

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

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

**ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У
МІКРОСОМНІЙ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ДИЕТИЛФТАЛАТУ**

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

Виконав:

Студент 6 курсу, 600М групи

Тонюк Святослав Володимирович

Керівник:

д.б.н., професор **Марченко М.М.**

До захисту допущено

На засіданні кафедри

Протокол №_____ від _____ 2024

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2024

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню активності утворення продуктів пероксидного окислення ліпідів, викликане активними формами кисню за умови споживання диетилфталату.

Встановлено, що у мікросомній фракції печінки щурів, які споживали диетилфталат у різних концентраціях, спостерігається виражене підвищення нагромадження продуктів процесу. У ході дослідження нами зафіксована одночасне збільшення утворення первинних, вторинних та кінцевих продуктів процесу.

Показано, що у мікросомній фракції печінки щурів, які отримували раціон з диетилфталатом у різних концентраціях, зокрема 2,5 мг/кг протягом 14 та 21 дня спостерігали підвищення генерації продуктів ПОЛ, при збільшенні концентрації до 5,4 мг/кг вміст продуктів підвищився.

Отже, максимальна активність генерації продуктів ПОЛ, а також діяльність антиоксидантної системи спостерігається за умови споживання диетилфталату у концентрації 5,4 мг/кг протягом 21 дня експерименту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пероксидне окислення ліпідів, диетилфталат, мікросоми, печінка, активні форми кисню, дієнові кон'югати, кетодієни, спряжені трієни, Шиффові основи.

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study of the activity of the formation of products of lipid peroxidation, caused by active forms of oxygen under the condition of consumption of diethyl phthalate.

It was established that in the microsomal fraction of the liver of rats that consumed diethyl phthalate in various concentrations, a pronounced increase in the accumulation of process products was observed. During the research, we recorded a simultaneous increase in the formation of primary, secondary and final products of the process.

It was shown that in the microsomal fraction of the liver of rats that received a diet with diethyl phthalate in various concentrations, in particular, 2.5 mg/kg for 14 and 21 days, an increase in the generation of LPO products was observed, when the concentration increased to 5.4 mg/kg, the content of products increased.

Therefore, the maximum activity of the generation of POL products, as well as the activity of the antioxidant system, is observed under the condition of consumption of diethyl phthalate at a concentration of 5.4 mg/kg during the 21 days of the experiment.

KEY WORDS: lipid peroxidation, diethyl phthalate, microsomes, liver, reactive oxygen species, diene conjugates, ketodienes, conjugated trienes, Schiff bases

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

_____ С.В. Тонюк

ЗМІСТ

	ВСТУП.....	5
	..	
РОЗДІЛ 1.	ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1	Структурна характеристика та метаболізм диетилфталату.....	7
1.2	Механізм дії фталатів та вплив на організм.....	11
1.3	Пероксидне окислення ліпідів. Механізм дії.....	17
1.4	Продукти ПОЛ та їх вплив на організм.....	20
1.5	Генерація АФК у мітохондріях та мікросомах.....	25
РОЗДІЛ 2.	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	28
2.1.	ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	28
РОЗДІЛ 3.	РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	32
	ВИСНОВКИ.....	45
	..	
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	46
	ДОДАТКИ.....	54
		

ВСТУП

Фталати – група напівлетких органічних речовин, представлені складними ефірами 1,2-бензолдикарбонової кислоти. На сьогодні ці сполуки володіють широким спектром застосування, у різних сферах діяльності людини завдяки пластифікації. Вони здатні вимиватися, засмічувати повітря, випаровуючись із димом, міститися у харчових продуктах, а також медичних пристроях тощо. В організм ці сполуки здатні потрапити наступним чином: орально – внаслідок ковтання, назально – при вдиханні з повітрям, а також перкутанно. Організм піддається впливу цих сполук навіть в утробі через плаценту, що призводить до патологічних процесів плоду [1-3].

Після потрапляння ефірів фталевої кислоти в організм розпочинається його метаболізм, який може тривати до 12 годин. На першому етапі біотрансформації відбувається гідроліз фталатів з утворенням мономеру – гідрофобного моноетилфталату. Моноетилфталат (МЕФ) володіє одним складноефірним зв'язком та здатний входити у другу фазу біотрансформації ксенобіотиків – кон'югації, яка передбачає зв'язування з гідрофільним глюкоронідом, після чого виводиться з організму в складі сечі та фекалій [4, 5]

Однією із властивостей фталатів є утворення вільних радикалів що проявлятиметься процесами ліпопероксидного окислення. Процес пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) передбачає зміну ліпідного оточення клітини внаслідок утворення вільних радикалів, які вступають в реакції з ліпідами, особливо поліненасиченими жирними кислотами (ПНЖК) та утворенню продуктів процесу, які також проявлять токсичні властивості [6].

Внаслідок процесу утворюються 3 групи продуктів – первинні, до яких належать дієнові кон'югати (ДК), кетодієнами (КД), спряженими трієнами (СТ), вторинні – предсталені малоновим діальдегідом (МДА), 4-гідроксиноненалем (4-HNE) тощо та третинними, або як їх ще називають кінцевими – основи Шиффа. Завдяки дослідженню нагромадження вищеперелічених продуктів можна реєструвати процес ПОЛ в організмі [7].

Враховуючи вище вказане **метою роботи** стало оцінити інтенсивність утворення активних форм кисню та пероксидного окиснення ліпідів у мікросомній фракції печінки щурів за дії різних доз диетилфталату.

Для досягнення мети були поставлені **завдання**:

1. Оцінити інтенсивність генерації супероксидного радикалу та пероксиду водню в мікросомній фракції печінки щурів за умови введення диетилфталату
2. Визначити вміст первинних – ДК, КД+СТ та вторинних – ТБК-активних продуктів пероксидного окиснення ліпідів у мікросомній фракції печінки щурів за умов введення диетилфталату.
3. Дослідити вміст та інтенсивність генерації кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів – основ Шиффа, як біохімічного маркера процесу ПОЛ за умови тривалого введення диетилфталату.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Структурна характеристика та метаболізм диетилфталату

Фталати, складні ефіри 1,2-бензолдикарбонової кислоти (рис 1.1.) – це група напівлетких органічних речовин, котрі мають широкий спектр застосування: промисловість – пластифікатори з метою вироблення пластмаси, а саме утворення полівінілхлориду; косметологія та сфера краси – створення засобів для волосся; медицина – медичні пристрої та фармацевтичні препарати. Їхня структура та властивості змінюється в залежності від кількості бічних ланцюгів, утворених диалкільними, алкільними або арильними групами. Від довжини ланцюга залежить їх розчинність: зі збільшенням довжини ланцюга знижується розчинність у воді, та підвищується розчинність в жирах, також спостерігається підвищення температури кипіння. Похідні фталатової кислоти добре розчинні у органічних розчинниках. Зокрема розрізняють низку цих речовин в залежності від їх хімічної структури: диетилфталат (ДЕФ), диетилгексилфталат, диізононілфталат та багато інших [1, 8, 9].

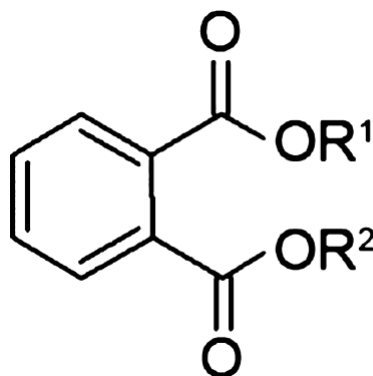


Рис. 1.1. Загальна хімічна структура ефірів фталевої кислоти

Сфера застосування фталатів залежить від їх молекулярної маси: низько молекулярні фталати використовуються як складові оздоблювальних матеріалів (плитка, лаки, герметики, зварні шви та покриття). Прикладами таких фталатів є: диметилфталат (ДМФ), диетилфталат (ДЕФ), бутилбензилфталат (ББзФ), ди-ізо-бутилфталат (ДіБФ), ди-н-бутилфталат (ДБФ) і ди-циклогексилфталат (ДЦГФ) [10].

Стосовно ж високомолекулярних – їх застосовують у будівництві, іграшках, поліетилен етерфталатних пляшках та харчових упаковках. Цей тип

фталатів представлений диетилгексил (2-етилгексил) фталат (DEHP), ди-ізо-нонілфталат (DiNP), ди-ізо-децилфталат (DiDP) та ди-п-октилфталат (DOP) [11].

Саме через масове використання фталати виявляють у низці біологічних систем: водойми, у тому числі підземні, повітря, а також ґрунти [12]. Найчастіше використовують та виявляють саме диетилфталат, частота виявлення саме цього виду РАЕ становить ~60% [13].

Диетил фталат (диетилбензол-1,2-дикарбоксилат (IUPAC), ДЕФ, $C_{12}H_{14}O_4$, $C_6H_4(COOC_2H_5)_2$, № 84-66-2) – безбарвна масляниста, поганорозчинна у воді прозора рідина, яка не має запаху (рис 1.2.) [14].

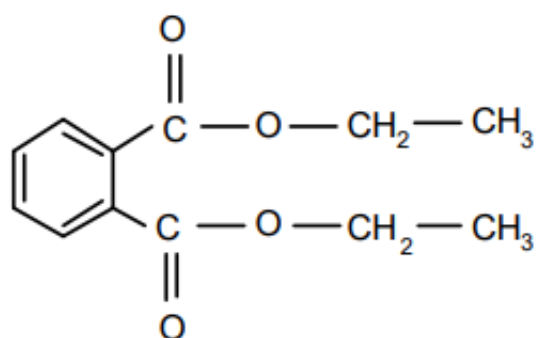


Рис. 1.2. Структурна формула диетил фталату

Речовина виробляється промисловим шляхом реакції між фталевим ангідридом та етанолом, каталізатором є концентрована сірчана кислота. Чистота цих ефірів становить 99,7 % - 99,97 %, тоді як основними домішками виступають кислоти – ізофталева та терефталева, а також малеїновий ангідрид (рис 1.3.) [15].

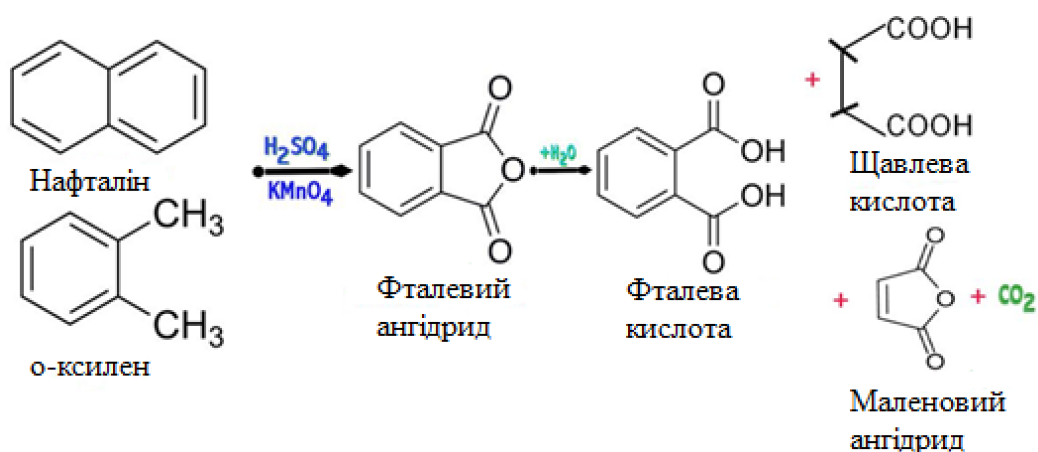


Рис. 1.3. Схема синтезу фталевої кислоти

Як і кожна речовина диетилфталат володіє низкою фізичних та хімічних властивостей (табл 1.) [15, 16]:

Таблиця 1.1

Фізико-хімічні властивості диетил фталату

Фізичні властивості	
Температура плавлення	- 40,5*С
Температура кипіння	298*С (295-302 *С)
Температура займання	161 *С
Щільність	1,120 г/л при 25*С
Тиск пари	< 0,001 торр при 20 *С
Log P _{ow} (співвідношення октанолу до води)	2,47 (1,4 – 3,3)
Константа закону Генрі	7,8 * 10 ⁻⁷ атм м ³ /моль
Хімічні властивості	
Молекулярна маса	222,3
Кислотність як фталева кислота	<= 0.01
Вміст води	<= 0,05%
Вміст складного ефіру	>=99 %

Основним джерелом забруднення фталатами є промисловість саме через пластикові відходи виробництва. Фталати вимиваються з цих відходів та широко розповсюджуються. Фталати легко вмиваються у продукти харчування (молочні продукти, морепродукти та риба, олія), воду, а також наносяться на тіло, здійснюючи свій вплив. Основними органами локалізації фталатів є нирки та печінка, а також жирова тканина [1, 17].

Виявлено 3 основних шляхи потрапляння фталатів у організм: перорально внаслідок ковтання з продуктами харчування або у складі ліків, респіраторно із

вдиханням викидів забрудненого повітря та перкутанно при контакті зі шкірою. Найчастіше фталати потрапляють в організм саме із продуктами харчування. Референтна доза спожитих фталатів на добу становить 20 мкг, тоді як допустима – 50 мкг [2, 8, 18].

ДЕФ піддається як природному перетворенню так і перетворенню в організмі. Основні природні шляхи розпаду представлені гідролізом, який відбувається у водному середовищі та не може повністю мінералізувати речовину; фоторозкладанням, котре не потребує зусиль, тільки величезної кількості часу. Період фоторозкладання триває роками; мікробна деградація – біоперетворення, саме цей шлях розкладу ДЕФ вважають найдосконалішим завдяки його швидкості та здатності повністю мінералізувати сполуку [12].

Фталати утворюються під час взаємодії фталевого ангідриду і алкоголю. Їх хімічна структура складається з ковалентно зв'язаного бензольного кільця і двох карбонових кислот. При потраплянні в організм фталати піддаються перетворенню (рис. 1.4.). Цей процес досить швидкий – 12 годин [1, 4, 8].

Швидкість метаболізму залежить типу фталату – від його структури. Так, короткорозгалужені фталати потребують меншої кількості біоперетворень порівняно зі складнорозгалуженими [1].

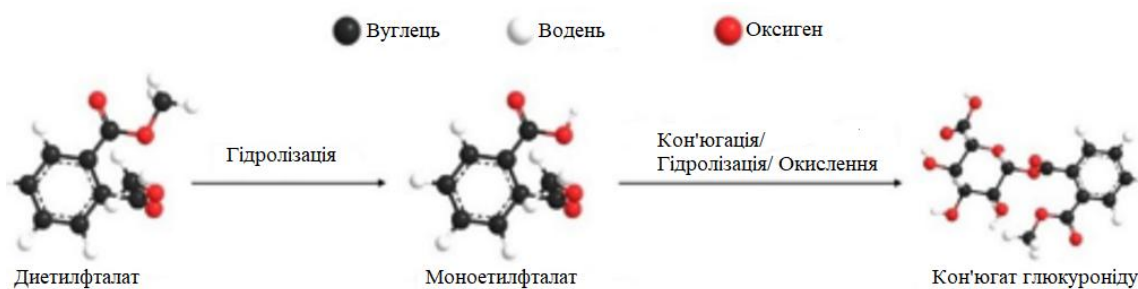


Рис. 1.4. Схема біоперетворення фталатів в організмі людини.

Процес метаболізму включає у себе 2 етапи: Гідроліз та кон'югація. Під час першої фази фталати гідролізуються до біологічно активніших метаболітів – моноефір фталатів (МЕФ), реакція каталізується естеразою (розчеплює специфічні – О – зв'язки фталату з утворенням моноефіру та спирту) та ліпазою

кишечнику та паренхімі. Короткорозгалужені фталати зразу виділяються із сечею у вигляді моноефірних фталатів, вільній формі. Довгорозгалужені фталати перед виведенням з організму піддаються низці біотрансформацій, з утворення біологічно активних метаболітів, включаючи гідроксильовання та окислення з утворенням кінцевого продукту – кон'югованих сполук у другій фазі (рис 1.5.) [5, 9, 19, 20].

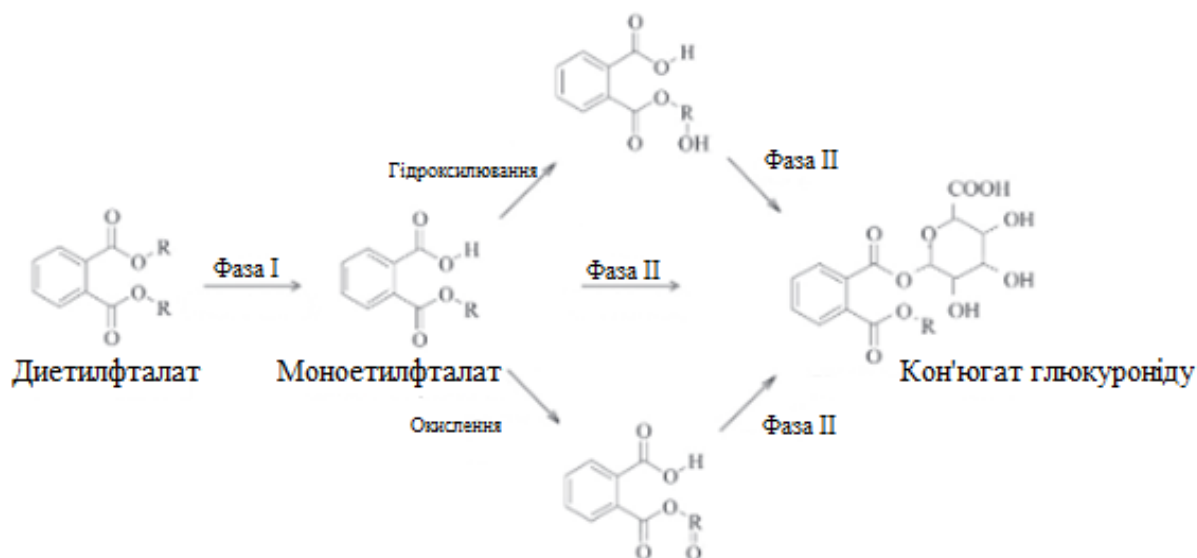


Рис. 1.5. Схема метаболізму диетилфталату в організмі людини

Друга фаза передбачає кон'югацію МЕФ з утворенням менш біологічно активного гідрофільного кон'югату глюкуроніду. Реакція каталізується ензимом Уридиндифосфат-глюкуроніл трансферази (УДФ-глюкуроніл трансферази, Уридин-59-дифосфоглюкоронілтрансферазою). Отриманий в ході цієї реакції гідрофільний глюкуронідний кон'югат виводиться з організму разом із фекаліями та сечею [5, 20].

Отже, метаболізм ДЕФ здійснюється ферментами двох фаз біотрансформації ксенобіотиків, у результаті чого утворюються проміжні продукти, які можуть бути індукторами вільнорадикальних процесів

1.2. Механізм дії фталатів та вплив на організм

Впливу фталатів піддаються усі організми, у тому числі і люди впродовж життя, оскільки саме ці сполуки є основними та трапляються найчастіше в побуті

та здійснюють свій негативний вплив на організм. Для здійснення біологічної дії потрібна їх мала кількість – причиною є їх явище «немонотонна токсичність», тобто висока біологічна активність при низьких дозах [3, 21].

Фталати проникають через плацентарно-кров'яний бар'єр плода, у немовлят потрапляють в організм декількома способами: під час смоктання іграшок, що містять диетилгексилфталат, диізононілфталат, а також через грудне молоко матері, яке містить ці речовини (рис 1.6.) [3, 22, 23].

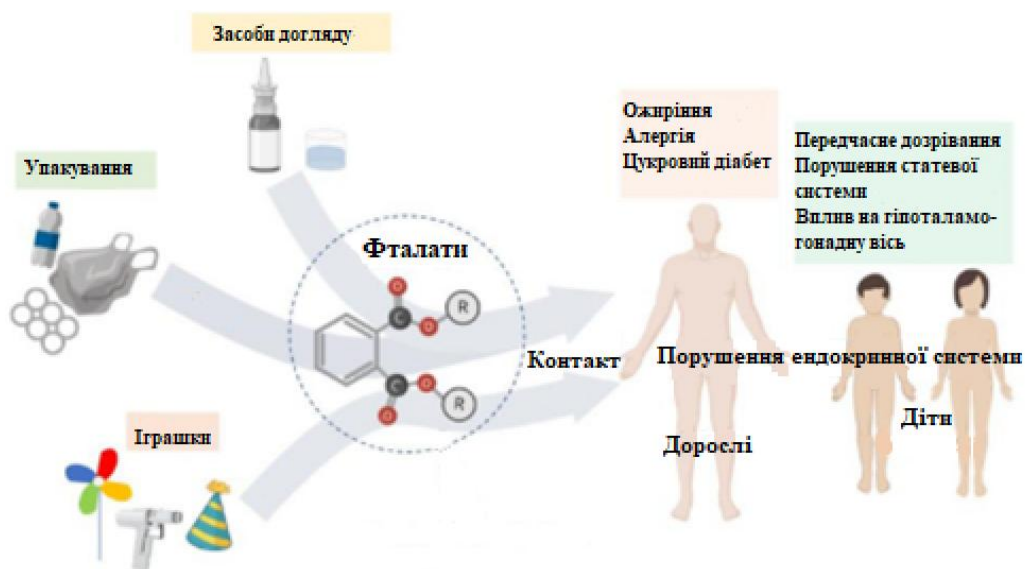


Рис. 1.6. Джерела фталатів

Фталати здатні впливати на різні системи організму: ендокринну систему – викликаючи вивільнення гіпоталамних, гіпофізарних, а також периферичних гормонів, а також із глобулінами, які беруть участь у зв'язуванні гормонів, кровоносна система, шляхом взаємодії з гемоглобіном, змінюючи його конформацію [24]. Вплив на статеву цих речовин проявляється таким чином: порушення функції статевих органів, дисгенезису яєчка, порушення темпу дозрівання, перебігу вагітності, а також канцерогенез у репродуктивних органах чоловіків та жінок [8]. Доведено вплив фталатів на внутрішньоклітинному рівні: ядерні рецептори, мембранні структури, внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, а також модулювати експресію генів, що відповідають за розмноження [25], окрім

цього ці сполуки призводять до оксидативного стресу організму, особливо вагітних [26].

Фталати, завдяки своїм властивостям зв'язуватися із рецепторами ядерних гормонів, тим самим впливаючи на їх будову та властивості, називають ендокринними руйнівниками [24].

Найбільш вразливою до дії фталатів є рецептори гіпоталамо-гонадної системи (ГГС). При взаємодії системи із ксенобіотиком спостерігається порушення діяльності осі на різних регуляторних ділянках. Внаслідок взаємодії спостерігаються зміна рівнів низки гормонів: лютеїнізуючий, фолікулостимулюючий, а також гонадотропін-рилізінг-гормон. Результатом зміни рівнів вищезгаданих гормонів – є порушення активності стероїдогенних ензимів, та подальший синтез стероїдних гормонів – підвищення або зниження [8].

Окрім рецепторів та ензимів фталати споріднені і до транспортних білків – глобуліну, який зв'язує статеві гормони. Зокрема із гормонами організму за можливість зв'язатися із глобулінами-транспортери конкурують високомолекулярні та низькомолекулярні метаболіти фталатів. Перші, володіють вищою спорідненістю. Саме через ці особливості виникає дисбаланс статевих гормонів [27].

Спорідненість фталатів до рецепторів полягає у подібності хімічної структури – фталево-бензольне кільце є ідентичним до стероїдного кільця А, яке є складовою рецепторно-зв'язаних лігандів. [28].

Вразливими до дії фталатів є естрогенові (ЕР) та андрогенові (АР) та ядерні рецептори. Ці сполуки виступають блокаторами для вищезгаданих рецепторів. При зв'язуванні фталату з ЕР та АР виникає порушення формування сигнальних молекул та вплив на тканини-мішені. До тканин-мішеней належать ендометрій, шкіра, тканина наднирників, жирова тканина, тканини статевих та молочної залоз [29].

Вплив фталатів на ядерні рецептори вперше описали Бжозовський [30] та Джордже [31] зі своїми колегами ще на початку 2000-х. Вони дослідили та описали дві антагоністичні дії на ядерні рецептори [8].

Перша форма антагонізму проявляється відбувається наступним чином: Фталати (P) утворюють комплекс із ER та AP, тим самим утворюючи анти-естрогени та андрогени. Антиандрогени та антиестрогени доставляють фталат через цитоплазматичну мембрану, де він зв'язується із ядерним рецептором (NR), який у свою чергу зв'язаний із шаперонами (HSP). Через приєднання фталату змінюється структура усього комплексу. Внаслідок зміни структури утворений комплекс – фталат-ядерний рецептор – шаперони залишається в неактивному стані та не проходить через ядерну мембрану. Внаслідок цього він не взаємодітиме із гормональними елементами відповіді (HRE), та не запустить процес ініціації транскрипції. (рис 1.7.) [8, 11].

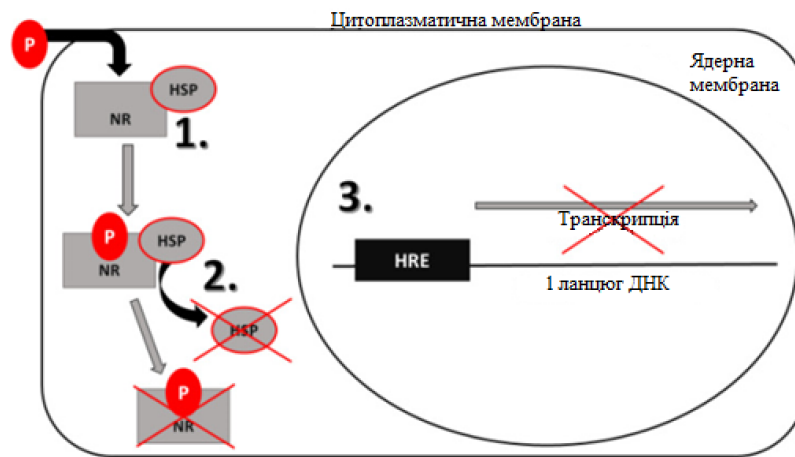


Рис. 1.7. Вплив фталатів на ядерний рецептор. Активна форма антагонізму – фталат блокує конформаційну зміну комплексу з ядерним рецептором

Примітка: P – фталат; NR – ядерний рецептор; HSP – шаперон.

Друга форма антагонізму значно відрізняється від попередньої: Фталат (P) при потраплянні через цитоплазматичну мембрану зв'язується із комплексом ядерний рецептор (NR) – шаперон (HSP). Після цього шаперони дисоціюють від комплексу фталат – рецептор, а комплекс проходить через ядерну мембрану та зв'язується із гормональними елементами відповіді (HRE), де ко-активатори повинні зв'язатися із структурою. Проте через наявність фталату ко-активатори

не можуть вступити у взаємодію, внаслідок чого пригнічується процес транскрипції (рис 1.8.) [8, 11].

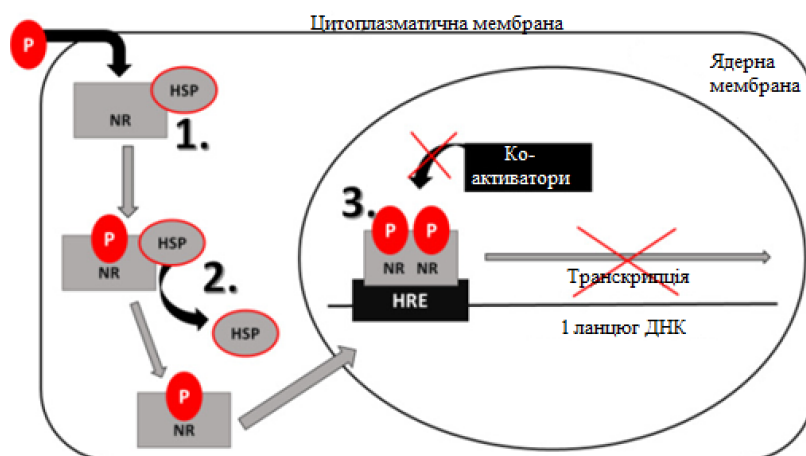


Рис. 1.8. Вплив фталатів на ядерний рецептор.

Фталат перешкоджає утворенню правильної конформації для взаємодії з коактиватором

Примітка: P – фталат; NR – ядерний рецептор; HSP – шаперон; HRE – гормональні елементи відповіді.

Гормональні порушення гіпоталамо-гонадної системи веде за собою порушення функціонування та появу патологій репродуктивної системи [11].

Репродуктивна токсичність фталатів залежить від їх структури – довжини бічного ланцюга. Так, дієфіри фталевої кислоти із довжиною бічного ланцюга 4-6 атомів С можуть здійснювати свій вплив на репродуктивну систему [32].

Репродуктивна система найбільш вразлива до дії цих речовин в період гонадогенезу – 5-18-й тиждень вагітності [17].

Вплив фталатів на репродуктивну систему є чоловіків полягає у пригніченні вироблення тестостерону, що призводить до появи так званого «Фталатного синдрому». Цей синдром характеризується низкою ефектів: недорозвинення статевих органів, криптохізм, зниження аногенітальної відстані, затримка сосків, токсичність статевих клітин [8, 17].

Чоловіча репродуктивна система піддається дії фталатів на клітинному рівні. Зазвичай впливу піддаються клітини Сертолі та Лейдіга, що спричиняє

зміну зовнішньої структури та втрату маси органу. Окрім цього, спостерігається вади будови, кількості та життєдіяльності сперматозоїдів: зниження рухливості та концентрації на одиницю об'єму, поява декількох голівок та хвостів у сперматозоїда [33].

Жіноча статева система, піддана впливу фталатів страждає низкою патологій: передчасне дозрівання, ендометріоз, полікістоз яєчників (2-етил-5-гідроксигексил фталат). Також із впливом фталатів пов'язують зниження продукції естрадіолу (моно етил-гексил фталат), ускладнення вагітності, що проявляється у вигляді анемії та токсемії. Окрім цих патологій фталати пригнічують стероїдогенез гранульованих клітин яєчників та здатні здійснювати канцерогенний вплив [34, 35].

Завдяки ліпофільності фталати легко вбудовуються в мембрану еритроциту, внаслідок чого прискорюється руйнування еритроциту, взаємодіє із гемоглобіном, змінюючи його структуру та функції, що, в свою чергу, призводить до анемії. Досліджено, що внаслідок впливу фталатів відбувається збільшується їх гнучкість та деформація еритроциту за рахунок зменшення площі мембрани [24, 36].

При взаємодії еритроциту із фталатом – спостерігається підвищення вмісту метгемоглобіну та коливання рівня активних форм кисню. Саме через ці зміни виникають порушення діяльності та кількості як апоптичних, так і некротичних ензимів – збільшення супероксиддисмутази, каталази, зниження малатдегідрогенази та глутатіонпероксидази [21, 37].

Фталати також спонукають синтез фосфатидилсеринових еритроцитів. Процес закачування фосфоліпідів у клітинну мембрану відбувається за умови підвищення кальцію. Збільшення концентрації іонів кальцію запускає фермент скремблазу, яка активує вище згадану реакцію. Окрім цього, виникає збільшення кальпаїну – типу білку цистеїну. Цей білок спричиняє зміни еритроциту: проколізація білків цитоскелету, порушує структуру клітинної мембрани, ускладнює мікроциркуляцію [37].

Враховуючи проведення дослідження щодо впливу цих речовин, постає нагальна потреба у зниженні кількості використання пластмас та схожих продуктів-джерел цих речовин, а також сприяти та шукати найбезпечніші шляхи її утилізації.

1.3. Механізми пероксидного окислення ліпідів

Екзогенні фактори, до яких відносяться ксенобіотики можуть призводити до утворення АФК. У результаті чого в клітинах та тканинах організму буде спостерігатись неконтрольований окисний стрес. В організмі АФК утворюються в різних клітинних структурах: мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум (ЕПР) та мікросоми, та акумулюються в печінці. АФК можуть впливати на біологічні молекули у клітині призводячи до їх окислення. В першу чергу окисленим модифікаціям піддаються ліпіди клітин за рахунок процесу ліпопероксидації [38].

Пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ) – процес при якому окисники – вільні радикали, уражають поліненасичені ліпіди, в структурі який є подвійні карбонові зв'язки ($C=C$). Процеси ПОЛ відбувається у всіх клітинах, проте найінтенсивніше вільні радикали генеруються у лейкоцитах та тромбоцитах, окрім цього у гепатоцитах [39] Процес передбачає приєднання молекули кисню по $C-H$ зв'язку з утворенням гідропероксиду. Процес може відбуватися двома шляхами: ферментативним та неферментативним. [6, 7].

Окислення ліпідів відбувається радикалами, які містять кисень у своїй структурі та різну кількість електронів, завдяки якій вони легше реагують з іншими молекулами. Цей процес представлений двома типами реакцій: розгалужений тип реакції, що відбувається за наявності іонів металів змінної валентності та ланцюговою реакцією вільних радикалів, яка відбувається за їх відсутності [40].

Неферментативний шлях – «неферментативне автоокислення фосфоліпідів» передбачає наявність заліза для перебігу реакції та складається з трьох етапів: ініціація, поширення та зупинка [40, 41].

Етап ініціації передбачає ураження ліпідів різними радикалами, що призводить до утворення ліпідного радикалу ($L^\bullet$), орієнтованого на вуглець. У біологічних системах найчастіше атакуючими структурами є алкоксильний ($RO^\bullet$) та гідроксильний радикал ($HO^\bullet$), утворений в реакції Фентона [6, 7].

Під час фази поширення ліпідний радикал ($L^\bullet$) вступає у реакцію із киснем (O_2) з утворенням ліпідного пероксидного радикалу ($LOO^\bullet$). Ліпідний пероксидний радикал абстрагує атом водню з іншої ліпідної молекули з утворенням $LOOH^\bullet$. Ліпідна молекула, яка виступила донором водню (H) перетворюється на ліпідний радикал ($L^\bullet$), запускаючи ланцюгову реакцію. Основними продуктами цієї фази є гідропероксиди – первинні продукти ПОЛ, а також алкілпероксильні радикали. В залежності від структури окисленого ліпиду може спостерігатися утворення побічних продуктів – епоксиди та ендопероксиди [7, 42, 43].

Припинення ланцюгової реакції полягає у гасінні радикалів, тобто їх взаємодії між собою [44], внаслідок якого припиняється поширення ланцюга. Найкраще вивчені процесом термінації є механізм Рассела. Цей механізм полягає в утворенні тетраоксиду, який розкладається на карбонільні сполуки та синглетний кисень, який є менш реактивоздатним (рис 1.9.) [6, 7, 42].

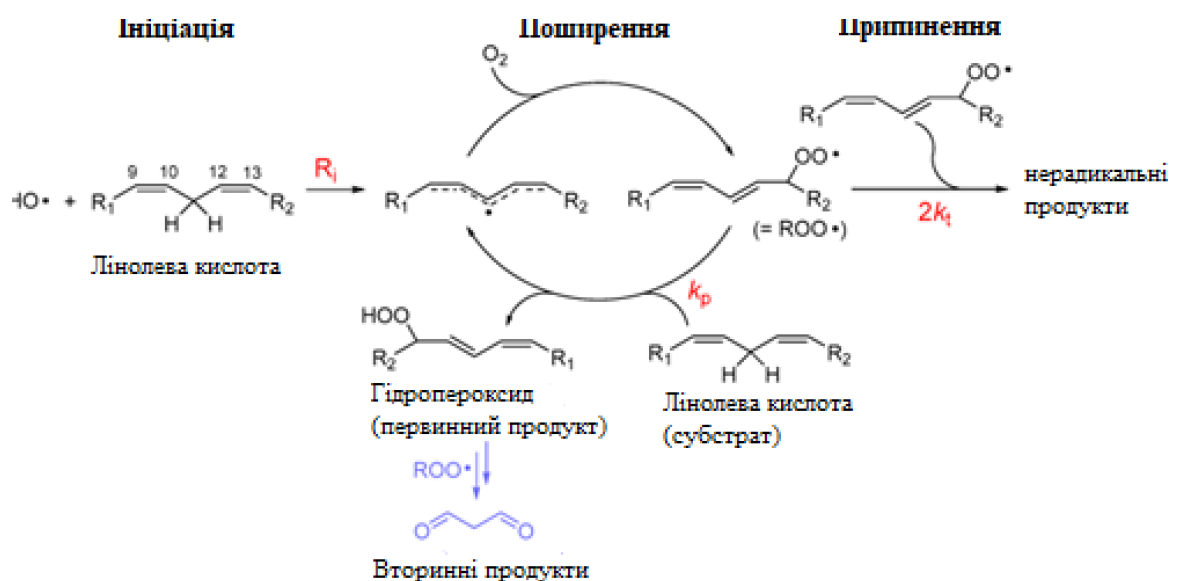


Рис. 1.9. Процес неферментативного пероксидного окислення ліпідів

[illegible]

комплексу рожевого кольору. За інтенсивністю забарвлення визначають рівень ПОЛ [41].

1.4. Продукти ПОЛ та їх вплив на організм

Процес ПОЛ завершується утворенням різних продуктів: гідропероксид ліпідів, дієнові кон'югати, кетодієни та спряжені трієни, ТБК-активні сполуки (МДА, пропанал, гексаналь, 4-гідрокси-2-нональ), шиффові основи, а також світло. Їх поділяють на 3 групи: первинні, вторинні та третинні [7].

До первинних продуктів належать первинні гідропероксиди ліпідів та епоксиди. Ці сполуки є основними продуктами ПОЛ та утворюються під час фази поширення. Гідропероксиди ліпідів, порівняно з іншими продуктами володіють більшою стабільністю при помірних умовах реакції, які передбачають відсутність металів та перебіг реакції за низьких температур. При утворенні гідропероксиди взаємодіють з різними ліпідними структурами – триацилгліцеридами, вільними жирними кислотами, стеринами та фосфоліпідами [6].

Пероксиди водню можуть розкладатися *in vivo* шляхом відновлення електронів – одного або двох. Внаслідок типу розкладу відбуваються індукція – у першому випадку або пригнічення пероксидного пошкодження за умови відновлення двох електронів [42].

У процесі розкладу шляхом відновлення двох електронів задіяні селензалежні глутатіонпероксидази та селенопротеїни (SeP). Ензими каталізують відновлення органічних гідропероксидів чи пероксиду водню до води або відповідних спиртів, використовуючи глутатіон у якості відновника [46].

У випадку відновлення одного електрону гідропероксиди можуть брати участь у пероксидному окисненні ліпідів, зокрема на етапі ініціації та поширення. Отримані сполуки індують нові гідропероксиди та сприяють поширенню процесу на неуразені ліпіди [6].

Рівень гідропероксидів визначають у сироватці крові. Визначення цього продукту має діагностичне значення у виявленні окисного стресу в тканинах [6, 47].

Окрім вище згаданих первинних продуктів одне з ключових місць займають дієнові кон'югати (ДК) [48].

Дієнові кон'югати – проміжний продукт ПОЛ. Вони утворюються при вільнорадикальному окисненні арахідонової кислоти – відриву водню в α -положенні, з подальшим переміщенням утвореного подвійного зв'язку. Ці сполуки володіють токсичними властивостями, які проявляються у пошкодженні ліпопротеїнів, протеїнів, а також нуклеїнових кислот. У високих концентраціях викликає загибель клітин [49].

Окрім описаних вище первинних продуктів ПОЛ є ще й кетодієни (КД) – органічні сполуки які мають карбонільну (кетонну) групу – $C=O$, а також подвійний зв'язок ($C=C$) [50]. Ці сполуки утворюються внаслідок розкладання продуктів ПОЛ, які мають декілька подвійних зв'язків та кетонових груп [51].

Поряд із КД також визначають рівень спряжених трієнів (СТ) – сполук які містять три подвійних зв'язки, які чергуються із одинарними. Як і КД – СТ виникають при окисненні ПНЖК. Внаслідок реакції відбувається переміщення подвійних зв'язків з утворенням спряжених систем

Найбільш відомими вторинними продуктами серед карбонілів є 4-гідрокси-2-транс ноненаль (4-HNE), МДА, які виступають у якості біомаркерів ПОЛ [7].

4-HNE – є представником класу α , β -ненасичених альдегідів, які здатні вступати у гідрофільні реакції, зокрема утворення основи Шиффа – третинного продукту ПОЛ. 4-гідрокси-2-транс ноненаль – основний та найбільш цитотоксичний продукт ПОЛ [52].

4-HNE синтезується в організмі внаслідок ензиматичних та неензиматичних процесів. Після утворення метаболізується в організмі до менш цитотоксичних водорозчинних сполук [6].

Ферментативне утворення передбачає проведення чотирьох реакцій та утворення продукту [6, 7].

Неферментативне утворення починається із взаємодії ліпоєвої кислоти з радикалами, тим самим утворюючи 9- та 13-ліпідних радикалів. Ці радикали окислюються та утворюють відповідні пероксильні радикали. Далі шляхи утворення 4-HNE розгалужуються. Розрізняють два шляхи утворення продукту – 9-ліпідних радикалів. Одним із варіантів є β -Scission гідроксиалкоксилрадикалу. Другий варіант передбачає утворення 9,10 диоксиетану, який окислюється до перокси-диоксиетану. Далі утворена речовина двічі абстрагується воднем та фрагментується з утворенням 4-HNE. [52].

4-HNE катаболізується у мітохондріях трьома шляхами до низки менш токсичних сполук. При кон'югації із глутатіон s-трансферазою (КФ 2.5.1.18) утворюється глутатіон-HNE (GS-HNE). GS-HNE піддається подальшим перетворенням – відновлення до глутатіонілу-DNH (GS-DNH) та окислення до глутатіоніл-HNA (GS-HNA). Реакція відновлення каталізується NADH-залежною алкогольдегідрогеназою з утворенням GS-DNH. Другий шлях полягає у тому, що 4-HNE метаболізується до HNA, реакцію каталізує альдегіддегідрогеназа 2 (ALDH2), який метаболізується цитохромом P450 до 9-гідрокси-HNA (9-OH-HNA). 4-HNE під час метаболізму може утворювати спирт 1,4-дигідрокси-2-нонен (DHN), реакція каталізується алкогольдегідрогеназою (ADH) [6, 48, 52].

Період напіврозпаду досить короткий та залежить від кількості продукту, типу клітин, рівня глутатіону (GSH) [53].

В літературі [55] показано що HNE виявляється у здорових осіб, а його рівень в плазмі крові коливається від 0,3 до 0,7 мкМ [55], проте враховуючи вікові зміни організму, спостерігається підвищення цього продукту під час старіння [56] та за наявності патологій, пов'язаних з окислювальний стресом, такі як атеросклероз, діабет та судинні захворювання [53].

Іншим вторинним продуктом пероксидного окислення є малоновий диальдегід (МДА). МДА являє собою дикарбонільну сполуку [57].

МДА продукується в органі із ПНЖК шляхом ферментативних (синій шлях) та неферментативних (оранжевий шлях) процесів (рис.1.11) [6].

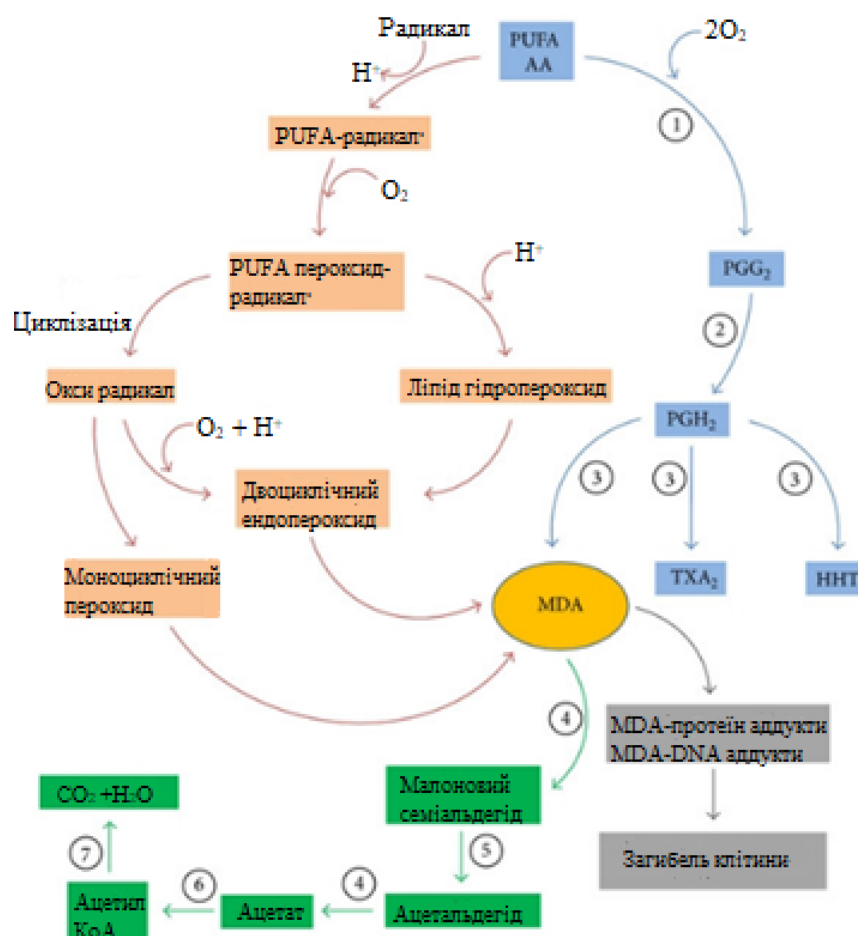


Рис. 1.11. Синтез та метаболізм маленового диальдегіду

Примітка: PUFA (ПЖНК) – поліненасичені жирні кислоти, PGG_2 – прогстонланди G_2 , PGH_2 – простогландин H_2 , HHT – 12-І-гідрокси-5,8,10-гептакарієнова кислота, MDA – маленовий диальдегід, TXA_2 – тромбоксан A_2

МДА синтезується *in vivo* при розкладанні ПЖНК (PUFA), зокрема арахідонової кислоти (20:4). як побічний продукт шляхом ферментативного біосинтезу є тромбоксан A_2 та 12-І-гідрокси- 5,8,10-гептадекатрієнову кислоту (HHT) [6].

Згідно літератури [57] ферментативний синтез МДА починається з процесу окислення ПЖНК з утворенням простагландину G_2 (PGG_2), який перетворюється

на простагландин H_2 (PGH_2), попередній продукт МДА. Тромбоксансинтеза каталізує синтез PGH_2 до наступних продуктів, серед яких є TXA_2 , ННТ та МДА.

Неферментативний синтез МДА передбачає взаємодію ПЖНК із радикалом, з утворенням ПЖНК-радикалу та виділенням протоном (H^+). Далі ПЖНК-радикал окислюється, внаслідок реакції утворюється ПЖНК-пероксидрадикал. На цьому етапі процес синтезу МДА може здійснюватися різними шляхами: за наявності протона, який взаємодіє із ПЖНК-пероксирадикалом утворюється ліпідний гідропероксид, який переходить у біциклічний ендпероксид – попередник МДА. Інший шлях передбачає перехід ПЖНК-пероксидрадикалу у циклічну сполуку – окси радикал. Окси радикал може перетворюватися у два попередники МДА: моно- та дициклічний ендпероксид. Для перетворення речовини у дициклічну сполуку відбувається приєднання кисню (O_2) та протону, тоді як утворення моноциклічного пероксиду не потребує додаткових затрат [50, 57].

В результаті обидва шляхи, як ензиматичний, так і не ензиматичний сходяться на МДА. Після отримання МДА, незважаючи від механізму його отримання, він здатний утворювати адукти із протеїнами (МДА-протеїн) або ДНК (МДА-ДНК) або метаболізуватися в організмі до кінцевих сполук, які будуть знешкоджуватися антиоксидантною системою [57, 58]

Згідно з літературою [55] метаболізм МДА починається з перетворення МДА на малоновий напівальдегід під дією альдегіддегідрогенази. Продукт цієї реакції перетворюється на ацетальдегід, реакції каталізує декарбоксилаза. Ацетальдегід взаємодіє з декарбоксилазою, з утворенням ацетату, що перетворюється на Ацетил-КоА за активності ацетил-КоА-синтази. Утворений ацетил-КоА вступає у цикл трикарбонових кислот. Саме МДА є основним маркером пероксидного окислення, яка легко виявляється у організмі за допомогою спектрофотометрії при взаємодії з тіобарбітуровою кислотою (ТБК).

Кінцеві, тобто третинні продукти ПОЛ є основи Шиффа, які утворюються при взаємодії маленового діальдегіду з білками та піддаються визначенню при довжині хвилі 400 нм [52].

1.5. Генерація АФК у мітохондріях та мікросомах

Усі окисно-регуляторні ензими, що беруть участь у процесі генерації АФК та органели в яких вони продукуються належать до спеціальної структури – так званого «окисно-відновний трикутник» (рис. 1.11). До складу трикутника входять пероксисоми, мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум. В складі цієї структури наявні специфічні ферменти – редоксоми, які містять в своєму складі шаперони ЕПР та оксидоредуктази, що призводить до ідентифікації процесу згортання окислювальних білків ЕПР. Процес згортання цих білків є ключовим маркером продукції АФК та контролює контактні ділянки триорганелової мембрани, яка утворилась в окисно-відновному трикутнику [59].

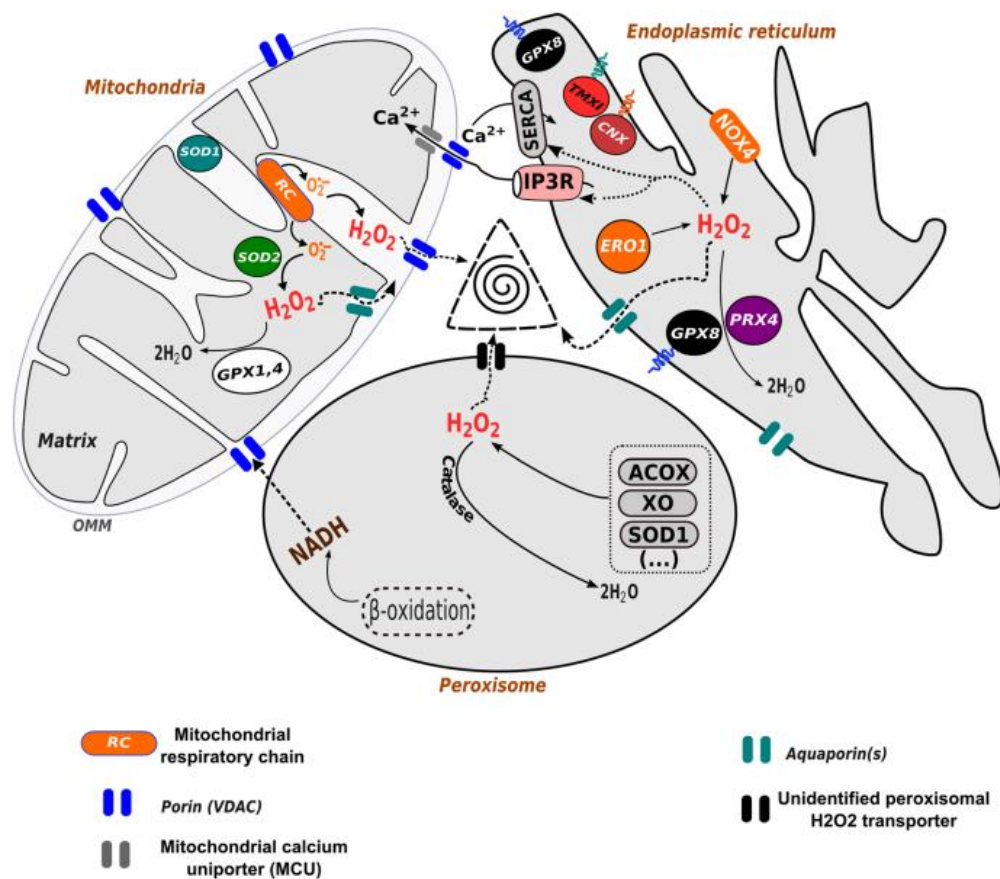


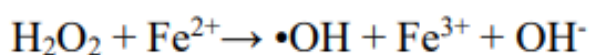
Рис. 1.11. Окисно-відновний трикутник

Поряд із генерацією АФК у мітохондріях спостерігається утворення активних форм кисню у пероксисомах та ЕПР. Процес генерації АФК дещо

відрізняється від цього ж процесу у мітохондріях і передбачає участь ксантину та ендотеліальної оксидази, а також внаслідок автоокислення малих молекул [60].

Мікросомна цитохром Р-450-залежна (СYP450) монооксигеназна система, відповідає за метаболізм ксенобіотику та виступає головним генератором АФК у клітині [61]. Ферменти СYP450 каталізують відновлення молекулярного кисню. При порушенні передачі кисню до органічного субстрату відбувається генерація основни АФК, зокрема синглетного кисню (O_2^{*-}), пероксиду кисню (H_2O_2) та гідроксильного радикалу ($\bullet OH$) [62]. Поряд із вищезгаданими механізмами генерації АФК і пероксисомах генерація АФК відбувається під час β -окислення жирних кислот [63].

Окрім цього, генерація АФК може відбуватись внаслідок першої стадії монооксигеназного каталітичного циклу СYP450. Процес генерації передбачає додаткове зв'язування ензиму із однією молекулою O_2 та подальшим утворенням оксикомплексу, що призводить до генерації супероксид-аніон радикалу. При дальшому перетворенні окси- в пероксикомплекс та подальшим приєднанням двох протонів генерується пероксид водню [64]. Згенерований H_2O_2 за наявності іонів заліза змінної валентності вступає в реакцію Фентона з утворенням гідроксильного радикала



Окрім цих механізмів АФК виступають побічними продуктами реакції окислення ксантину та гіпоксантину з утворенням сечової кислоти. В ході цієї реакції відбувається перенесення електронів на кисень з подальшою генерацією супероксиду та пероксиду водню [64].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріал для досліджень

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 120-160 г. Умови утримання та маніпуляції над дослідними тваринами відповідали загальним етичним принципам експериментів на тваринах, які регламентовані положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986 р., із змінами, 1998 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затвердженими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та Законом України № 3447-1 від 21.02.2006р. («Про захист тварин від жорстокого поводження»).

Дослідні щурі споживали ДЕФ впродовж експерименту. Тварини утримувались в пластикових клітках з піщаним наповнювачем та вільним доступом до води.

На початку експерименту тварин було поділено на групи по 18 тварин у кожній групі:

I – контрольні (інтактні) тварини, які перебували на повноцінному раціоні, у віварію;

II – тварини, яким перорально щоденно вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг на кг маси тварин;

III – тварини, яким перорально щоденно вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг на кг маси тварин.

Введення ксенобіотика здійснювали протягом трьох тижнів. Евтаназію експериментальних щурів проводили на 14 та 21 добу, під легким ефірним наркозом на 14 та 21 добу після початку введення ДЕФ. З тварин відбирали печінку, яку промивали у фізіологічному розчині та піддавали гомогенізації за допомогою гомогенізатора Поттера. Усі процедури здійснювали при температурі 4°C. З печінки виділяли мікосомну фракцію у якій визначали генерації супероксидного радикалу, вміст H_2O_2 , вміст первинних, вторинних та кінцевих продуктів ПОЛ

Виділення мікросомної фракції з печінки щурів здійснювали методом низькошвидкісного центрифугування при швидкості обертів 9000 g. Принцип методу полягає в тому, що під час гомогенізації ЕПР руйнується та утворює везикули – мікросоми. Мікросоми, будучи негативнозарядженими частинками взаємодіють з позитивнозарядженими іонами двовалентних металів, утворюючи комплекси, які можна осадити при низькошвидкісному центрифугуванню

Попередньо відмили печінку у льодяному 0,9 %-му розчині NaCl. Після цього гомогенізували тканини в скляній ступці, додавши буфер у вигляді сахарози в об'ємі 25 мл, а потім збільшили об'єм 50 мл (1:10). Після цього отриманий гомогенат профільтрували через 4 шари марлі. Наступним етапом провели центрифугування гомогенату протягом 10 хв при 1000g. Після цього відібрали супернатант та центрифугували протягом 15 хв при 12000 g. До отриманої надосадової рідини додали 80 мМ р-ну CaCl_2 та 160 мМ MgCl_2 у 10 мМ трис-HCl буфер, рН 7,4 у співвідношенні (1:9), після чого залишили перемішуватись на холоді протягом 10 хв. По закінченні вистояванні центрифугували при 10000 g протягом 10 хв. Отриманий осад мікросом двічі центрифугували при 10000 g, попередньо промивши 150 мМ трис-HCl буфером, рН 8,0. Отриману мікросомну фракцію зберігали при температурі -20°C .

Визначення продуктів ПОЛ в гептан-ізопропанольних екстрактах крові

Визначення продуктів ліпопероксидації проводили в гептан ізопропанольних екстрактах крові. Метод базується на здатності виявляти продукти шляхом поглинання подвійних зв'язків при різних довжинах хвиль.

Спершу відібрали кров з ворітньої вени печінки та змішали її з ЕДТА у концентрації 1 мг/л. Після цього провели екстрагування 0,5 мл крові із сумішшю гептан-ізопропанолу (1:1) паралельно збовтуючи вміст закритої пробірки протягом 15 хв та подальшим центрифугуванням при 10000 об/хв впродовж 15 хв. Утворені ліпідні екстракти злили в окремі пробірки, куди помістили по 5 мл суміші гептан-ізопропанолу (3:7 по V). До розбавлених ліпідних витяжок додали

2 мл HCl (pH=2,0) для розділення фаз, а також відмиття від неліпідних домішок. Відібрали гептанову фазу в окрему суху пробірку, а до водно-спиртової фази додали 1 г NaCl для обезводнення ізопропанольного екстракту. Після відділення водневої фази перенесли ізопропанольну фазу в окремі пробірки. Після цього підготували оптичні контролі 0,5 мл 0,1% розчину EDTA на 0,9 % NaCl. Контроль: NaCl 0,9%: EDTA 0,1 %. Після цього провели вимірювання оптичної густини кожної фази проти відповідного контролю при різних довжинах хвиль: 220 нм (УФ поглинав подвійні зв'язки), 268 нм (відображається наявність дієнових кон'югатів), 278 нм (поглинання залежить від вмісту та кількості кетодієнів та спряжених трієнів), 400 нм (Шиффові основи)[65]. Після цього провели розрахунок вмісту продуктів ПОЛ шляхом співвідношення величин відповідних екстинцій до кількості ліпідів в пробі та до 1 мл досліджуваної крові по формулі:

$$E/\text{мл крові} = E \cdot V_{\text{фази}} / V_{\text{крові в пробі}}$$

Для гептанової фази: $E \cdot 0,4 / 0,5 = E \cdot 8$

Для ізопропанольної фази: $E \cdot 0,6 / 0,5 = E \cdot 12$

Визначення МДА в мікросомній фракції

Принцип методу полягає у здатності малонового діальдегіду утворювати комплексні сполуки із тіобарбітуровою кислотою, які забарвлені в рожевий колір [66].

До отриманого осаду мікросомної фракції додали 2,5 мл буферного розчину (0,025 М трис-HCl, pH 7,4, який містить 0,175 М KCl), після якого додали 17% розчин ТХО в об'ємі 1 мл та помістили на центрифугу на 10 хв при 4000 g. Після центрифугування відібрали 2 мл надосадової рідини у чисті сухі пробірки та додавали по 1 мл 0,8% водного розчину ТБК. Наступним етапом роботи була підготовка контролю: до 2 мл буферного розчину (0,025 М трис HCl) додати 1 мл 0,8 % водного розчину ТБК. Після цього усі пробірки помістили на водяну баню на 10 хв до появи рожевого забарвлення, після цього витягнути досліджувані проби та залишити охолоджуватись при кімнатній температурі. Після цього

здійснити вимірювання оптичної густини на спектрофотометрі при довжині хвилі 532 нм. Після цього провести розрахунок вмісту продуктів за формулою

$$C = E \cdot 3,6 / \varepsilon \cdot 2 \cdot \text{мг/мл ліпідів},$$

Де E – оптична густина проби

3,6 – кінцевий об'єм, мл

2 – об'єм дослідної проби, мл

ε – коефіцієнт екстинції ($1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

Визначення інтенсивності генерації супероксид-аніон радикалу

Принцип методу базується на здатності супероксиду відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ). Внаслідок реакції утворюється продукт – диформазан, який володіє специфічним забарвленням, яке реєструють на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм [67].

У центрифужні пробірки внесли по 0,05 мл мікросомної фракції та додали 0,5 л 3% NADH, після чого інкубували на водяній бані при $t \ 37^\circ\text{C}$ протягом 10 хв, впродовж цього часу перемішували. Наступним етапом роботи було внесення до кожної проби 0,2% НСТ в об'ємі 0,5 мл. Після внесення перемішували та інкубували 5 хв при $t \ 37^\circ\text{C}$. Після інкубації внесли по 3 мл суміші хлороформ-диметилсульфоксид, співвідношення якого 1:2 за об'ємом. Після цього збовтували протягом 1 хв, та центрифугували при 1500 g протягом 5 хв. Виміряли інтенсивність генерації $\text{O}_2^{\cdot -}$, що виражається в нмоль диформазану / (хв*мг протеїну).

Визначення вмісту пероксиду водню

Вимірювання вмісту пероксиду водню здійснювали за [68] Принцип методу полягає в утворенні забарвлення із робочим реактивом, та зміні показника оптичної густини.

Спершу підготували робочий реактив та контрольний зразок. Контрольний зразок представляє собою 400 мкМ буферний розчин. Після цього приготували робочий реактив, який складався з реактиву А та В. Реактив А: До 25 мМ

$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ додати 25мМ H_2SO_4 . Реактив В: До 100 мМ сорбітолу додати 125 мкМ ксиленового оранжевого.

Після приготування реактивів приступили до визначення. Помістили у пробірки 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 6,0), та довели до об'єму 400 мкл досліджуваним зразком. Після цього у кожену з проб внесли по 2 мл робочого реактиву, після чого переішали та залишили при кімнатній температурі протягом 15-20 хв. По завершенню інкубування виміряти оптичну густину при довжині хвилі 540 нм та розрахувати вміст за допомогою калібрувального графіка.

Вміст загального білка в мікросомній фракції печінки щурів визначали згідно стандартного методу Лоурі [69].

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили на ПК за допомогою стандартної програми «Microsoft Excel 2016». Для визначення можливих міжгрупових відмінностей між середніми значеннями використовували параметричний t-критерій Стюдента. Вірогідними вважали результати при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Активність процесу ПОЛ у мікросомній фракції печінки щурів за умови споживання диетилфталату

Монооксигеназна система ендоплазматичного ретикулуму – одна із клітинних систем, яка здатна генерувати вільні радикали. Утворені в цитохром Р450-залежних реакціях, АФК ініціюють вільнорадикальні процеси в клітинах.

Внаслідок діяльності МОС спостерігається генерація пероксиду водню та супероксидного радикала. Ці АФК утворюються внаслідок порушення процесу оксигенації органічного субстрату, зокрема передачі кисню до субстрату [60].

Під час першої стадії монооксигеназного циклу СYP-450 внаслідок зв'язування з молекулою кисню, тим самим утворюючи оксикомплекс, що призводить до генерації O_2^- . Оксикомплекс піддається перетворенню та виникає пероксикомплекс, у якому внаслідок подвійного протонування утворюється H_2O та додатково генерується водневий пероксид. Період напівжиття H_2O_2 є найтривалішим, а також він здатний дифундувати через клітинну мембрану. Гідропероксид виступає попередником гідроксильного радикалу, під час взаємодії попереднього із іонами металів змінної валентності [61].

Аналіз результатів дослідження цитохром Р450-опосередкованого утворення АФК показав, що за умови двотижневого введення в організм ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг не спостерігалось підвищення швидкості утворення O_2^- (рис 3.1), порівняно з відповідними показниками групи інтактних тварин.

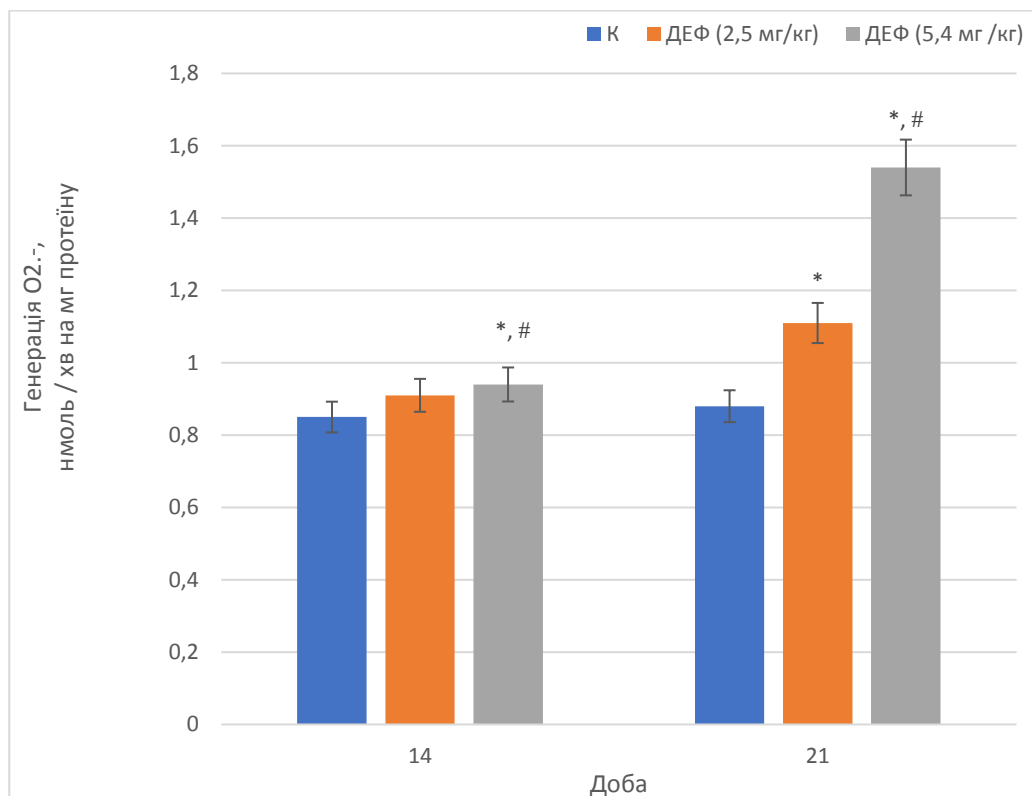


Рис. 3.1.1. Швидкість утворення супероксидного радикала в мікросомній фракції печінки щурів за умов дії диетилфталату

*Примітка (тут і надалі): * – 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, $P \leq 0,05$.*

Подібні результати спостерігається при вимірюванні вмісту H_2O_2 (рис.1Б), оскільки не виявлено різницю цього показника в мікросомній фракції печінки щурів яким вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг протягом 14 днів порівняно з відповідними показниками групи інтактних тварин. Триваліша дія на організм ДЕФ у цій же дозі супроводжувалася підвищенням швидкості утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$ та вмісту H_2O_2 у 1,3 рази та 1,4 рази порівняно з відповідними показниками групи інтактних тварин станом на 21-шу добу експерименту. Більш виражену прооксидантну дію ДЕФ показав при його введенні в організм у дозі 5,4 мг / кг, оскільки вже на 14-у добу спостерігалася незначна активація продукування АФК. Зокрема, інтенсивність генерації супероксидного аніон-радикала та вміст пероксиду водню на 30 % та 40 % перевищували значення контрольної групи тварин відповідно (рис.1). На 21-у добу експерименту високі дози ДЕФ ще

більше інтенсифікували утворення АФК у МОС печінки щурів. Утворення АФК може бути пов'язано зі змінами структурно-функціональної конформації ензимів цитохром Р450-гідроксильюючої системи та порушенням проходження монооксигеназного циклу СYP [68]. Такі зміни в роботі МОС значною мірою залежать від ліпідного оточення. Утворені АФК можуть атакувати ПНЖК фосфоліпідів мембран з достатньою енергією з утворенням органічних радикалів, зокрема, пероксильного радикала.

При цьому можуть інтенсифікуватися процеси ПОЛ.

Пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ) – процес, який передбачає ураження поліненасичених жирних кислот, внаслідок введення ксенобіотику, зокрема диетилфталату, у місці подвійного зв'язку вільними радикалами та активними формами кисню [39]. В ході ураження запускається ланцюгова реакція яка передбачає наявність 3-х етапів: ініціації, під час якої утворюється ліпідний радикал ($L^{\bullet}$)[6], поширення – утворення ліпідного пероксидного ($LOO^{\bullet}$), що після приєднання атому водню від іншої ПЖНК утворює молекулу $LOOH^{\bullet}$. Молекула-донор перетворюється на ліпідний радикал, цим самим забезпечує поширення ураження [7, 42,43]. Останній етап – термінація, передбачає завершення процесу шляхом «гасіння» радикалів, цим самим знешкоджуючи їх [43].

На етапі поширення спостерігається посилена генерація та акумулювання первинних, вторинних та кінцевих продуктів ліпопероксидації печінці, зокрема і в мікросомній фракції

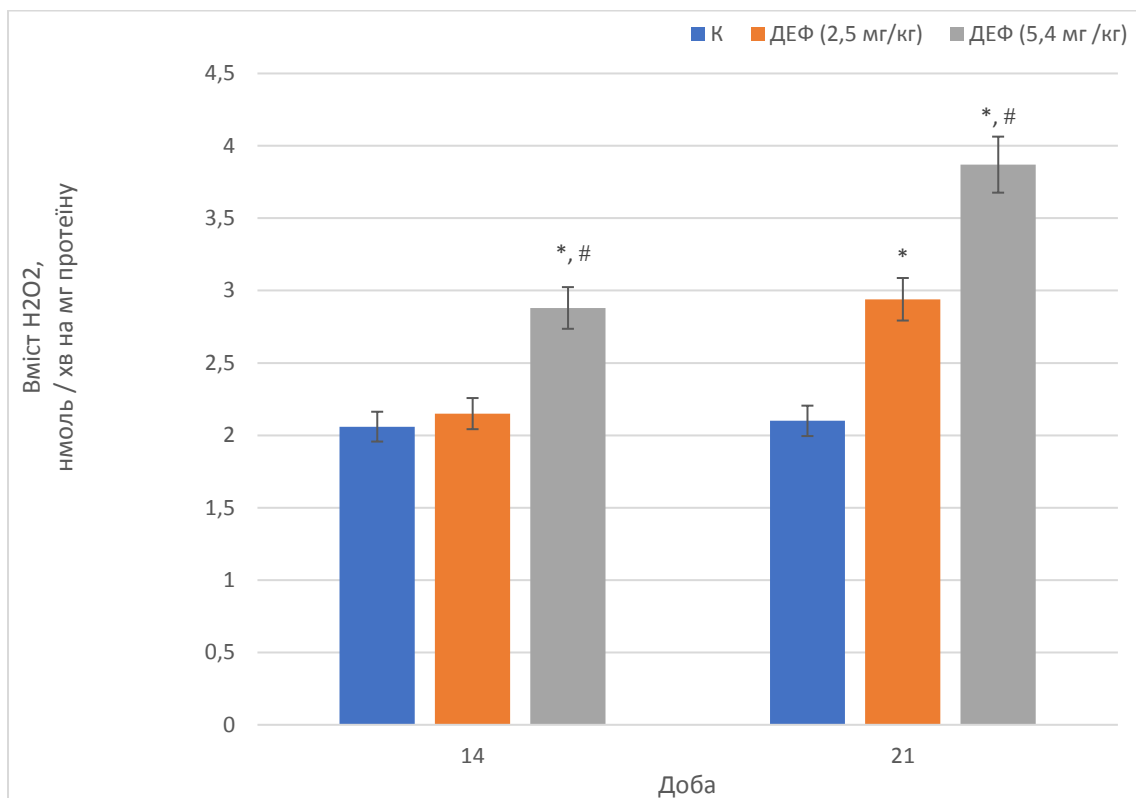


Рис. 3.1.2. Вміст пероксиду водню в мікросомній фракції печінки щурів за умов дії диетилфталату

Результати проведених досліджень показали підвищення продуктів ПОЛ в мікросомах печінки щурів, яким вводили диетилфталат в порівнянні з інтактними тваринами. Нами показано перебіг процесу ПОЛ при споживанні ксенобіотику у вигляді диетилфталату в динаміці, станом на 14 та 21 день перорального введення. Визначення процесу проводили шляхом оптичного вимірювання нагромадження основних продуктів ПОЛ – зокрема, первинних продуктів – дієнових кон'югатів (ДК) (рис. 1), кетодієнів та спряжених трієнів (КД та СТ) (рис. 2), а також основ Шиффа (рис. 3).

Токсичність диетилфталату, очевидно, зумовлена можливістю запускати вільнорадикальні процеси в організмі, зокрема нагромадження активних форм кисню (АФК), які спричиняють ПОЛ [70]. В літературі показано [1] що фталати спричиняють порушення відповіді на андрогени та естрогени, порушення секреції білку та сперматогенезу. Крім цього, внаслідок впливу цих сполук на організм може виникати інсулінорезистентний цукровий діабет (II типу), ожиріння, а також як наслідок впливу – астма, артеріальна гіпертензія та алергія [71]. Як наслідок впливу DEP на статеву систему спостерігається наступне:

швидше настання менопаузи, викидень, передчасні пологи, а також народження дитини з низькою вагою [72]. Більш чутливими до впливу цих сполук є діти. Окрім вище перерахованого у дітей можуть виникати астма, порушення функціонування щитоподібної залози та нейродегенеративні стани [73], а також наслідком впливу фталатів проявляється порушення метаболізму аргініну та проліну у дітей [74].

Наслідком впливу диетилфталату є процес ліпопероксидації в мікросомній фракції печінки щурів. Цей процес супроводжується посиленою генерацією продуктів ліпопероксидації. Перш за все спостерігається підвищення вмісту саме первинних продуктів – дієнових кон'югатів за рахунок окислення поліненасиченої жирної кислоти – найчастіше арахідонової. Процес окислення відбувається наступним чином – відривається водень в α -положенні, на місці розриву утворюється подвійний зв'язок. Акумуляція ДК у мікросомній фракції печінки щурів призводить до порушення життєдіяльності клітини, внаслідок згубного впливу на ліпопротеїни, ензими та нуклеїнові кислоти. Як наслідок впливу ДК на організм спостерігаються структурно-метаболичні порушення у ліпідному шарі клітинної мембрани. При взаємодії ДК із вільними групами мембранних сполук утворюються вторинні та, в подальшому кінцеві продукти пероксидного окислення ліпідів, які проявляють більш токсичні властивості, та також виступають маркерами процесу ліпопероксидації в мікросомній фракції печінки щурів [48, 75, 76]

Як вже було зазначено вторинні продукти утворюються із первинних. До них належить низка сполук, зокрема це малоновий диальдегід, 4-гідроксисексаноаль та інші. Усі вторинні продукти володіють здатністю взаємодіяти із тіобарбітуровою кислотою, за що і отримали назву ТБК-активні продукти. Кількість ТБК-активних продуктів залежить від кількості згенерованих попередників, а також від кількості утворюваних кінцевих продуктів ліпопероксидації.

Так, якщо порівняти вплив того чи іншого продукту на організм людини, то вторинні продукти володіють більшою токсичністю, та призводить до масової загибелі клітин.

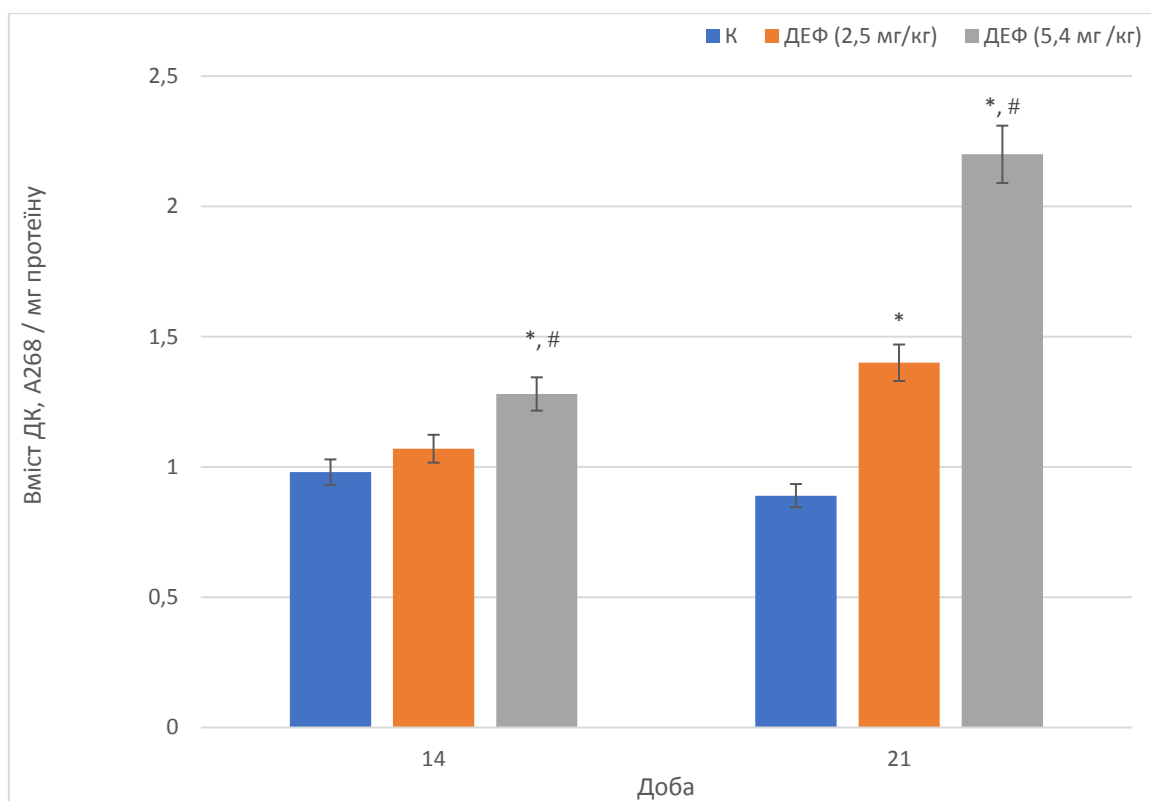


Рис. 3.1.3. Вміст дієнових кон'югатів у мікросомній фракції печінки щурів за впливу диетилфталату

Дослідження показали що у щурів, які щоденно споживали диетилфталат у концентрації 2,5 мг/кг спостерігається незначне збільшення дієнових кон'югатів вже на 14-ту добу експерименту, а також спостерігається тенденція зростання показників вмісту первинних продуктів ліпопероксидації при збільшенні терміну введення. Так при введенні цієї концентрації ксенобіотику показник вмісту ДК на 14 день експерименту збільшився по відношенню до контролю на 10%, продовживши введення показник продовжив зростати, та станом на 21-шу добу зріс у 1,4 рази по відношенню з показниками вмісті первинного продукту ліпопероксидації у мікросомній фракції печінки контрольних тварин. При збільшенні введеної концентрації диетилфталату до 5,4 мг/кг показники вмісту первинних продуктів зросли відповідно. Так, на 14-у добу експерименту при введенні ДЕФ у концентрації 5,4 мг/кг показник вмісту

дієнових кон'югатів у мікросомній фракції печінки щурів збільшився у 1,3 рази порівняно з інтактними тваринами. При проведенні тритижневого введення відбувалася інтенсивна генерація продукту, що відобразилося на показниках, які досягли пікових значень, зрісши в 2,2 рази відносно групи контролю.

Тенденція зростання показників вмісту первинних продуктів ліпопероксидації – дієнових кон'югатів у мікросомній фракції печінки щурів залежить від концентрації використаного ксенобіотика – диетилфталату, а також тривалості введення. Ймовірно це зумовлюється тим, що ксенобіотик викликає генерацію активних форм кисню, інтенсивність якої залежить від цих показників, що ініціюють процес ПОЛ, тим самим збільшуючи нагромадження первинного продукту реакції.

Показники первинних продуктів не показують повну картину процесу пероксидного окислення. Причиною цього є те, що вони виступають попередниками для синтезу вторинних продуктів ТБК-активних продуктів ПОЛ, зокрема продукують їх внаслідок взаємодії з вільними функціональними групами мембранних сполук, тому провели вимірювання цих показників.

Паралельно із підвищенням дієнових кон'югатів у дослідних групах тварин, яким вводили диетилфталат в мікросомній фракції печінки підвищується рівень кетодієнів (КД) та спряжених трієнів (СТ). При введенні ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла показник вмісту продуктів ліпопероксидації збільшився та перевищив контроль на 14-ту добу у 1,3 рази. Продовживши введення ксенобіотику у цій же концентрації спостерігали тенденцію до зростання вмісту первинних продуктів на 21-шу добу введення. Показник вмісту КД та СТ збільшився в 1,5 рази відносно до того ж показника у мікросомній фракції печінки інтактних тварин. При збільшенні концентрації ДЕФ до 5,4 мг/кг маси тіла спостерігали тенденцію до збільшення генерації первинних продуктів станом на 14-ту добу експерименту зі збільшенням кількості у 1,8 рази стосовно контролю. При продовженні терміну введення при концентрації ксенобіотика у 5,4 мг/кг маси тіла станом на третій тиждень вміст ДК+СТ у мікросомній фракції

печінки щурів збільшився вдвічі по відношенню із показником у інтактних тварин.

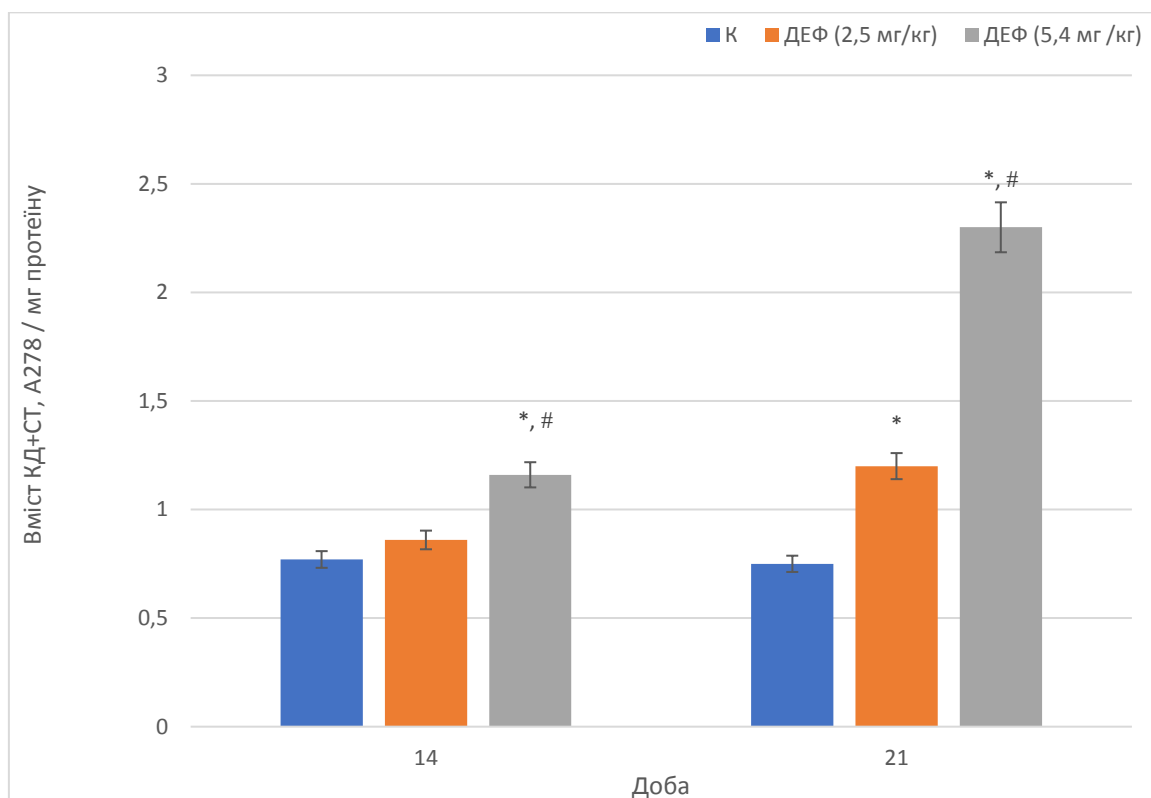


Рис. 3.1.4. Вміст кетодієнів та спряжених трієнів у мікросомній фракції печінки щурів за впливу різних концентрацій диетилфталату

Поряд із збільшенням КД та СТ продуктів ПОЛ за умови введення диетилфталату спостерігається і зміна вмісту ТБК-активних продуктів, зокрема високотоксичного малонового діальдегіду (МДА).

Окрім МДА, під час ліпопероксидації відбувається утворення інших вторинних продуктів, деякі з них володіють високими цитотоксичними властивостями. Прикладом такого продукту є 4-гідрокси-2-ноненаль. Цей продукт піддається біотрансформації, яка призводить до зниження токсичного впливу на організм [6]. 4-HNE – належить до класу α , β -ненасичених альдегідів, що здатні вступати у гідрофільні реакції та генерувати основи Шиффа – третинного продукту ПОЛ.

Так, при введенні ксенобіотику у концентрації 2,5 мг/кг протягом 14 діб експерименту не показало суттєвого підвищення ТБК-активних продуктів в порівнянні з показником контролю. При збільшенні терміну введення ДЕФ до 21

доби показник рівня ТБК-активних продуктів процесу зріс у 1,4 рази порівняно із аналогічним показником у інтактних тварин. При збільшенні введеної дози ДЕФ до 5,4 мг/кг маси тіла вміст ТБК-активних продуктів істотно підвищився станом на 14-ту добу експерименту: в 1,9 рази перевищуючи рівень контролю. При продовженні введення ДЕФ в цій же концентрації не було зафіксовано змін показників вмісту ТБК-активних продуктів процесу ліпопероксидації в мікросомній фракції печінки щурів. Показник вмісту вторинних продуктів станом на 21-шу добу залишався стабільно високим і становив різницю у 1,8 разів відносно контролю.

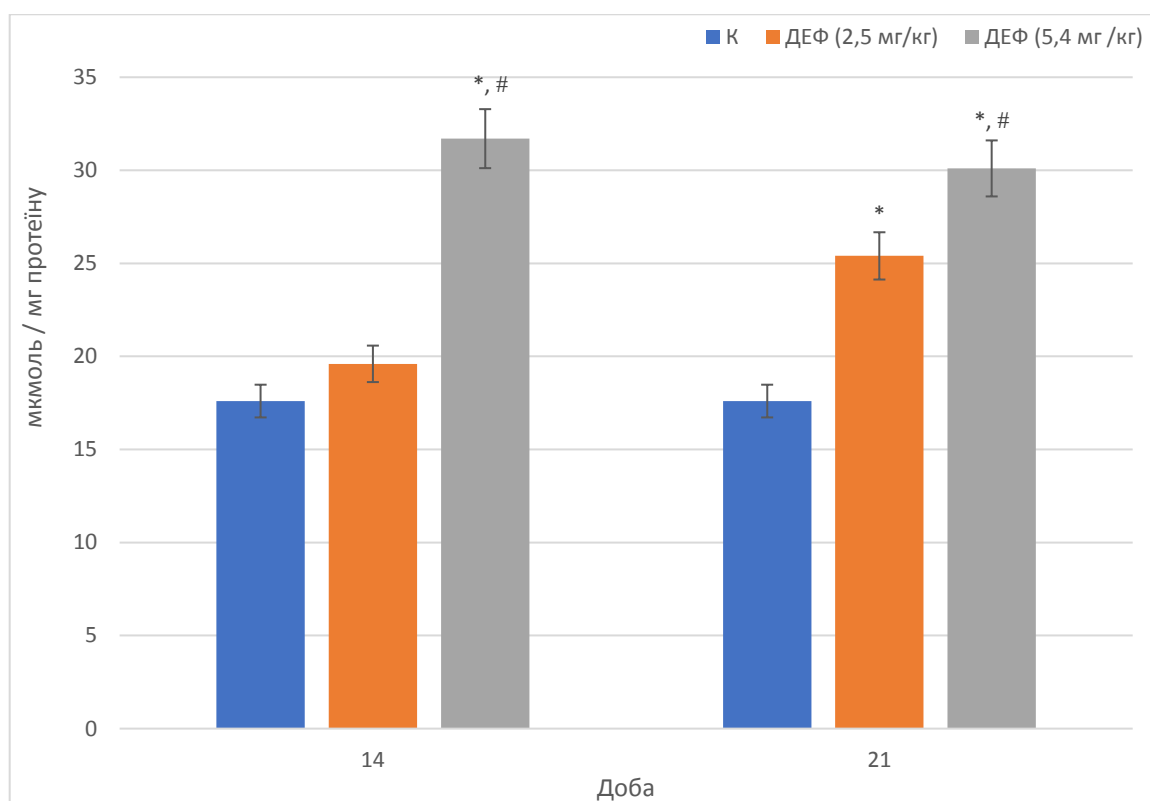


Рис. 3.1.5. Вміст ТБК-активних продуктів у мікросомній фракції печінки щурів за умов дії диетилфталату

Отримані показники свідчать про те, що за дії помірнотоксичних доз диетилфталату не спостерігалось тенденції до збільшення вмісту ТБК-активних продуктів ліпопероксидації у мікросомній фракції печінки щурів. Виходячи з отриманих результатів відсутність тенденції до зростання можна пов'язати із властивістю МДА взаємодіяти з аміногрупами протеїнів [58], тим самим

утворюючи та акумулюючи кінцеві продукти – основи Шиффа, які мають діагностичне значення при ПОЛ.

Виходячи з цього було проведено вимірювання показнику основ Шиффа. Результати вимірювань показали підвищення рівню третинних продуктів ліпопероксидації в мікросомній фракції печінки щурів за умови введення диетилфталату. Так, при введенні ДЕФ у концентрації 2,5 мг/кг маси тіла протягом двох тижнів не показало збільшення вмісту кінцевих продуктів, то при продовженні експерименту на 21-й день показники зросли у 2,4 рази порівняно з показником вмісту цих продуктів у інтактних тварин. При збільшенні концентрації введеного ДЕФ до 5,4 мг/кг маси тіла спостерігали посилене нагромадження кінцевих продуктів вже на 14 добу експерименту. Вміст третинного продукту збільшився в 1,8 разів порівняно із вмістом у інтактних тварин. Продовживши експеримент до 21-ї доби за цієї ж концентрації, показник вмісту основ Шиффа збільшився у 3,4 рази порівняно з показником контролю.

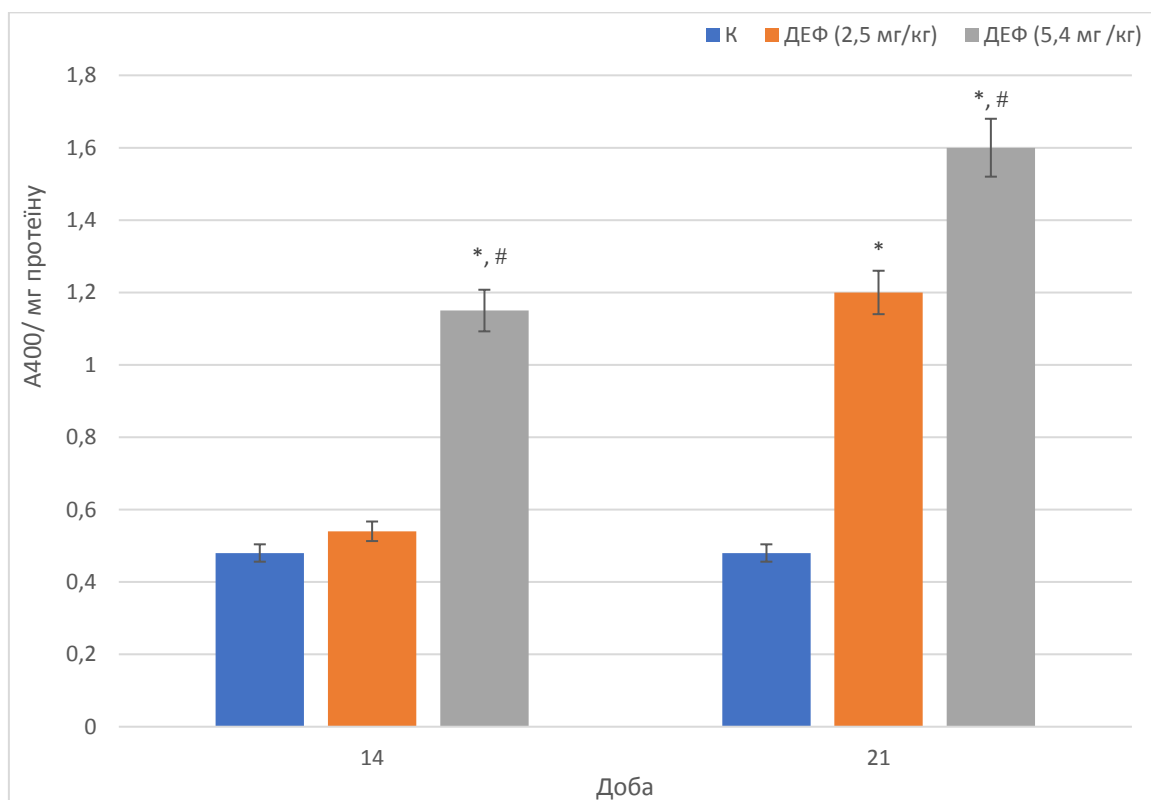


Рис. 3.1.6. Вміст Шиффових основ у мікросомній фракції печінки щурів за впливу різних концентрацій диетилфталату

Зниження вмісту ТБК-активних продуктів може мати дві причини. Першою причиною є утворення малої кількості первинних продуктів ліпопероксидації, які виступають попередниками ТБК-активних продуктів, а також підвищення рівня основ Шиффа. На факт генерації основ Шиффа вказує індекс шифоутворення [76] – співвідношення показника вмісту основ Шиффа до вмісту ТБК-активних сполук, який збільшується в залежності від концентрації та терміну введення диетилфталату в організм.

Так, при введенні ДЕФ у концентрації 2,5 мг/кг станом на 14-ту добу експерименту не відбувається підвищення генерації основ Шиффа в мікросомній фракції печінки щурів, на що вказує стабільний рівень показнику індексу шифоутворення. При трьохтижневому введенні ксенобіотику у цій же концентрації, спостерігається збільшення індексу шифоутворення в 1,7 рази відносно показника співвідношення вмісту продуктів у мікросомній фракції печінки щурів контрольної групи. При збільшенні концентрації дози введенного ксенобіотику до 5,4 мг/кг маси тіла вже на 14-ту добу експерименту спостерігається збільшення генерації та співвідношення третинних та вторинних продуктів ліпопероксидації, та становить різницю у 1,3 рази відносно контролю. Продовживши введення ксенобіотику спостерігалася тенденція зростання генерації продуктів ПОЛ та індексу вцілому. Тож при використанні більшої дози диетилфталату на третій тиждень експерименту спостерігали максимальне збільшення співвідношення концентрацій Шиффових основ до ТБК-активних продуктів, а саме в 2 рази відносно цього ж показника у мікросомній фракції печінки інтактних тварин.

Тенденція до зростання індексу відображає процес нагромадження вмісту третинного продукту, що супроводжується та прямо призводить до зниження рівня ТБК-активних продуктів у мікросомній фракції печінки щурів за умови введення ДЕФ.

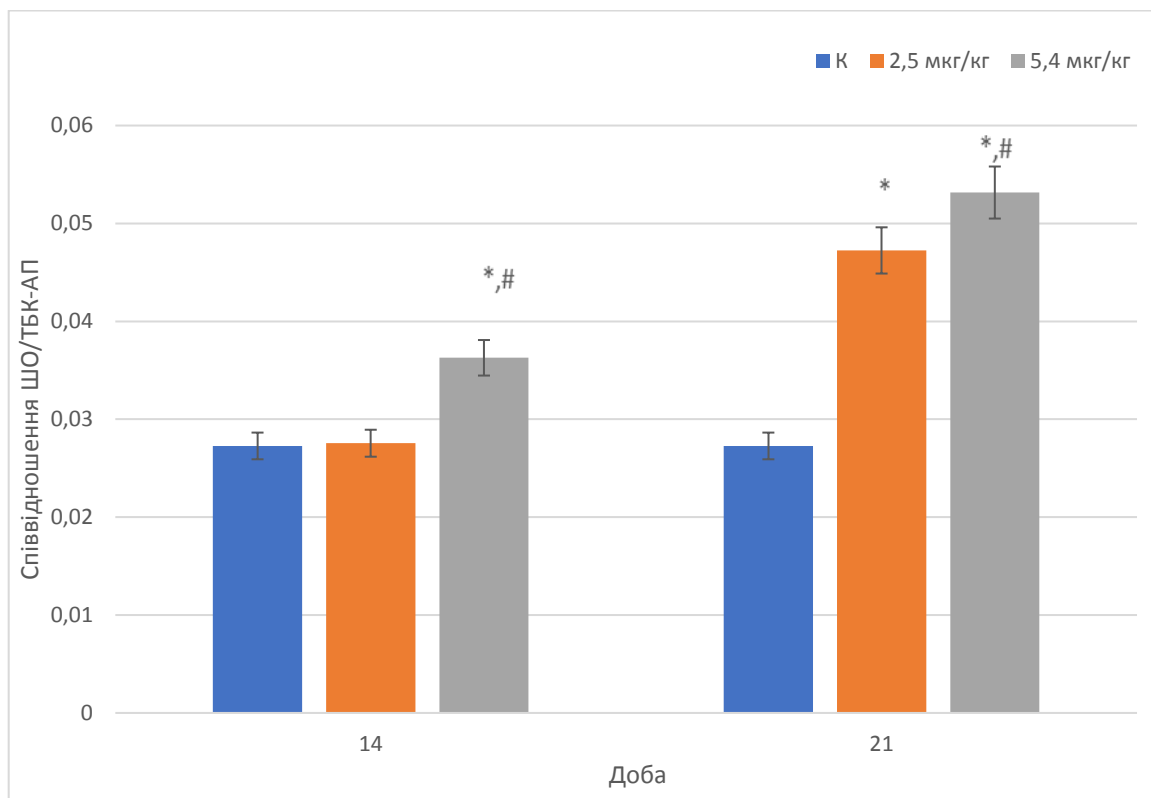


Рис. 3.1.7. Рівень індексу Шифоутворення у мікросомній фракції печінки щурів за впливу різних концентрацій диетилфталату

Отже, за умов введення диетилфталату відбувається генерація АФК, що призводить до ініціації процесу ПОЛ в мікросомній фракції, це проявляється підвищення усіх продуктів ПОЛ, зокрема первинних, вторинних та третинних. Зміна цих показників спричинена взаємодією токсичних метаболітів – моноетилфталату. Саме ця речовина здатна запускати каскад вільнорадикальних процесів у клітині.

Неконтрольована акумуляція продуктів ПОЛ зумовлює ушкодження мембран клітин, зокрема моноцитів та макрофагів, а також клітин судинного епітелію. Як наслідок виникає їх дисфункція, а у випадку ураження моноцитів/макрофагів – зниження неспецифічної антимікробної резистентності та імунологічної реактивності організму, а також розвитку аутоімунних реакцій [77].

ВИСНОВКИ

1. Введення ДЕФ в організм супроводжується інтенсифікацією генерації активних форм кисню у мікросомній фракції печінки щурів, підтвердженням чого є підвищення швидкості продукування супероксидного радикалу та рівня H_2O_2 . При цьому відбувається посилення процесу внаслідок збільшення концентрації ксенобіотика, а також терміну введення.

2. Введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг не призводить до підвищення первинних (ДК, КТ+СТ) продуктів ПОЛ у мікросомній фракції печінки щурів на 14-ту добу експерименту з подальшим збільшенням їх вмісту у 1,1 та 1,3 рази на 21-шу добу порівняно з показниками інтактних тварин відповідно. Застосування ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг призводить до підвищення рівня як первинних, так і вторинних продуктів вже на 14-ту добу експерименту з тенденцією до зростання на 21-шу добу.

3. Максимальний рівень кінцевих продуктів ПОЛ – Шиффових основ спостерігається після тритижневого введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг та відбувається на фоні відносно стабільного рівня ТБК-активних продуктів в мікросомній фракції печінки щурів.