до моноефірів і окислені метаболіти виділяються з сечею або вільно, або кон'юговані у вигляді глюкуронідів [40].

Метаболіти ДЕФ в організмі зазвичай піддаються швидкій деестерифікації до моноефірів з утворенням МЕФ (рис.1.6).

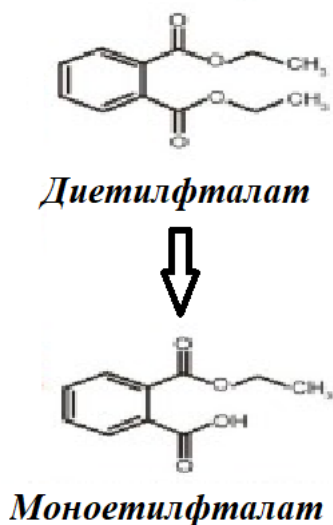


Рис.1.6. Схема гідролізу диетилфталату з утворенням моноетилфталату

Утворений МЕФ може легко виводитися з організму, тому за його концентрацією у сечі можна проаналізувати вплив ДЕФ на організм. При подальшій біотрансформації з ДЕФ утворюється глюкуронід (рис.1.7) [44].

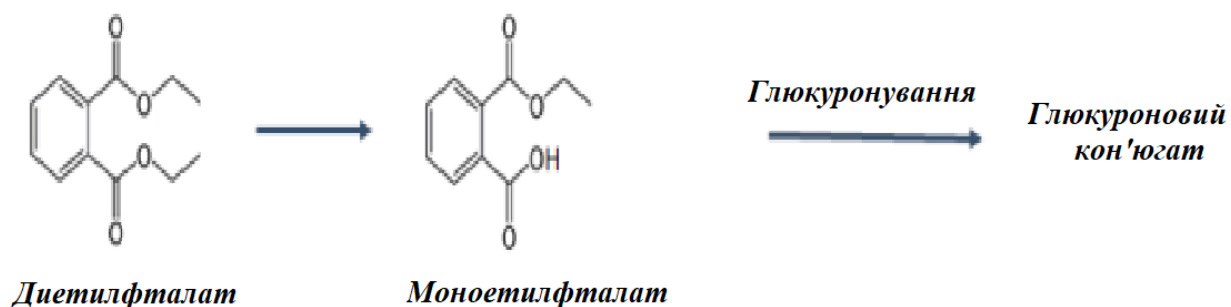


Рис.1.7. Біотрансформація диетилфталату в організмі

Щодо участі СYP у метаболізмі ДЕФ фталатів відомо мало, проте, з'являються результати дослідження можливості цього процесу, які проаналізовані методами біоінформатики.

У роботі [45] для розуміння закономірностей регіоселективності активації фталату СYP-гідроксильюючою системою розраховані механізми, які призводять до аліфатичного гідроксильовання в положенні С5-аліфатичного ланцюга, О-деалкілювання, ароматичного гідроксильовання орто-вуглецевого атома та епоксидування ароматичного кільця. Експериментальні дослідження активації фталату певними ізоферментами СYP показали, що розподіл продукту сильно залежить від ізоферменту [46]. Оскільки кожний ізофермент СYP має характерну кишеню для зв'язування субстрату [47], орієнтація субстрату всередині ізоферменту Р450 може бути різною, і, отже, активація субстрату дасть інші продукти. Відповідно, у роботі Choi et al. [46] показано, що для СYP3A1 і СYP2C12 домінуючим продуктом є С5 гідроксильовання, тоді як для СYP2D6 було виявлено переважно О-деалкілювання.

Отже, комп'ютерне дослідження зв'язування та активації фталатів СYP печінки відбувалося за розрахунками використання моделей активних центрів сполуки І СYP у її реакції з естером фталату та 2-етилгексанолу. Вивчено моделі гідроксильовання С5, О-деалкілювання, епоксидування ароматичного циклу та гідроксильовання орто-ароматичного циклу.

Аліфатичне гідроксилювання та О-деалкілювання розпочалося з відриву атома водню з подальшим відокремленням, у результаті чого отримується комплекс спиртового продукту. У О-деалкілюванні виявлено, що спиртовий продукт реагує з допоміжною молекулою води шляхом О-деалкілювання. Механізми епоксидування та ароматичного гідроксилювання є електрофільними та призводять до радикального проміжного продукту, де оксогрупа утворює одинарний зв'язок з одним атомом вуглецю ароматичного кільця. Цей радикал може утворювати епоксид через замикання кільця; однак цей шлях має значну висоту бар'єру. Шлях нижчої енергії веде через протонний човник від іпсо-протону до гему та назад до феноляту з утворенням фенольних продуктів. Усі шляхи були проаналізовані та раціоналізовані за допомогою термодінамічних моделей, моделей валентного зв'язку та кінетичних моделей, що може лежати в основі такої біотрансформації ДЕФ в організмі.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт та методи досліджень

У роботі для дослідження використовувалися білі безпородні щурі масою 120-160 г, які перебували на стандартному раціоні віварію, який збалансований за всіма нутрієнтами. Всі тварини мали вільний доступ до води та їжі. Під час проведення експериментів з тваринами дотримувалися всіх норм біоетики, що відповідало Міжнародним вимогам, які вказують на гуманне ставлення до тварин. Окрім того, виконувалися вимоги Директиви 86/609/ЄЕС щодо питання захисту тварин.

Відповідно до мети та завдань дослідження всіх тварин розділили на три групи по 18 тварин у кожній групі:

I група – інтактні тварини, які склали групу контролю;

II група – щурі, яким вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин;

III – щурі, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин.

Вибір дози здійснювали відповідно до даних літератури, які вказують на те, що максимально-допущена доза ДЕФ не повинна перевищувати 5 мг / кг маси тіла на добу [48], відповідно середня доза становила 2,5 мг / кг маси тіла на добу.

Ксенобіотик тваринам вводили перорально щоденно протягом 21 доби. Евтаназію експериментальних тварин здійснювали під легким ефірним наркозом на 14 та 21 доби після початку введення ДЕФ.

Після відбирання з тварин печінки з неї виділяли залишки крові шляхом промокування фільтрувальним папером та проводили видалення мікросомної фракції методом гизькошвидкісного центрифугуванн. Всі процедури проводили в охолоджених умовах.

У суспензії мікросомної фракції визначали вміст CYP, CYP5, ензиматичну активність CPR та CYP5R. Окрім того, визначали окисно-відновні стани CYP та CYP5 за швидкістю відновлення-окислення CYP5 та швидкістю теплової інактивації CYP.

Методика виділення мікросомальної фракції

Принцип методу виділення мікросомної фракції методом низькошвидкісного центрифугування полягає в тому, що мікросоми є високозарядженими частинками, тому при додаванні в середовище іонів двохвалентних металів (кальцію, магнію), вони здатні утворювати агрегати. Це відбувається за рахунок нейтралізації позитивно зарядженими іонами металів негативний заряд мікросом [49].

Хід методики

Всі інструменти для гомогенізації тканин печінки попередньо охолоджували. Після промивки печінки охолодженим фізіологічним розчином, її подрібнювали за допомогою ножниць та поміщали в гомогенізатор Поттера.

Печінку гомогенізували у середовищі, яке містило: 0,25 моль/л сахарозу, 0,001 моль/л ЕДТА та 0,03 моль/л трис-НСІ, рН=7,4.

Гомогенат печінки спочатку фільтрували, а потім піддавали кільком етапам центрифугування.

На першому етапі центрифугування з отриманого гомогенату печінки виділяли ядра. Для отримання ядерної фракції проби центрифугували протягом 10 хвилин при 800 g.

Отриману надосадову рідину перемішали в інші пробірки для центрифугування для виділення мітохондрій та профодили центрифугування протягом 10 хв при 10000 g протягом. Осад мітохондрій відкладали, а надосадову рідину переливали в чисті пробірки та використовували для виділення мікросомної фракції.

До виділеної надосадової рідини додавали іони Ca^{2+} та Mg^{2+} у такому співвідношенні: 9 мл надосадової рідини та 1 мл 80 ммоль/л CaCl_2 та 1 мл 160 ммоль/л розчину MgCl_2 . Такі концентрації розчинів готували на 10 ммоль/л трис-НСІ буфері, рН=7,4. Після об'єднання сумішей проби перемішували на шейкері протягом 10 хвилин та піддавали подальшому центрифугуванню протягом 15 хвилин при 9000g.

Отриманий осад являв собою мікросомну фракцію, яку в подальшому двічі промивали розчином 0,25 моль/л сахарози. У мікросомній фракції визначали стан компонентів МОС.

Методика визначення вмісту мікросомного цитохрому P450

Вміст СYP за методом Omura, Sato [50]. Принцип методу полягає у вимірюванні поглинанні спектрів окисленої і відновленої форм мікросомного СYP, після попередньої обробки мікросом монооксидом карбону.

Хід методики

В дослідну та контрольну пробірки додавали трис-НСІ буферний розчин 100 ммоль/л (рН 7,4) та мікросомну фракцію з концентрацією протеїну 2 мг/мл. Через дослідну пробу протягом 1 хв пропускали монооксид вуглецю, у результаті чого утворювався комплекс СYP–СО, після чого для відновлення СYP в обидві пробірки додавали декілька кристалів дитіоніту натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Одержання оксиду вуглецю (II) відбувалося під час змішування концентрованої мурашиної кислоти та концентрованої сірчаної кислоти. Після утворення СО його очищали від залишків кисню шляхом пропускання через розчин пірогалолу.

Вимірювання проводили спектрофотометрично за визначенням диференційних спектрів поглинання. СYP ідентифікували з використанням к'ювети з довжиною оптичного шляху 1 см. Максимальне поглинання СYP–СО комплексу спостерігалось при 450 нм, а мінімальне – при 490 нм.

Концентрацію СYP в пробах визначали з використанням коефіцієнту молярної екстинції $91 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ та розраховували за формулою:

$$C = \frac{D_{450-490}}{M \cdot L \cdot W}, \text{ де}$$

де $D_{450-490}$ – різниця між максимумом поглинання при 450 нм і мінімумом при 490 нм; M – коефіцієнт молярної екстинції; L – довжина оптичного шляху (см); W – кількість білка (мг/мл).

Вміст СYP виражали в нмоль на мг протеїну.

Вміст протеїну в пробах визначали за методом Лоурі [51].

Методика визначення NADPH-цитохром P450-редуктазної активності

Принцип методу визначення NADPH-цитохром P450-редуктазної активності полягає у відновленні акцептора електронів ферриціаніду калію та його переходу з окисленої форми у відновлену. Реєстрацію змін поглинання електронів проводили спектрофотометрично [52].

Хід методики

У пробірки додавали по 3 мл інкубаційної суміші, до складу якої входило: 100 мкмоль/л відновленого NADPH, 330 мкмоль/л фериціаніду калію ($K_3[Fe(CN)_6]$), трис-HCl буферний розчин у концентрації 100 ммоль/л (pH 7,4) та ~500 мкг мікросомного протеїну.

Реакцію запускали шляхом додавання до проб відновленого NADPH та $K_3[Fe(CN)_6]$ після чого відразу починали реєстрацію швидкості відновлення ферриціаніду за допомогою спектрофотометра СФ-16 протягом 2,5 хв. При цьому довжина хвилі становила 420 нм.

Для розрахунку ензимної активності CPR використовували коефіцієнт молярної екстинції $1,02 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, який характерний для окисненого фериціаніду калію.

Ензиматичну активність CPR виражали у нмоль окисненого $K_3[Fe(CN)_6]$ за 1 хв на 1 мг протеїну.

Методика визначення швидкості переходу СYP в цитохром P420

Швидкість теплової інактивації СYP проводили за допомогою реєстрації спектрів поглинання відновлених комплексів СYP-CO при довжині хвилі 420 і 450 нм [52].

Хід методики

У дослідну та контрольну пробірки наливали інкубаційну суміш, яка містила вже розрахованого СУР у концентрації 0,3–1,0 нмоль на мг протеїну. Концентрація трис-НСІ буферного розчину становила 0,1 моль/л, рН 7,4.

Для ініціації швидкості теплової інактивації проби з СУР спочатку інкубували протягом 5 хв на водяній бані при 37°C.

Після інкубації через дослідну пробірку продували монооксид вуглецю (СО) протягом 1 хв. Після цього в обидві пробірки додавали декілька кристалів дитіоніту натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) та починали реєстрацію спектрів поглинання.

Запис даних зі СФ проводили через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 хв після запису нульового показника.

Швидкість теплової інактивації СУР розраховували за різницею показників оптичного поглинання мікросом при довжинах хвиль 420 і 450 нм ($\Delta A_{420-450}$) і розраховували на мг протеїну.

Методика визначення вмісту СУВ5

Принцип методу визначення вмісту СУВ5 полягає у вимірюванні різниці поглинання окисленої та відновленої форм СУВ5 [52].

Хід методики

В інкубаційній суміші для визначення вмісту СУВ5 містилося: трис-НСІ буферний розчин у концентрації 100 ммоль/л (рН 7,4) та 2 мг протеїну білка в 1 мл суспензії мікромомної фракції.

Для реєстрації показників використовували спектрофотометрі та циліндричні кювети діаметром 10 мм.

Після додавання до кожної к'ювети 4 мл інкубаційної суміші, виставляли нульову лінію на кулачці світлопропускання (на рівень приблизно 70 %). Вимірювання здійснювали в діапазоні хвиль 400 – 500 нм.

Після додавання до дослідної кювети декілька кристалів дитіоніту натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) починали записувати диференційний спектр поглинання

різних форм (відноленої, окисленої) CYB5. Мінімум поглинання CYB5 фіксували при 408 нм, а максимум – при 428 нм.

Вміст CYB5 визначали за різницею поглинання при довжинах хвилі 408 та 428 нм ($\Delta\text{ОП}_{408-428}$).

Вміст CYB5 у фракції мікросом розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинції рівного $164 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$. Вміст CYB5 виражали в нмоль на мг протеїну.

Методика визначення ензимної активності CYB5R

Принцип методу визначення NADH-цитохром b_5 -редуктазної активності полягає у відновленні акцептора електронів ферриціаніду калію та його переходу з окисленої форми у відновлену, що реєстрували на спектрофотометрі при довжині хвилі 420 нм [52].

Хід методики

У пробірки додавали 3 мл інкубаційної суміші, яка містила: трис-HCl буферний розчин у концентрації 100 ммоль/л (pH 7,4), 100 мкмоль/л розчин відновленого NADH, 330 мкмоль/л розчин фєроціанідут калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) та 20 мкг мікросомного протеїну.

У циліндричні к'ювети діаметром 10 мм вносили по 3 мл інкубаційної суміші, при цьому нульову лінію у СФ на кулачці світлопропускання виставляли на рівень 70 %.

Реакцію запускали шляхом додавання в дослідну к'ювету 0,5 мл $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ та 0,5 мл відновленого NADH. Відразу записували показник СФ в діапазоні 420 нм. Диференційний спектр міряли та записували через кожну хвилину протягом 3 хвилин. Для розрахунків брали середнє значення.

Для розрахунку активності CYB5R в мікросомній фракції використовували коефіцієнт молярної екстинції окисленого $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ рівного $1,02 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ [42]. Активність CYB5R виражали в нмоль/хв на мг протеїну.

Метою визначення швидкості відновлення-окислення СУВ5

Швидкість відновлення-окислення СУВ5 визначили спектрофотометрично після додавання в кювети відновленого NADH та записом диференційного спектру поглинання при довжинах хвилі 424 нм та 475 нм [52].

Хід методики

У кювети товщиною 10 мм додавали інкубаційну суміш до складу якої входило 100 ммоль/л трис-НСІ-буферний розчин (рН-7.4) та 1 мг протеїну мікросомної фракції.

Після внесення в к'ювети інкубаційної суміші записували нульову лінію. Після цього запускали реакцію шляхом додавання в проби розчину відновленого NADH у розрахунку до кінцевої концентрації 33 мкмоль/л.

Запис диференційного спектру СУВ5 вимірювали через кожні 30с протягом 3 хвилин. Показником швидкості відновлення-окислення СУВ5 слугував рівень його максимального відновлення і час напівокислення. Зниження або підвищення рівня його максимального відновлення на фоні мінімального часу напівокислення було показником зміни швидкості окисно-відновної реакції СУВ5. Швидкість відновлення-окислення СУВ5 $A_{424-475}/\text{хв}$ на мг протеїну.

Статистична обробка результатів

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики за допомогою програми Microsoft Excel з використанням t-критерію Ст'юдента. Вірогідними вважали результати, якщо $P \leq 0,05$ [45].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гідроксилування ксенобіотиків ізоформами СYP залежить від окисно-відновних процесів, які відбуваються в оксигеназному та редуктазному ланцюгах МОС. Так, транспорт електронів на СYP здійснюється через NADPH-цитохром P450 редуктазу та цитохром b_5 , який переносить електрони на п'ятому етапі монооксигеназного циклу. Будь-які зміни функціонування цитохрому b_5 в редуктазному ланцюзі МОС можуть відобразитися дисфункціонуванням СYP та його переходом у неактивну форму – цитохром P420 [41]. Це, у свою чергу, знизить швидкість гідроксилування ксенобіотиків СYP [37].

Стан цитохром P450-гідроксилуючої системи печінки значною мірою залежить від дози та характеру впливу різних екзогенних речовин. Це пов'язано з тим, що в процесі біотрансформації ксенобіотиків можуть утворюватися проміжні реактивні метаболіти, які по-різному будуть впливати на функціонування компонентів оксигеназного та редуктазного ланцюгів МОС. ДЕФ належить до ксенобіотиків, біотрансформація якого в печінці призводить до утворення токсичнішого метаболіту МЕФ, який може проявляти гепатотоксичну дію [46], порушуючи окисно-відновні процеси в оксигеназному та редуктазному ланцюгах МОС.

Результати досліджень активності компонентів редуктазного ланцюга МОС показали, що двотижневе введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин не призводило до змін NADH-цитохром b_5 редуктазної активності порівняно з показниками інтактних тварин (рис.3.1). Збільшення термінів введення ДЕФ у цій же дозі виражалось підвищенням ензимної активності NADH-цитохром b_5 редуктази у 1,7 рази порівняно з показниками інтактних тварин на 21-добу експерименту (рис.3.1). Підвищення NADH-цитохром b_5 редуктазної активності вказує на інтенсифікацію потоку електронів на цитохром b_5 , який є редокс-партнером цього ензиму в редуктазному ланцюзі МОС.

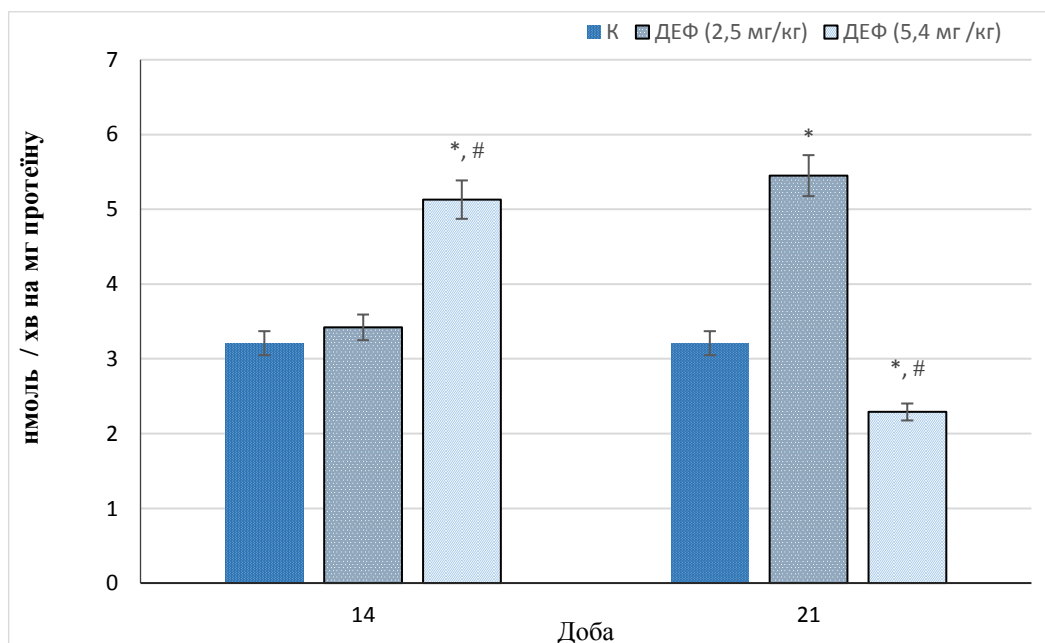


Рис.3.1. Активність NADH-цитохром b₅-редуктази в мікрсомній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

*Примітка (тут і надалі): К – контрольна група щурів (інтактні тварини); ДЕФ (2,5 мг/кг) – щурі, яким перорально вводили диетилфталат у дозі 2,5 мг на кг маси тіла; ДЕФ (5,4 мг/кг) – щурі, яким перорально вводили диетилфталат у дозі 5,4 мг на кг маси тіла; * – статистично достовірна різниця порівняно з інтактними щурами, $P \leq 0,05$; # – статистично достовірна різниця порівняно з показником щурів, яким диетилфталат вводили у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин, $P \leq 0,05$.*

Введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин супроводжувалося підвищенням ензимної активності NADH-цитохром b₅ редуктази на 14-у добу експерименту, що перевищувало показники інтактних тварин у 1,6 рази. Проте, триваліша дія високих доз ДЕФ сприяла інактивації досліджуваного ензиму, оскільки спостерігалось зниження NADH-цитохром b₅ редуктазної активності у 1,4 рази порівняно з показниками контролю (рис.3.1). Виявлені зміни можуть бути наслідком окиснювальної інактивації ензиму або ж інтенсифікації процесів ПОЛ в мембранах ЕР, що, у будь-якому випадку, призведе до зміни його структурно-функціональної конформації та зниження активності [32].

Оскільки редокс-партнером NADH-цитохром b_5 редуктази у передачі електронів виступає цитохром b_5 , то нами визначено його вміст у мікросомній фракції печінки.

Аналіз результатів дослідження показав зниження вмісту цитохрому b_5 зі збільшенням дози досліджуваного ксенобіотику. Так, якщо двотижневе введення ДЕФ у дозі 2,5 мг / кг не призводило до зміни вмісту цитохрому b_5 , то введення дози 5,4 мг / кг супроводжувалося зниженням вмісту цього протеїну в 1,5 рази порівняно з контролем. Зі збільшенням терміну введення ксенобіотику зниження рівня цитохрому b_5 було суттєвішим, оскільки при застосуванні дози 2,5 мг / кг вміст цього гемопротеїну знижувався у 1,4 рази, а при введенні дози 5,4 мг / кг – у 2,6 рази (рис.3.2).

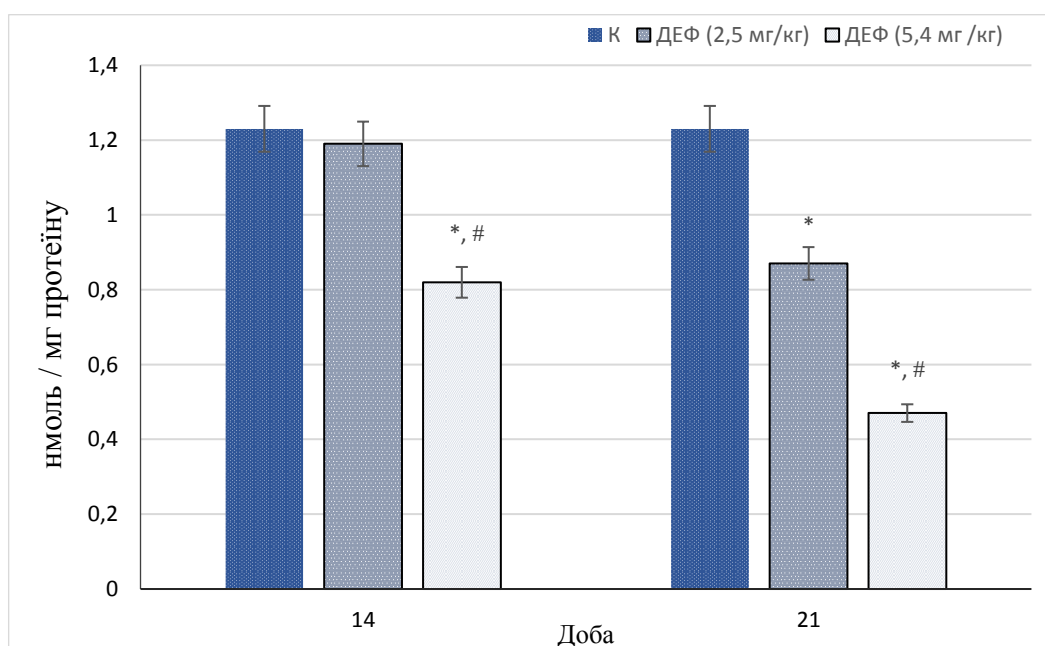


Рис.3.2. Вміст цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки щурів за дії диетифталату

Як показують результати, застосування різних доз та термінів введення ДЕФ супроводжується дисбалансом у роботі компонентів редуктазного ланцюга МОС. Встановлено, що підвищення NADH-цитохром b_5 редуктазної активності та одночасне зниження вмісту цитохрому b_5 спостерігається лише

при тритижневому введенні середніх доз ДЕФ (2,5 мг /кг). Такий напрямок змін матиме негативні наслідки для клітин, оскільки підвищення NADH-цитохром b_5 редуктазної активності сприятиме підвищенню потоку електронів в редуктазному редокс-ланцюзі МОС. Однак, за умов зниження вмісту цитохрому b_5 акцепторами електронів можуть виступати молекули кисню, що призведе до утворення супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) [53]. При застосуванні високих доз ДЕФ (5,4 мг / кг) виявлені зміни спостерігалися вже при двотижневому застосуванні ксенобіотика. При цьому триваліше введення ДЕФ супроводжувалося зниженням не лише вмісту цитохром b_5 , але й NADH-цитохром b_5 редуктазної активності в мікросомній фракції, що вказує на глибокі деструктивні зміни протеїнів редуктазного ланцюга МОС.

Інтенсивність процесу гідроксилування субстратів також значною мірою обумовлюється не лише вмістом цитохрому b_5 , але й його окисно-відновними перетвореннями.

Аналіз результатів досліджень показав, що в умовах двотижневого введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг не спостерігалось змін відновлення цитохрому b_5 , тоді як на 21-шу добу експерименту підвищувалися його окисно-відновні перетворення (рис.3.3).

Водночас, за умов введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг на 14-у добу спостерігалось підвищення швидкості окиснення-відновлення цитохрому b_5 порівняно з показниками інтактних тварин, що вказувало на прискорення передачі електронів в редуктазному ланцюзі МОС (рис.3.3). Ці зміни, поряд із прискоренням проходження монооксигеназного циклу можуть мати негативні наслідки, оскільки надлишок потоку електронів в редуктазному ланцюзі може сприяти утворенню супероксидного радикала.

Отже, на фоні зниження вмісту цитохрому b_5 (рис.3.2) підвищується швидкість його окисно-відновних перетворень, що може компенсувати зниження його вмісту.

На 21-шу добу експерименту спостерігалось зниження швидкості окисно-відновного перетворення цитохрому b_5 за умов введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг, що вказує на зниження передачі електронів на СYP (рис.3.3).

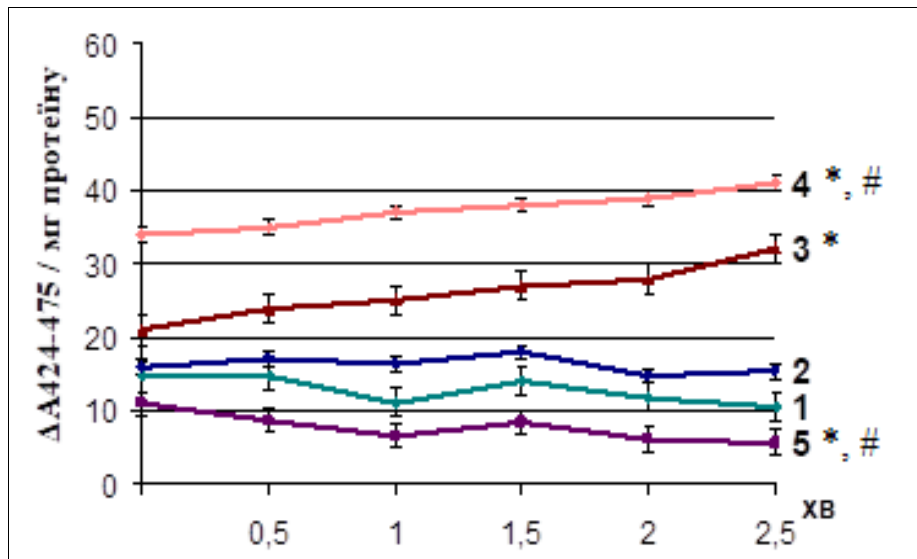


Рис.3.3. Швидкість відновлення-окиснення цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Примітка (тут і на рис.3.6): 1 – інтактні щури; 2 – щури, яким вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин протягом 14 діб; 3 – щури, яким вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин протягом 21 доби; 4 – щури, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин протягом 14 діб; ; 4 – щури, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин протягом 21 доби; * – статистично достовірна різниця порівняно з інтактними щурами ($P \leq 0,05$); # – статистично достовірна різниця порівняно з показником щурів, яким ДЕФ вводили у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин ($P \leq 0,05$).

Встановлений факт, ймовірно пов'язаний зі структурними змінами в молекулі цитохрому b_5 та з його нездатністю вступати в окисно-відновні процеси за тривалого ведення високих доз досліджуваного ксенобіотика.

Оскільки від транспорту електронів у редуктазному ланцюзі МОС залежить гідроксилування субстратів СYP, то нами досліджено стан компонентів оксигеназного ланцюга МОС – ензимна активність NADPH-цитохром Р450 редуктази та вміст СYP.

Аналіз результатів дослідження показав, що введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/ кг маси тварин протягом 14 діб не призводило до змін NADPH-цитохром Р450 редуктазної активності в мікросомній фракції печінки щурів. Триваліше застосування низьких доз ксенобіотика протягом 21 доби сприяло підвищенню ензимної активності NADPH-цитохром Р450 редуктази у 1,5 рази порівняно з відповідним показником групи контрольних щурів (рис.3.4). Одним із механізмів підвищення ензимної активності NADPH-цитохром Р450 редуктази може бути ініціація його експресії в клітинах печінки [54].

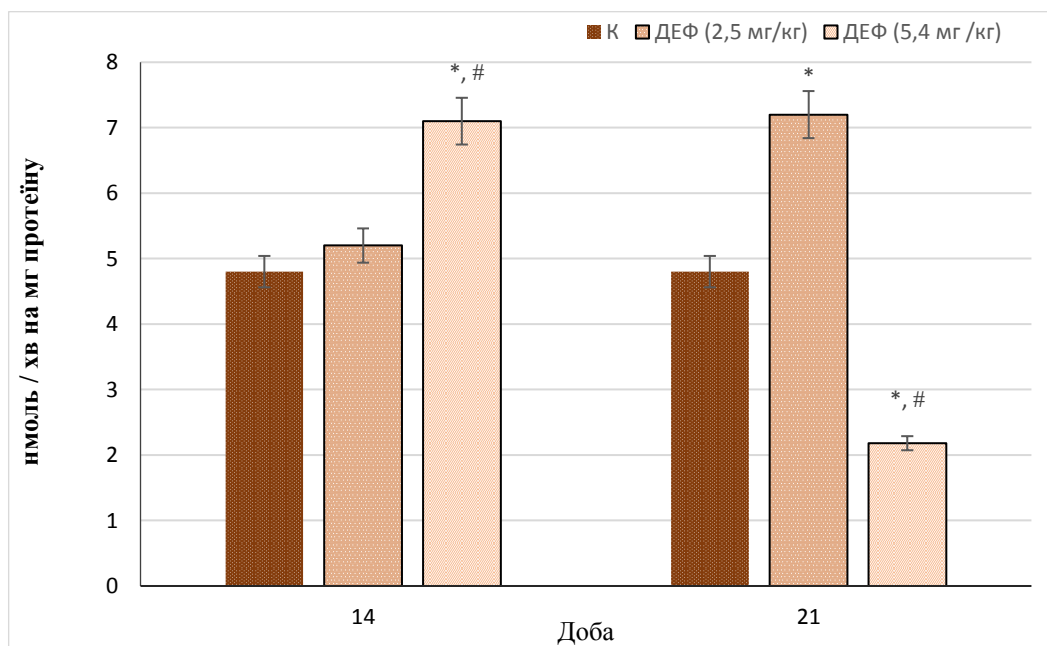


Рис.3.4. Активність NADPH-цитохром Р450-редуктази в мікросомній фракції печінки щурів за дії диетифталату

Підвищення активності флавоензиму сприятиме посиленому надходженню електронів на СYP, таким чином посилюючи функцію

останнього. Проте, визначення вмісту мікросомного СYP показало його зниження у 1,4 рази на 21-шу добу експерименту порівняно з контролем, що вказує на порушення у функціонуванні оксигеназного ланцюга МОС (рис.3.5).

У цьому випадку може спостерігатися одна з основних проблем, пов'язана з переносом електронів між NADPH-цитохром P450 редуктазою та СYP, це, так зване, явище «роз'єднання», результатом якого буде генерація активних форм кисню (АФК) [55]. Генерація АФК може бути наслідком втрати електронів в оксигеназному ланцюзі МОС із їх транспортом не на СYP, а на молекулярний кисень з утворення супероксидного радикала. Це призведе до неефективної реакції, окислювального пошкодження та зрештою до інактивації ензиму [19].

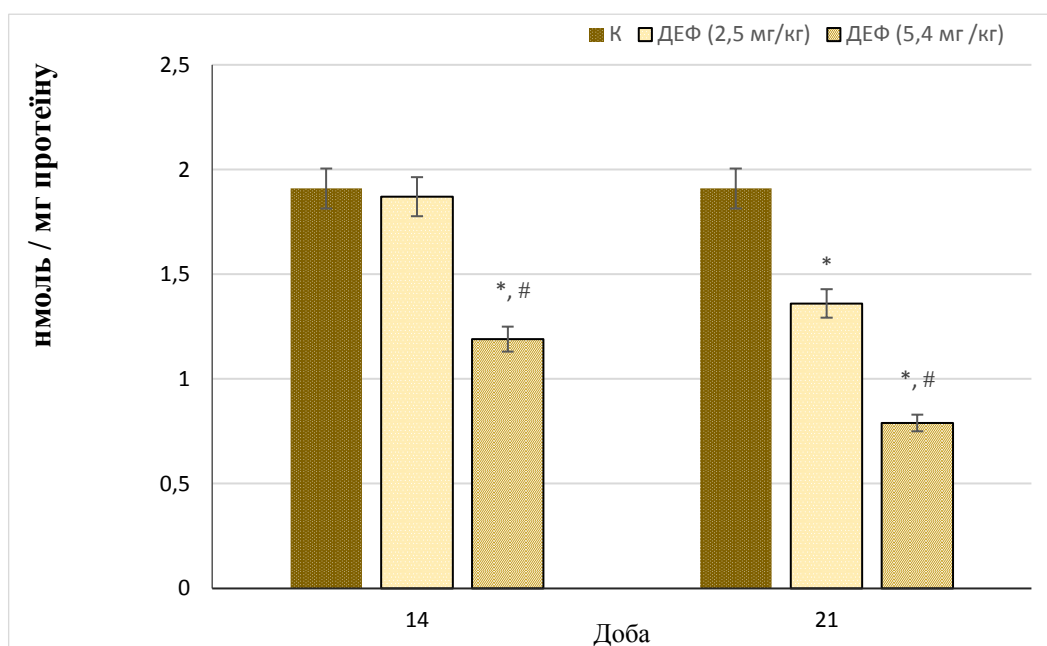


Рис.3.5. Вміст цитохрому P450 у мікросомній фракції печінки щурів за дії диетифталату

Введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг протягом 14 діб показало подібний ефект, який спостерігався при тривалому введенні низьких доз. Так, у мікросомній фракції печінки у 1,5 рази підвищувалася ензимна активність

NADPH-цитохром Р450 редуктази порівняно з показником інтактних тварин (рис.3.4). При цьому у 1,6 рази знижувався вміст СYP (рис.3.5). Зниження вмісту гемопротейну може бути пов'язано з його окисно-відновними перетвореннями, у результаті яких він переходить в неактивну форму – цитохром Р420 [56].

Тритижневе введення високих доз ксенобіотика супроводжувалося зниженням ензимної активності NADPH-цитохром Р450 редуктази у 2,2 рази порівняно з показниками контролю (рис.3.4). Інактивація ензиму може бути пов'язана з процесами ліпопероксидації у мембранах ЕР, оскільки це мембраннозв'язаний флавопротеїн, тому бішар ліпідів відіграє провідну роль у визначенні окисно-відновного потенціалу його функціонально-активних доменів [57]. Окрім того, за дії ДЕФ знижується активність ензимів антиоксидантної системи [58], що сприятиме інтенсифікації вільнорадикальних процесів у клітині. Встановлені зміни супроводжуватимуться зниженням транспорту електронів в оксигеназному ланцюзі МОС, необхідних для метаболічної активності СYP.

Поряд зі зниженням NADPH-цитохром Р450 редуктазної активності у мікросомній фракції знижувався вміст СYP у 2,4 рази порівняно з показниками контролю після введення ДЕФ у дозі 5,4 мг / кг протягом 21 доби (рис.3.5). Механізми деструктивної дії ДЕФ на компоненти оксигеназного ланцюга можуть реалізуватися через його проміжний метаболіт МЕФ, який утворюється в процесі його біотрансформації [59]. Утворення електрофільного проміжного продукту може стати фундаментальним для інактивації СYP. Під час порушення проходження монооксигеназного циклу може відбуватися аутоокислення СYP за дії АФК, які утворюються у цьому процесі [57]. При цьому значна частина його може перетворюватися на неактивну форму цитохром Р420. Щоб перевірити це припущення нами досліджено швидкість інактиції СYP.

Порівняльний аналіз введення різних доз ксенобіотика показав, що за умов введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг спостерігалось підвищення окиснення

СУР вже на 14-у добу після початку введення ксенобіотика. Водночас, при введенні дози 2,5 мг/кг змін у швидкості відновлення-окиснення СУР не спостерігалось порівняно з показниками інтактних тварин (рис.3.6).

Триваліше введення ДЕФ (протягом 21-доби) сприяло суттєвішому підвищенню окиснення СУР у мікросомній фракції печінки порівняно з двотижневим введенням ксенобіотика. Причому, інтенсифікація окиснювальних процесів в оксигеназному ланцюзі МОС більшою мірою спостерігалася при введенні вищих доз ДЕФ (5,4 мг/кг) (рис.3.6). Підвищення окиснення СУР супроводжується його конформаційними змінами, у результаті чого він переходить в неактивну форму – цитохрому Р420. Виявлена нами інтенсифікація окисної модифікації СУР знизить гідроксилування субстратів I та II типу. Встановлені зміни можуть бути пов'язані зі змінами ліпідного бішару мембран ендоплазматичного ретикулу (ЕР) печінки за дії ДЕФ.

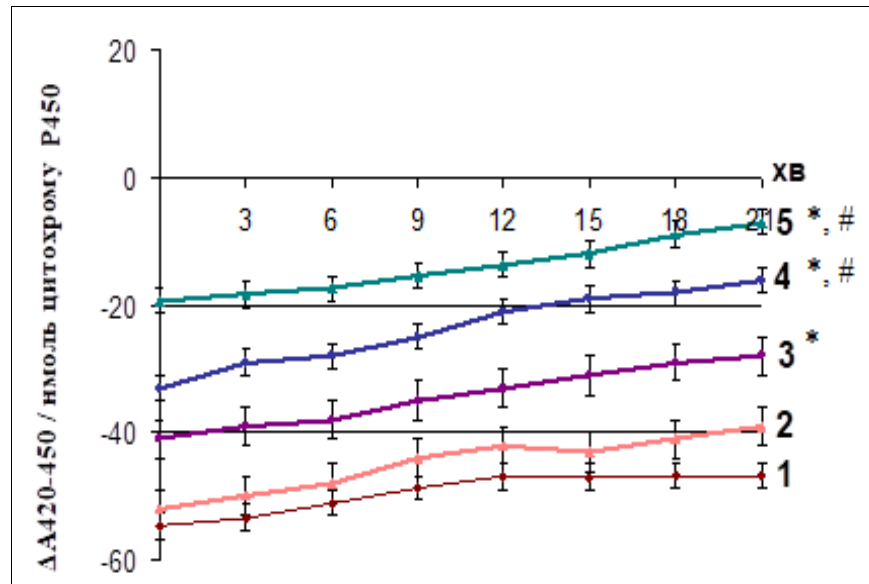


Рис.3.6. Швидкість інактивації цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки щурів за дії диетифталату

Отже, зміни у функціонуванні компонентів редуктазного та оксигеназного ланцюгів МОС залежать від дози та термінів введення ДЕФ.

Високі дози вже після двотижневого введення сприяють зниженню вмісту гемопротеїнів МОС. За умов тривалішого введення ДЕФ знижується й NADPH-цитохром P450 редуктазна активність та вміст цитохрому b_5 , що сприятиме зниженню інтенсивності процесу гідроксилування субстратів СYP, оскільки ці протеїни є редокс-партнерами у передачі електронів на певних етапах монооксигеназного циклу. Додатковим механізмом дисфункціонування МОС є зниження вмісту СYP, як основного ензиму, який метаболізує ксенобіотики. Дисфункціонування в оксигеназному та редуктазному ланцюгах МОС за введення різних доз ДЕФ проявляється підвищенням окиснення СYP та його переходом в неактивну форму цитохром P420. Окрім того, на початкових етапах введення ксенобіотика активуються окисно-відновні перетворення цитохрому b_5 . Водночас, підвищення дози та термінів введення ДЕФ супроводжується зниженням передачі електронів в редуктазному ланцюзі, на що вказує зниження швидкості відновлення-окиснення цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки щурів.

ВИСНОВКИ

1. Чотирнадцятиденне введення ДЕФ у дозі 2,5 мг / кг маси тварин не впливає на стан компонентів редуктазного та оксигеназного ланцюгів МОС у мікросомній фракції печінки щурів. Введення в організм досліджуваного ксенобіотика протягом 21-ї доби супроводжувалося активацією NADH-цитохром b₅-редуктази та NADPH-цитохром P450-редуктази з одночасним зниженням вмісту їхніх редокс-партнерів – цитохрому b₅ та CYP.

2. Введення в організм ДЕФ у дозі 5,4 мг/мл спочатку супроводжувалося активацією мікросомних NADH- та NADPH-залежних флавопротеїнредуктаз, проте при подальшому введенні ксенобіотика до 21-ї доби послаблювалась функціональна активність редуктазного та оксигеназного ланцюгів МОС зі зниженням активності NADH-цитохром b₅-редуктази та вмісту цитохрому b₅ як компонентів редуктазного ланцюга та зниженням NADPH-цитохром P450-редуктазної активності та вмісту CYP як компонентів оксигеназного ланцюга МОС.

3. Зниження вмісту CYP супроводжувалося його переходом в неактивну форму цитохром P420, що найбільше виявлено на 21-у добу експерименту при введенні ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Weaver J.A., Beverly B.E.J., Keshava N., Mudipalli A., Arzuaga X., Cai C. et al. Hazards of diethyl phthalate (DEP) exposure: A systematic review of animal toxicology studies. *Environ Int.* 2020. 145. P. 105848.
2. Gutiérrez-García A.K., Torres-García D.A., De Leon-Rodriguez A. Diethyl phthalate and dibutyl phthalate disrupt sirtuins expression in the HepG2 cells. *Toxicol Res (Camb)*. 2024. 13(4)tfae103.
3. Fiocchetti M., Bastari G., Cipolletti M., Leone S., Acconcia F., Marino M. The peculiar estrogenicity of diethyl phthalate: modulation of estrogen receptor alpha activities in the proliferation of breast cancer cells. *Toxics*. 2021. 9(10). P. 237.
4. James A.S., Eteng O.E., Dosumu O.A., Moses C.A., Ogbonna C.U., Adeleye O.A. et al. Morin augmented myocardial eNOS/cGMP/PKG signaling pathway and abated oxidative and inflammo-apoptotic responses in diethyl phthalate and bisphenol-s co-exposed male albino rats. *Inflammation*. 2023. 46(1). P. 175-189.
5. Mondal S., Mukherjee S. Long-term dietary administration of diethyl phthalate triggers loss of insulin sensitivity in two key insulin target tissues of mice. *Hum Exp Toxicol*. 2020. 39(7). P. 984-993.
6. Jeong S.H., Jang J.H., Cho H.Y., Lee Y.B.. Risk assessment for humans using physiologically based pharmacokinetic model of diethyl phthalate and its major metabolite, monoethyl phthalate. *Arch Toxicol*. 2020. 94(7). P. 2377-2400.
7. Ugwor E.I., Dosumu O.A., Eteng O.E., Moses C.A., Ogbonna C.U., James A.S. et al. Morin attenuates neurobehavioural deficits, hippocampal oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats co-exposed to bisphenol S and diethyl phthalate. *Brain Res*. 2022. 1794. P. 148068.
8. Ara C., Ramzan N., Ali S., Shakir H.A., Liaqat I., Iqbal A. Black coffee mitigates diethyl phthalate disrupted folliculogenesis, reduced gonadotropins, and ovarian lesions in female albino mice. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022. 29(31). P. 47254-47266.

9. Cantú Reinhard F.G., De Visser S.P. Biodegradation of cosmetics products: a computational study of cytochrome P450 metabolism of phthalates. *Inorganics* 2017. 5. P. 77.
10. Tursunova N.V., Syrov V.N., Khushbaktova Z.A., Tornuev Y.V., Klinnikova M.G. Monooxygenase system and NO metabolism in liver microsomes of rats with toxic hepatitis and the effect of sesquiterpene lactones. *Bull Exp Biol Med.* 2021. 172(2). P. 133-136.
11. Waring R.H. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica.* 2020. 50(1). P. 9-18.
12. Guengerich F.P., Waterman M.R., Egli M. Recent structural insights into cytochrome P450 function. *Trends Pharmacol Sci.* 2016. 37(8). P. 625-640.
13. Hu B., Zhao X., Wang E., Zhou J., Li J., Chen J. et al. Efficient heterologous expression of cytochrome P450 enzymes in microorganisms for the biosynthesis of natural products. *Crit Rev Biotechnol.* 2023. 43(2). P. 227-241.
14. Tornio A., Backman J.T. Cytochrome P450 in pharmacogenetics: an update. *Adv Pharmacol.* 2018. 83. P. 3-32.
15. El-Sherbeni A.A., El-Kadi A.O. Microsomal cytochrome P450 as a target for drug discovery and repurposing. *Drug Metab Rev.* 2017. 49(1). P. 1-17.
16. Kato H. Computational prediction of cytochrome P450 inhibition and induction. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2020. 35(1). P. 30-44.
17. Machalz D., Pach S., Bermudez M., Bureik M., Wolber G. Structural insights into understudied human cytochrome P450 enzymes. *Drug Discov Today.* 2021. 26(10). P. 2456-2464.
18. Munro A.W., McLean K.J., Grant J.L., Makris T.M. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. *Biochem Soc Trans.* 2018. 46(1). P. 183-196.
19. Sugishima M., Sato H., Higashimoto Y., Harada J., Wada K., Fukuyama K et al. Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014. 111(7). P. 2524-2529.

- 20.Vincent B. The closed and compact domain organization of the 70-kDa human cytochrome P450 reductase in its oxidized state as revealed by NMR. *J. Mol. Biol.* 2012. 420. P. 296–309.
- 21.Huang W.C., Ellis J., Moody P.C. E., Raven E.L., Roberts G.C.K. Redox-linked domain movements in the catalytic cycle of cytochrome P450 reductase. 2013. 21. P. 1581–1589.
- 22.Freeman S.L. Solution structure of the cytochrome P450 reductase–cytochrome complex determined by neutron scattering. *J. Biol. Chem.* 2018. 293. P. 5210–5219.
- 23.Morlock L.K., Böttcher D., Bornscheuer U.T. Simultaneous detection of NADPH consumption and H₂O₂ production using the Ampliflu™ Red assay for screening of P450 activities and uncoupling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. 102. P. 985–994.
- 24.Meints, C. E., Parke, S. M. & Wolthers, K. R. Proximal FAD histidine residue influences interflavin electron transfer in cytochrome P450 reductase and methionine synthase reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 547, 18–26 (2014).
- 25.Manoj K.M., Gade S.K., Venkatachalam A., Gideon D.A. Electron transfer amongst flavo- and hemo-proteins: Diffusible species effect the relay processes, not protein-protein binding. *RSC Adv.* 2016. 6. P. 24121–24129.
- 26.Niu G. Structure of the *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductase 2 (ATR2) provides insight into its function. *FEBS J.* 2017. 284. P.754–765.
- 27.Wood K.C., Durgin B.G., Schmidt H.M., Hahn S.A., Baust J.J., Bachman T. et al. Smooth muscle cytochrome b5 reductase 3 deficiency accelerates pulmonary hypertension development in sickle cell mice. *Blood Adv.* 2019. 3. P. 4104–4116.
- 28.Rahaman M.M., Reinders F.G., Koes D., Nguyen A.T., Mutchler S.M., Sparacino-Watkins C. et al. Structure guided chemical modifications of propylthiouracil reveal novel small molecule inhibitors of cytochrome b5

- reductase 3 that increase nitric oxide bioavailability. *J. Biol. Chem.* 2015. 290. P. 16861–16872.
29. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021. 596. P. 583–589.
 30. Yan B., Ai Y., Sun Q., Ma Y., Cao Y., Wang J. et al. Membrane damage during ferroptosis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1. *Mol Cell*. 2021. 81(2). P. 355-369.
 31. Zhang Q., Ma Y., Yan Y., Zhang L., Zhang Y.. CYB5R1 is a potential biomarker that correlates with stemness and drug resistance in gastric cancer. *Transl Oncol*. 2024. 39. P. 101766.
 32. Yan B., Ai Y., Sun Q., Ma Y., Cao Y., Wang J. et al. Membrane damage during ferroptosis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1. *Mol. Cell*. 2021. 81. P. 355–369.
 33. Jo Y.S., Kim M.S., Yoo N.J., Lee S.H. Intratumoral heterogeneity for inactivating frameshift mutation of CYB5R2 gene in colorectal cancers. *Pathol. Oncol. Res.* 2020. 26. P. 585–586.
 34. Yablokov E., Florinskaya A., Medvedev A., Sergeev G., Strushkevich N., Luschik A. et al. Thermodynamics of interactions between mammalian cytochromes P450 and b5. *Arch Biochem Biophys*. 2017. 619. P. 10-15.
 35. Henderson C.J., McLaughlin L.A., Finn R.D., Ronseaux S., Kapelyukh Y., Wolf C.R. A role for cytochrome b5 in the In vivo disposition of anticancer and cytochrome P450 probe drugs in mice. *Drug Metab Dispos*. 2014. 42(1). P. 70-77.
 36. Heintze T., Klein K., Hofmann U., Zanger U.M. Differential effects on human cytochromes P450 by CRISPR/Cas9-induced genetic knockout of cytochrome P450 reductase and cytochrome b5 in HepaRG cells. *Sci Rep*. 2021. 11(1). P. 1000.

37. Weaver J.A., Beverly B.E.J., Keshava N., Mudipalli A., Arzuaga X., Cai C. et al. Hazards of diethyl phthalate (DEP) exposure: A systematic review of animal toxicology studies. *Environ Int.* 2020. 145. P. 105848.
38. Mariana M., Lorigo M., Feiteiro J., Castelo-Branco M., Soares A.M., Cairrao E. Adverse cardiovascular effects of long-term exposure to diethyl phthalate in the rat aorta. *Chemosphere.* 2023. 340. P. 139904.
39. Gutiérrez-García A.K., Torres-García D.A., De Leon-Rodriguez A. Diethyl phthalate and dibutyl phthalate disrupt sirtuins expression in the HepG2 cells. *Toxicol Res (Camb).* 2024. 13(4). tfae103.
40. Lin G., Gao J., Shang S., Zhang H., Luo Q., Wu Y. et al. Tetradecanol, diethyl phthalate and tween 80 assist in the formation of thermo-responsive azoxystrobin nanoparticles. *Molecules.* 2022. 27(22). P. 7959.
41. Perpetuo E.A., da Silva E.C.N., Karolski B., do Nascimento C.A.O. Biodegradation of diethyl-phthalate (DEP) by halotolerant bacteria isolated from an estuarine environment. *Biodegradation.* 2020. 31(4-6). P. 331-340.
42. Langer S., Bekö G., Weschler C.J., Brive L.M., Toftum J., Callesen M. Et al. Phthalate metabolites in urine samples from Danish children and correlations with phthalates in dust samples from their homes and daycare centers. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2014. 217. P. 78–87.
43. Wan H.T., Leung P.Y., Zhao Y.G., Wei X., Wong M.H., Wong C.K. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. *J. Hazard. Mater.* 2013. 261. P. 763–769.
44. Fromme H., Gruber L., Seckin E., Raab U., Zimmermann S., Kiranoglu M. et al. Phthalates and their metabolites in breast milk—results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environ. Int.* 2011. 37. P. 715–722.
45. Cantú Reinhard F.G., De Visser S.P. Biodegradation of cosmetics products: a computational study of cytochrome P450 metabolism of phthalates. *Inorganics.* 2017. 5(4). P.77.
46. Choi K., Joo H., Campbell J.L., Jr. Clewell R.A., Andersen M.E., Clewell H.J. In vitro metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by various tissues

- and cytochrome P450s of human and rat. *Toxicol. In Vitro* 2012. 26. P. 315–322.
- 47.Poulos T.L. Heme enzyme structure and function. *Chem. Rev.* 2014. 114. P. 3919–3962.
- 48.Mondal S., Mukherjee S.. Long-term dietary administration of diethyl phthalate triggers loss of insulin sensitivity in two key insulin target tissues of mice. *Human & Experimental Toxicology*. 2020. 39(7). P. 984-993.
- 49.Schenkman J.B., Cinti D.L. Preparation of Microsomes with Calcium. *Methods in Enzymology*.1978; 52, part c: P. 83-89.
- 50.Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem*. 1964. 239(7). P. 2379-2385.
- 51.Lowry O.H., Rosenbrough M.J., Farr A.L., Rendal R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. 193 (1). P. 265-275.
- 52.Shymanskyi I.O., Ketsa O.V., Marchenko M.M., Veliky M.M. Liver cytochrome P450-hydroxylation system of tumor-bearing rats under the influence of ω -3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D3. *Ukr Biochem J*. 2018. 90(4). P. 36-44.
- 53.Valério GN, Gutiérrez-Merino C, Nogueira F, Moura I, Moura JJG, Samhan-Arias AK. Human erythrocytes exposure to juglone leads to an increase of superoxide anion production associated with cytochrome b(5) reductase uncoupling. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2020;1861(2):148134.
- 54.Malacarne PF, Ratiu C, Gajos-Draus A, Müller N, Lopez M, Pflüger-Müller B. et al. Loss of endothelial cytochrome P450 reductase induces vascular dysfunction in mice. *Hypertension*. 2022;79(6):1216-1226.
- 55.Sinha S, Shen X, Gallazzi F, Li Q, Zmijewski JW, Lancaster JR Jr. et al. Generation of reactive oxygen species mediated by 1-hydroxyphenazine, a virulence factor of *pseudomonas aeruginosa*. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(2):175-81.
- 56.Gable JA, Tripathi S, Poulos TL. Structural insights on the conversion of cytochrome P450 to P420. *ACS Omega*. 2022;7(22):18481-18485.

57. Barnaba C, Ravula T, Medina-Meza IG, Im SC, Anantharamaiah GM, Waskell L. et al. Lipid-exchange in nanodiscs discloses membrane boundaries of cytochrome-P450 reductase. *Chem Commun (Camb)*. 2018;54(49):6336-6339.
58. Ketsa O., Shvets A., Marchenko M. Enzymatic and non-enzymatic link components of antioxidant defence in subcellular fractions of rat liver under the influence of diethyl phthalate. *Biologichni Studii*. 2024; 18(1): 57–68.
59. Cai W, Yang J, Liu Y, Bi Y, Wang H. Association between phthalate metabolites and risk of endometriosis: a meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(19):3678.

ДОДАТКИ

Додаток А

Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

1. Працювати в лабораторії необхідно в халаті, захищаючи одяг і шкіру від попадання і роз'їдання реактивами і забруднення мікроорганізмами.
2. Приступаючи до роботи, необхідно: усвідомити методику роботи, правила її безпечного виконання; перевірити відповідність взятих речовин тим речовинам, які вказані в методиці роботи.
3. Дослід необхідно проводити в точній відповідності з його описом в методичних вказівках, особливо дотримуватися черговості додавання реактивів.
4. Для виконання дослідів користуватися тільки чистим, сухим лабораторним посудом; для відмірювання кожного реактиву потрібно мати мірний посуд (піпетки, бюретки, мензурку, мірний циліндр або мірна склянка); не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад у тару, щоб не зіпсувати реактив.
5. Якщо в ході дослідів потрібно нагрівання реакційної суміші, треба слідувати передбаченим методичним вказівкам способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці або на газовому пальнику та ін. Сильно летючі горючі речовини небезпечно нагрівати на відкритому вогні.
6. При роботі з водяною банею не можна пробувати ступінь нагріву води рукою. При несправності в роботі електроприладу необхідно звернутися до викладача.
7. Ремонтувати самостійно прилади забороняється.
8. У лабораторії забороняється приймати їжу, пити воду.
9. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами. При випадковому попаданні біологічного матеріалу на стіл, руки, потрібно провести обробку дезінфекційним розчином (наприклад, хлораміном). Після роботи необхідно ретельно вимити руки з використанням дезінфекційних засобів.
10. По закінченні роботи слід привести в порядок своє робоче місце: помити посуд, протерти поверхню робочого лабораторного столу, закрити водопровідні крани, вимкнути електричні прилади.

Правила техніки безпеки при роботі з центрифугою

- Не працювати з незаземленою центрифугою.
- Забороняється завантажувати в пробірки-тримач центрифуганта понад 10 мл.
- Забороняється працювати з різницею мас більше 2 г на діаметрально розташованих гільзах або пробірках, заповнених центрифугантом.
- Забороняється при роботі зі скляними пробірками завантажувати їх центрифугантом щільністю більше 1,5.
- Забороняється відкривати кожух під час руху ротора.
- Забороняється експлуатація центрифуги і розетки в несправному вигляді.
- Забороняється розкривати і ремонтувати центрифугу самим.

Правила техніки безпеки при роботі з фотоелектрокалориметром і спектрофотометром

1. Прилади мають бути заземлені.
2. Під час профілактичних робіт прилади повинні бути відключені від мережі.
3. Забороняється експлуатація спектрофотометра при знятих кожухах приладу і освітлювача і знятої кришки стабілізатора.
4. Забороняється відкривати прилад, працювати на несправному приладі, залишати прилад включеним без нагляду.
5. Робота на фотоелектроколориметрі повинна проводитися в чистому приміщенні, вільному від пилу, парів кислот і лугів.
6. Поблизу колориметра не повинні розташовуватися громіздкі вироби, що створюють незручності у роботі оператора.
7. Регулювальні роботи, пов'язані з проникненням за постійні огороження до струмоведучих частин колориметра, зміна ламп, заміна несправних деталей, повинні проводитися після від'єднання колориметра від електромережі.

Заходи надання першої допомоги

1. При роботі в біохімічній лабораторії найбільш вірогідними випадками є пошкодження, пов'язані з необережним поводженням з хімічними реактивами, вогнем і електронагрівальними приладами, скляним посудом, аваріями лабораторного обладнання.

2. При опіках хімічними речовинами, особливо кислотами і лугами, уражену ділянку шкіри швидко промивають великою кількістю води, а потім на обпечене місце накладають примочку: при опіках кислотою з 2% розчином питної соди; при опіках лугами з 2% розчином оцтової кислоти.

3. При термічних опіках обпечене місце присипають двовуглекислим натрієм (питна сода), крохмалем або тальком, або прикладають примочки з 96% етилового спирту, 2% свіжоприготованим розчином питної соди або 2% розчином перманганату калію. Потім змащують уражене місце маззю від опіків. При важких опіках потерпілого слід негайно відправити до медпункту.

4. При отруєнні парами шкідливих і отруйних речовин вивести постраждалого на чисте повітря, при необхідності зробити штучне дихання, дати протиотруту (молоко), викликати лікаря або відправити до медпункту.

