

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

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

**ОКИСЛЮВАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В ПЕЧІНЦІ РІЗНОВІКОВИХ  
ЩУРІВ ІЗ ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ДИКВАТОМ**

**Кваліфікаційна робота**

**Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)**

***Виконала:***

студентка 4 курсу, 400 групи

**Дроздюк Яна Миколаївна**

***Керівник:***

кандидат біологічних наук,

асистент **Николайчук І.М.**

До захисту допущено  
на засіданні кафедри  
протокол № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_ 2025 р.  
Зав. кафедрою \_\_\_\_\_ доц. Волощук О.М.

**Чернівці – 2025**

## АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню окислювальних процесів у печінці різновікових щурів із токсичним ураженням дикватом. У науковій роботі оцінено показники рівня супероксиду, пероксиду водню, активностей супероксиддисмутази та каталази у мітохондріальній фракції печінки щурів 60-денного, 150-денного та 360-денного віку при надходженні токсичних доз диквату.

Встановлено, що за умов токсичного ураження дикватом в мітохондріальній фракції печінки щурів 60-денного віку відбувається посилене продукування супероксиду та пероксиду водню з одночасною активацією супероксиддисмутази та каталази, що можна розглядати як адаптаційну реакцію ензиматичної ланки антиоксидантної системи.

У репродуктивних (150 днів) та зрілих (360 днів) тварин за умов дикват-індукованого ураження на тлі інтенсифікації генерації супероксидного аніон-радикала в мітохондріях печінки спостерігається зниження супероксиддисмутазної активності, що можна використовувати як біомаркер ранньої реакції клітин на надходження даного гербіциду з урахуванням вікових змін.

Зростання каталазної активності на тлі зниження вмісту  $H_2O_2$  у мітохондріях печінки щурів репродуктивного та зрілого віку вказує на компенсаторну реакцію організму. При цьому найнижчий внесок у реалізацію цього захисного механізму зареєстровано у щурів зрілого віку (360 днів), що свідчить про зниження адаптаційного потенціалу антиоксидантної системи з віком.

**Ключові слова:** супероксид, пероксид водню, супероксиддисмутаза, каталаза, мітохондрії, печінка, токсичне ураження, дикват

## ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the study of oxidative processes in the liver of rats of different ages under toxic damage induced by diquat. The study assessed the levels of superoxide, hydrogen peroxide, and the activities of superoxide dismutase and catalase in the mitochondrial fraction of the liver in 60-, 150-, and 360-day-old rats exposed to toxic doses of diquat.

It was found that under conditions of diquat-induced toxicity, the mitochondrial fraction of the liver in 60-day-old rats exhibits increased production of superoxide and hydrogen peroxide, accompanied by the activation of superoxide dismutase and catalase, which can be considered an adaptive response of the enzymatic component of the antioxidant defense system.

In reproductive (150 days) and mature (360 days) animals, diquat-induced damage was accompanied by intensified superoxide generation in liver mitochondria and a decrease in superoxide dismutase activity, which may serve as a biomarker of the early cellular response to this herbicide, taking age-related changes into account.

An increase in catalase activity, along with a reduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in the liver mitochondria of reproductive and mature rats, indicates a compensatory reaction of the organism. The lowest contribution to this protective mechanism was recorded in mature (360-day-old) rats, suggesting a decline in the adaptive potential of the antioxidant system with age.

**Key words:** superoxide, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, catalase, mitochondria, liver, toxic damage, diquat

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

\_\_\_\_\_ Я.М. Дроздюк

(підпис)

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП.....</b>	<b>5</b>
<b>РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>7</b>
1.1. Хімічна характеристика диквату.....	7
1.2. Роль диквату в сільському господарстві як гербіциду.....	9
1.3. Клініко-біохімічні показники за умов отруєння дикватом.....	11
1.4. Оксидативний стрес та його біологічна роль.....	14
1.4.1. Механізми утворення активних форм кисню.....	16
1.4.2. Антиоксидантна система організму.....	18
<b>Розділ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>21</b>
2.1. Об'єкти та методи досліджень.....	21
2.2. Виділення мітохондріальної фракції.....	22
2.3. Визначення генерації супероксидного аніон-радикалу.....	22
2.4. Визначення вмісту пероксиду водню.....	23
2.5. Визначення супероксиддисмутазної активності.....	23
2.6. Визначення каталазної активності.....	24
2.7. Статистична обробка даних.....	25
<b>Розділ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....</b>	<b>26</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>38</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>39</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>43</b>

## ВСТУП

За останні десятиліття спостерігається зростання інтенсивності використання пестицидів у сільському господарстві, серед яких особливе місце займають гербіциди. Вони дозволяють ефективно контролювати ріст бур'янів і підвищувати врожайність культур, однак безконтрольне застосування таких речовин спричиняє серйозні екологічні та токсикологічні проблеми. Одним із гербіцидів, що набув широкого застосування після заборони параквату, є дикват – сполука з високою токсичною дією, яка здатна викликати важкі порушення в роботі життєво важливих органів людини і тварин [1, 2].

Основним механізмом токсичної дії диквату є індукція оксидативного стресу. Потрапляючи в організм, дикват зазнає редукції, внаслідок чого утворюються нестабільні радикали, які беруть участь у генерації активних форм кисню (АФК), таких як супероксидний аніон-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксид водню ( $H_2O_2$ ) і гідроксильний радикал ( $OH\cdot$ ) [2, 3]. Надмірне утворення АФК порушує окисно-відновний гомеостаз клітини та призводить до окисного ушкодження ліпідів, білків і нуклеїнових кислот, що є основою розвитку багатьох патологічних станів [4].

Відомо, що печінка є основним органом-мішенню при впливі диквату, де відбувається його біотрансформація з утворенням АФК [5]. При цьому важливу роль у забезпеченні антиоксидантного захисту відіграють ферментативні компоненти, зокрема супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза. СОД каталізує перетворення супероксидного аніону на  $H_2O_2$ , тоді як каталаза розкладає пероксид водню на воду і молекулярний кисень, тим самим запобігаючи утворенню високо реакційноздатних радикалів [6].

Дослідження впливу диквату на тварин підліткового, репродуктивного та зрілого віку дозволяє виявити вікові особливості реакції на оксидативний стрес, що є важливим як для фундаментального розуміння процесів старіння та адаптації, так і для токсикологічної оцінки ризиків. Оцінка рівня АФК та ферментативної активності системи антиоксидантного захисту в різновікових

групах дає змогу встановити критичні вікові періоди вразливості до дії токсикантів.

Враховуючи наведені вище відомості, метою роботи стало дослідження особливостей окислювальних процесів у печінці щурів різновікових груп із токсичним ураженням дикватом.

Для досягнення зазначеної мети за даних експериментальних умов поставлені такі завдання:

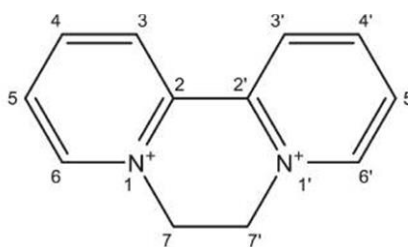
1. дослідити рівень продукування супероксидного аніон-радикала та пероксиду водню в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів;
2. оцінити активність супероксиддисмутази та каталази у мітохондріях печінки щурів.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Хімічна характеристика диквату

За останні кілька десятиліть використання пестицидів, а саме гербіцидів, зростає в усьому світі. Гербіциди необхідні в сільському господарстві для підвищення врожайності сільськогосподарських культур, лісового господарства, і для боротьби з бур'янами у водних системах. Однак неадекватне та невибіркове застосування гербіцидів може спричинити серйозні проблеми з безпекою харчових продуктів та екологічні проблеми, а саме через забруднення водних систем скиданням цих речовин із виробництв або поверхневим стоком у природні водні ресурси [1].

Дикват – жовтий кристал без запаху, також відомий як 1,1'-етилен-2,2'-біпіридилію дибромід. Він має відносну молекулярну масу 344,05 моль і нерозчинний у неполярних органічних розчинниках. Він малорозчинний у метанолі та легко розчинний у воді кімнатної температури. Дикват належить до хімічного класу біпіридинію. Він складається з піридинових кілець (тобто двох ароматичних кілець, у яких один атом вуглецю заміщений атомом азоту, з'єднаним насиченим містком  $(\text{CH}_2)_n$ ; у цьому випадку  $n = 2$ ). Це робить його високополярною двовалентною катіонною сполукою, яку легко відновити до нестабільного  $\text{DQ}^{+\bullet}$  [1].



**Рис. 1.1.1. Структурна формула диквату [1]**

Потрапляючи в організм, дикват піддається відновленню, якому сприяють нікотинаміаденіндинуклеотидфосфат (НАДФН) і цитохром P450-редуктаза (ЕС:1.6.2.4). Цей процес відновлення, що супроводжується перенесенням електрона від НАДФН, призводить до утворення  $\text{НАДФ}^+$  і надзвичайно нестабільного радикала диквату ( $\text{DQ}^{+\bullet}$ ).  $\text{DQ}^{+\bullet}$ , у свою чергу, віддає електрони молекулярному кисню ( $\text{O}_2$ ), що призводить до утворення

супероксидного радикалу ( $O_2^-$ ) і відновлення  $DQ^+$  до вихідного стану (рис. 1.1.2). Значне продукування  $O_2^-$  у цьому циклі спонукає до утворення активних форм кисню (АФК), таких як перексид водню ( $H_2O_2$ ), або спонтанно, або через каталіз супероксиддисмутази (СОД) (ЕС 1.15.1.1.). Зазвичай  $H_2O_2$  перетворюється на воду за допомогою каталази (ЕС 1.11.1.6) і глутатіонпероксидази (ЕС 1.11.1.9). Однак, коли рівні активних форм кисню перевищують регуляторну здатність організму, клітинні захисні механізми, включаючи неферментативні компоненти, такі як глутатіон, тіоредоксин, селен і вітаміни С і Е, а також антиоксидантні ферменти, включаючи супероксиддисмутазу, глутатіонпероксидазу, і каталазу, перевантажуються, що призводить до оксидативного стресу [2].

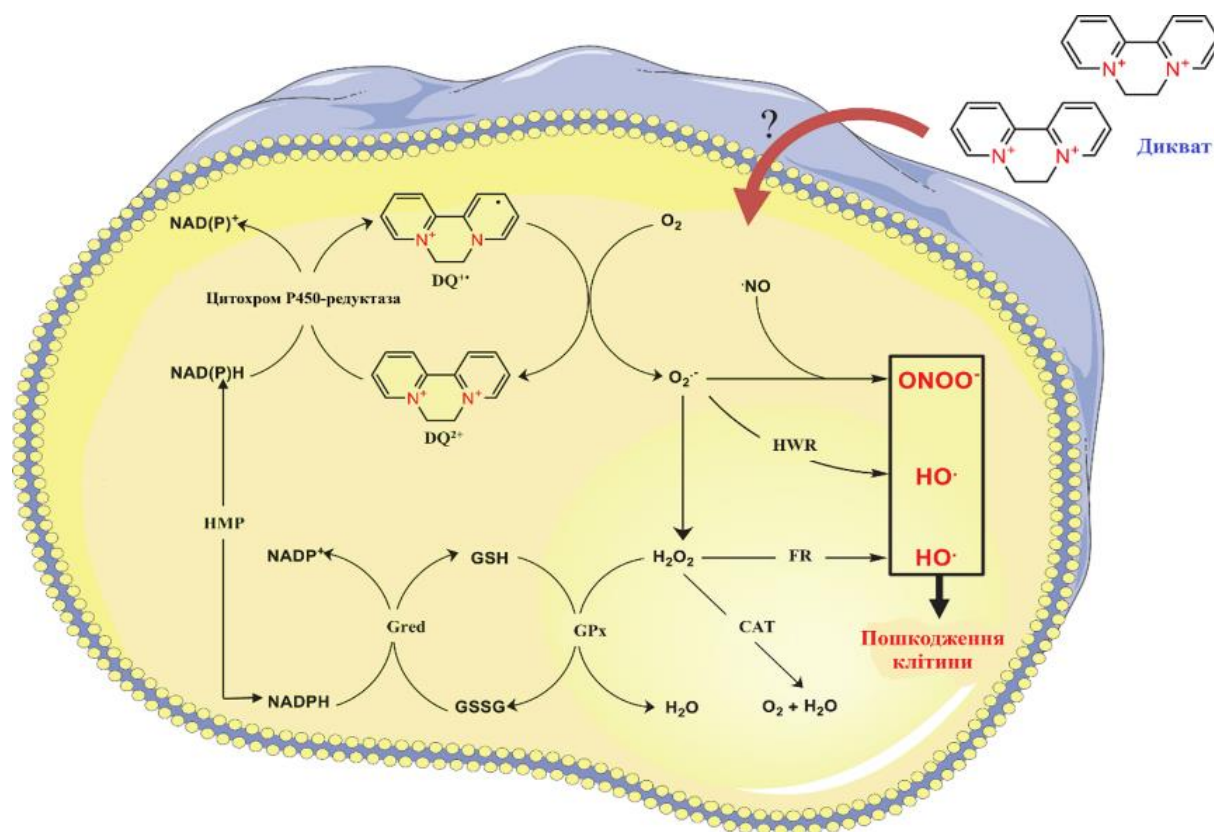
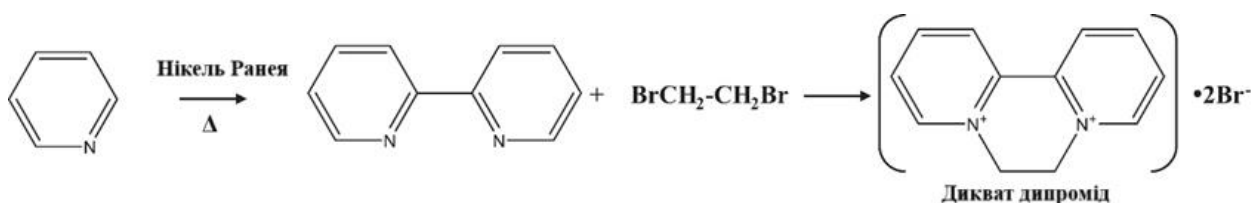


Рис. 1.1.2. Окисно-відновний цикл диквату [2]

Дикват в лабораторних умовах класично синтезується в два етапи:

- ✓ піридин окислювально з'єднують з 2,2'-біпіридином на нагрітому нікелевому каталізаторі Ренея;

✓ кватернізація 2,2'-біпіридинію етилендібромідом (1,2-діброметаном) для утворення етиленового містка, як показано на рис. 1.1.3. Канцерогенний етилендібромід є основною вихідною речовиною для виробництва диквату і залишається як виробнича домішка в рідких композиціях, що містять дикват. Незважаючи на це, він не вважається загрозою для здоров'я людини, оскільки з часом виділяється [3].



**Рис. 1.1.3. Синтез диквату в лабораторних умовах [3]**

## 1.2. Роль диквату в сільському господарстві як гербіциду

Дикват – це гербіцид, який почав широко використовуватися в сільськогосподарському виробництві після заборони параквату [4]. Він є третім найпоширенішим гербіцидом у світі після параквату та гліфосату. У 1955 році дикват був спочатку синтезований британською компанією ICI, яка пізніше визнала його цінність як осушувача та гербіциду, що призвело до його виведення на ринок у 1958 році. Хоча використання диквату не таке поширене, як параквату, відсутність специфічних антидотів після отруєння паракватом і високий рівень смертності спонукали багато країн світу заборонити продаж і використання параквату. Останніми роками дикват використовується як замітник параквату, що супроводжується зростанням випадків отруєння дикватом. Дослідження, проведене з 2004 по 2007 рік, зосереджене на випадковому впливі пестицидів на дітей у США, визначило дикват як одним з найпоширеніших випадків випадкового впливу пестицидів серед дітей [2].

В даний час в сільському господарстві в основному використовується 20%-й водний розчин диквату. З поступовим припиненням продажу та використання параквату в Китаю використання диквату поступово зростає.

Незважаючи на те, що дикват менш токсичний, ніж паракват, механізм отруєння дикватом не зрозумілий, і немає специфічного антидоту для лікування отруєння. Таким чином, ліквідація отруєння дикватом залишається проблемою у відділеннях невідкладної допомоги [5].

Цей швидкодіючий гербіцид широкого спектру може не вибірково руйнувати стебла та листя при контакті. Це гідрофільний пестицид із середньою токсичністю. При попаданні всередину дикват може швидко системно поширюватися через кровотік, потрапляючи в інші тканини, крім головного та спинного мозку. Період напіврозпаду диквату коливається від 2 днів у повітрі до 2–10 днів у воді та 3450 днів у ґрунті, а його вплив може спричинити токсичність, вади розвитку плоду та інші форми репродуктивної токсичності у ссавців [2].

Простота використання (кристалічні солі), висока розчинність у воді (для приготування розчинів для обприскування), низький тиск пари (мінімальна кількість випарів), висока зв'язуюча здатність (інактивація після зв'язування ґрунту) та швидка дія (як тільки починається фотосинтез), все це робить дикват відповідним гербіцидом для сільськогосподарських потреб. Це особливо корисно для оновлення пасовищ і для захисту фруктових садів і різноманітних плантаційних культур (наприклад, картоплі, винограду, бананів, рису та соняшнику), демонструючи ефективність, залежну від видів бур'янів і трав. Як правило, його готують у вигляді темно-коричневої прозорої рідини із землистим запахом. Дикват є відносно стабільним у нейтральних і кислих розчинах, але стає нестабільним під дією світла в лужних розчинах. Він схильний до гідролізу, причому швидкість гідролізу зростає з підвищенням температури. Дикват відомий своїми ефективними властивостями боротьби з бур'янами. При поглинанні тканинами зелених рослин він генерує вільні радикали пероксиду, що призводить до пошкодження та швидкої загибелі клітин рослинних мембран. Як наслідок, дикват широко використовується для боротьби з бур'янами. Дикват також застосовується в різних водних водоймах, таких як озера, ставки, дренажні

канави, серед іншого, для боротьби з плаваючими, спливаючими та зануреними бур'янами. Це дуже важливо, оскільки водні бур'яни можуть погіршити рекреаційну цінність цих водних систем, блокувати зрошувальні канали, перешкоджати судноплавству та пошкоджувати насосні станції та гідроелектростанції [6].

Оглядове дослідження показало, що на додаток до навмисного чи ненавмисного проковтування, 29% гострих захворювань, пов'язаних із дикватом, пов'язані з роботою та спричинені неналежним використанням засобів індивідуального захисту та розпиленням/розбризкуванням гербіцидів у сільському господарстві [8].

### **1.3. Клініко-біохімічні показники за умов отруєння дикватом**

Wilks et al. [7] класифікував тяжкість отруєння дикватом на основі прийнятої дози наступним чином:

1. Легке отруєння (проковтування < 1 г катіону диквату, наприклад < 0,35 мл 20%-й розчину (100 г дибромідної солі / 500 мл)), що призводить до шлунково-кишкових симптомів і потенційної ниркової недостатності, які є оборотними;

2. Середнє або важке отруєння (проковтування 1-12 г дикват-катіону (9,36-112,2 мл)), що призводить до поліорганної дисфункції, що характеризується вираженою нирковою недостатністю, від якої можуть одужати приблизно дві третини дітей;

3. Фульмінантне отруєння (вживання > 12 г дикват-катіону, > 112,2 мл комерційного препарату), що призводить до швидко прогресуючої поліорганної недостатності та смерті протягом 24–48 годин.

Міжнародна програма хімічної безпеки Всесвітньої організації охорони здоров'я визначає смертельну дозу диквату як 6–12 г, а показники смертності, пов'язані з отруєнням дикватом, значною мірою позитивно корелюють із прийнятою дозою [7].

В даний час немає антидотів для лікування пацієнтів, які страждають від отруєння дикватом. Доступні методи лікування залишаються обмеженими в ефективності, тому рівень смертності залишається відносно високим. Після прийому високої дози диквату уже через 2 години його концентрація може досягати пікових рівнів у крові [4].

Більша частина диквату, що надходить у травний тракт, виводиться з фекаліями протягом 24 годин (приблизно 90–95 %), близько 45 % виводиться із сечею протягом 48 годин після абсорбції. Незначна кількість виводиться з жовчю, і лише приблизно 2 % диквату всмоктується в кров і розподіляється по різних тканинах [2].

Дикват роз'їдає шкіру та шлунково-кишковий тракт і пошкоджує нирки, печінку, серце та центральну нервову систему [8]. Дикват може спричинити набряк тканин мозку та дегенерацію аксонів у отруєних пацієнтів, демонструючи зв'язки з нейродегенеративними змінами, схожими на патологію хвороби Паркінсона. Однак точні механізми, що лежать в основі індукованої дикватом нейротоксичності, залишаються погано вивченими [9]. Через > 80 % зниження захоплення дофаміну, оскільки ці зниження залежать від дози диквату [7].

Запропоновано декілька різних механізмів отруєння дикватом. По-перше, дикват може викликати оксидативний стрес через порушення регуляції нормальних окисно-відновних процесів, сприяючи клітинній та мітохондріальній дисфункції. Дикват також може індукувати апоптозну загибель клітин. Існують також переконливі докази здатності диквату викликати пошкодження шлунково-кишкового тракту, причому в одному звіті показано, що хронічне споживання низьких доз диквату призвело до низьких рівнів запалення кишечника та відповідного збільшення активності тонкої кишки. На основі механізму отруєння дикватом можна застосовувати різні методи лікування. Наприклад, N-ацетилцистеїн, відновлений глутатіон, вітамін С, мелатонін можна вводити для пом'якшення окислювального стресу, тоді як в інших випадках надається симптоматична підтримуюча терапія, при

цьому чіткий час для застосування ниркової підтримуючої терапії ще не визначено [7].

В останні роки зростає кількість повідомлень про неврологічні пошкодження в результаті отруєння дикватом. Це нове питання привернуло підвищену увагу в науковому співтоваристві. Хоча точні механізми токсичності диквату залишаються не до кінця вивченими, його вплив на нервову систему є багатограним. Існуючі дослідження показують, що дикват може генерувати численні окислювані продукти через окисно-відновні процеси, проявляючи потужний токсичний вплив на центральні нервові клітини та будучи вирішальним фактором, що сприяє пошкодженню нервової системи [2].

Клінічними проявами отруєння дикватом є переважно локальне пошкодження слизової оболонки та ураження багатьох органів. У пацієнтів через хвилини або години після прийому отрути спостерігалися прояви місцевого ураження слизової оболонки різного ступеня, такі як біль у горлі, нудота, блювання та біль у животі. У хворих була паралітична кишкова непрохідність, у деяких пацієнтів – дисфункція печінки (АЛТ: 70-1222 Од/л, АСТ: 65-2116 Од/л). У пацієнтів було гостре ураження нирок (CRE 124,0-1006,6 мкмоль/л), токсична енцефалопатія (проявляється судомою, комою, розладами психіки та поведінки, гострими демієлінізаційними змінами та набряком мозку на КТ тощо), також спостерігалась підвищення кількості лейкоцитів ( $13,1-41,6 \times 10^9/\text{л}$ ), і у декількох випадках пацієнти мали рабдоміоліз [5].

Клінічними ознаками перорального отруєння дикватом є переважно місцеве ураження багатьох органів. Травна система: у пацієнтів можливі ураження слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, такі як біль у горлі, нудота, блювання, ураження печінки, панкреатит та інші прояви. У одному випадку, після отруєння дикватом у хворого розвинувся гострий панкреатит. У важких випадках через 1-4 дні після впливу отрути може виникнути паралітична кишкова непрохідність, що призводить до накопичення великої

кількості рідини в кишечнику, що призводить до гіповолемічного шоку та ураження багатьох органів. Тому деякі вчені вважають, що паралітична кишкова непрохідність часто вказує на поганий прогноз у пацієнтів з отруєнням дикватом [5]. Основним патогенезом ураження нирок, спричиненого отруєнням дикватом, є гострий тубулярний некроз після впливу токсикантів, закупорка ниркових каналців злущеними епітеліальними клітинами ниркових каналців і реабсорбція вихідної сечі в кров через оголену стінку ниркових каналців за механізмом «рефлюксу», що призводить до значного зниження швидкості клубочкової фільтрації та затримки відновлення функції нирок. Токсична енцефалопатія: у пацієнтів можуть спостерігатися такі симптоми, як кома, епілептичні припадки або психічні та поведінкові аномалії, а візуалізаційне обстеження може виявити церебральний інфаркт, набряк мозку та гострі зміни демієлінізації. Дослідження показали, що отруєння дикватом спричиняє менше ексудативних легеневих уражень, ніж отруєння паракватом. Гідрофільна властивість диквату призводить до низької швидкості всмоктування в легенях. Крім того, дикват не відповідає вимогам до структури субстрату легеневої системи поглинання поліаміну, тому легенева тканина не може поглинати дикват [9].

#### **1.4. Оксидативний стрес та його біологічна роль**

Дикват, неселективний біпіридиновий гербіцид, проявляє свій шкідливий вплив на різні тканини та органи в основному через утворення великої кількості активних форм кисню (АФК) та активних форм азоту (АФА) через окислювально-відновні реакції в клітинах, що призводить до оксидативного стресу. Завдяки високому окисно-відновному потенціалу дикват має підвищену здатність викликати окисне пошкодження.

Оксидативний стрес виникає, коли порушується баланс між внутрішньоклітинними рівнями АФК і системою антиоксидантного захисту, що призводить до клітинного пошкодження через три основні реакції, а саме перекисне окислення ліпідів, окислення білків і пошкодження нуклеїнових

кислот. Велика кількість ризиків, таких як наркотики, алкоголь, ожиріння, патогенні мікроорганізми та подразники навколишнього середовища, можуть викликати утворення АФК. Сильний оксидативний стрес може пошкодити основні клітинні макромолекули (ДНК, протеїни і ліпіди) і, таким чином, викликати різні патологічні захворювання, включаючи рак, а також вікові та метаболічні захворювання у людей [10].

Оксидативний стрес визначається як дисбаланс між утворенням вільних радикалів і реактивних метаболітів, також відомих як активні форми кисню або окислювачі, і їх усуненням системами антиоксидантного захисту. Антиоксидантні ферменти продіють підвищенню рівня активних форм азоту у поєднанні з неферментативними антиоксидантами. Дослідження показали, що тривалий оксидативний стрес може призвести до хронічного запалення, яке в подальшому може викликати деякі захворювання, такі як хвороба Альцгеймера, рак, діабет, запальні захворювання та процес старіння [14].

Печінка – основний цільовий орган, у якому дикват використовує молекулярний кисень для продукування АФК і в кінцевому підсумку викликає гострі окислювальні пошкодження. Після оксидативного стресу мітохондрії та пероксисоми в паренхіматозних клітинах можуть виробляти надмірну кількість АФК, сприяючи експресії генів окислення жирних кислот у печінці. Печінкові зірчасті клітини, клітини Купфера та ендотеліальні клітини також потенційно чутливі та легко піддаються впливу окислювальних молекул. Повідомлялося, що в зірчастих клітинах перекисне окислення ліпідів, індуковане активними формами кисню, активує запалення та фіброгенез, і зрештою призводить до накопичення жиру в печінці. Крім того, утворення активних форм кисню сприяє інсулінорезистентності печінки, запаленню та, зрештою, призводить до апоптозу гепатоцитів. Отже, вважається, що оксидативний стрес є ключовим фактором у виникненні та прогресуванні багатьох захворювань печінки, таких як алкогольна хвороба печінки, неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) та хронічний вірусний гепатит [11].

Оксидативний стрес призводить до пошкодження клітин і патологічних змін, які виникають, коли в організмі більше оксидантів, ніж антиоксидантів. Коли печінка та нирки піддаються оксидативному стресу, активуються різноманітні шляхи експресії генів, специфічні для антиоксидантів, і сигнальної трансдукції для підтримки гомеостазу та захисту органів від окисного пошкодження. Антиоксидантні ферменти, зокрема супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіонпероксидаза, є першою лінією захисту від окислювального стресу в клітинах. Вони перетворюють активні форми кисню у нетоксичні сполуки, щоб зменшити шкоду, спричинену оксидативним стресом організму [12].

#### **1.4.1. Механізми утворення активних форм кисню**

Активні форми кисню можуть утворюватися кількома фізіологічними та патологічними механізмами. Мітохондрії є основним генератором активних форм кисню клітини, головним чином через витік окислювального фосфорилування, де приблизно 1 % всього мітохондріального  $O_2$  перетворюється на супероксид [15]. АФК також можуть утворюватися в інших органелах, таких як пероксисоми та ендоплазматичний ретикулум. Утворення АФК також може бути результатом впливу стресових факторів навколишнього середовища, таких як ксенобіотики або зміни параметрів навколишнього середовища [16].

Продуктування мітохондріального супероксиду є важливим джерелом АФК у клітинах. У мітохондріях ссавців існує сім основних місць продуктування супероксиду. У порядку спадання максимальної потужності це сайти зв'язування убіхінону в комплексі I (сайт IQ) та комплексі III (сайт IIIQ<sub>o</sub>), гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа, флавін у комплексі I (сайт IF), електронпереносний білок: Q-оксидоредуктаза бета-окислення жирних кислот, а також піруват- та 2-оксоглутаратдегідрогенази. Всі ці комплекси вивільняють  $O_2$  у мітохондріальному матриксі, за винятком сайту комплексу III та гліцерол-3-фосфатдегідрогенази [17].

У мітохондріальній мембрані супероксиддисмутаза присутня у трьох формах, а саме: Mn-залежна, Cu-залежна та Zn-залежна супероксиддисмутаза. Mn-SOD перетворює  $O_2^-$  на пероксид водню, а потім фермент аконітаза перетворює  $H_2O_2$  на гідроксильний радикал за допомогою реакції Фентона, тоді як супероксиддисмутаза міді та супероксиддисмутаза цинку перетворюють супероксид у міжмембранному просторі [18].

Іншим шляхом генерації АФК є мітохондріальний цитохромний каталітичний цикл, він включає фермент цитохрому P450, що складається з широкого спектру органічних сполук, таких як ліпіди, стероїди та ксенобіотики. Він продукує різні реакційноздатні побічні продукти, такі як супероксидний радикал та  $H_2O_2$ . Крім того, у ссавців низка протеїнових комплексів також продукує АФК, такі як нікотинамідаденіндинуклеотид (НАДН)-цитохром *b5* редуктаза, дигідрооротатдегідрогеназа, комплекс II: сукцинатдегідрогеназа та моноаміноксидази [19]. Кілька захисних систем, у вигляді антиоксидантів, захищають мітохондрії від шкідливого впливу активних форм кисню. Однак, надмірне вироблення АФК пов'язане з різними патологіями у людей, такими як мітохондріальна дисфункція, рак, запалення, неврологічні та нейродегенеративні захворювання, діабет, хронічні захворювання нирок, старіння та пошкодження ДНК [20].

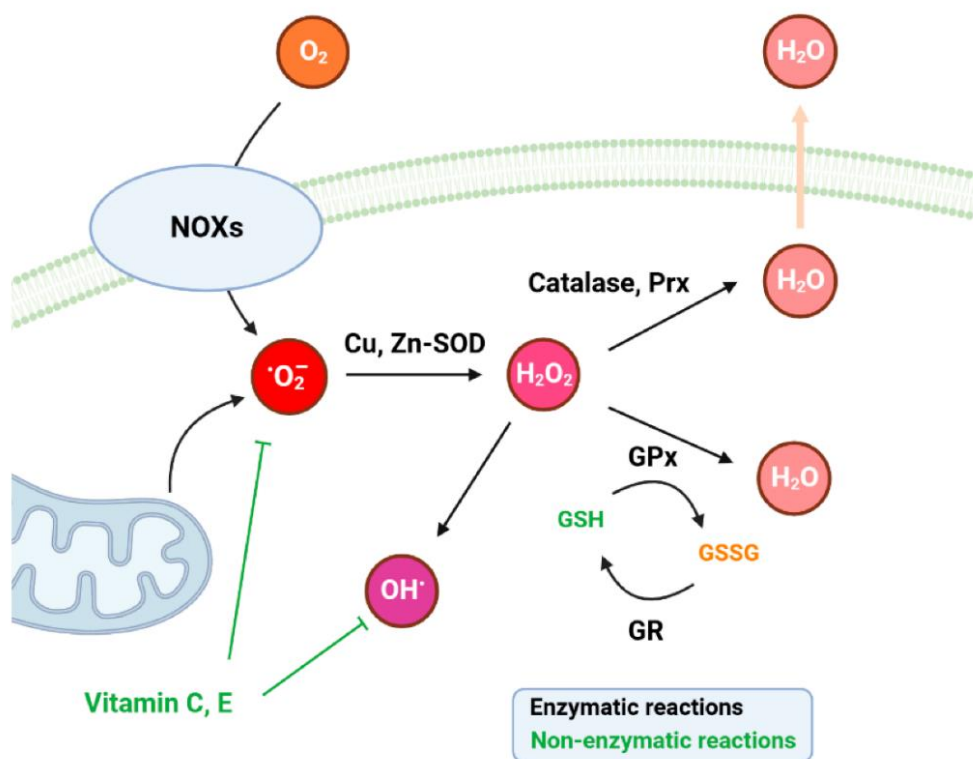
Коли рівні АФК піднімаються вище критичного рівня, вони викликають оксидативне пошкодження клітинних структур. З цієї причини сплески АФК зазвичай швидко нейтралізуються до стаціонарного рівня низкою антиоксидантних клітинних систем, що включають такі ферменти, як супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, тіоредоксини та пероксиредоксини. Якщо оптимальний окисно-відновний гомеостаз порушений через надмірне вироблення АФК або зниження антиоксидантної активності, клітина зазнає клітинної смерті або виживає, розвиваючи стратегії для боротьби з хронічно вищими рівнями АФК. Така адаптивна ситуація, у свою чергу, може сприяти розвитку кількох патологій, таких як неврологічні розлади або рак [21].

### 1.4.2. Антиоксидантна система організму

Клітини використовують багатогранну систему антиоксидантного захисту для регулювання рівня активних форм кисню та запобігання оксидативному стресу. Ця система включає мережу ферментативних та неферментативних антиоксидантів, які працюють разом для нейтралізації АФК (рис. 1.4.2.1). Ферментативні антиоксиданти представлені переважно такими ферментами, як супероксиддисмутаза та каталаза. СОД є основною лінією антиоксидантного захисту, відіграючи ключову роль, каталізуючи дисмутацію супероксидних аніонів ( $O_2^{\cdot-}$ ) з утворенням  $H_2O_2$  [22]. Подальша детоксикація  $H_2O_2$  на воду та кисень каталізується ферментами, включаючи каталазу, глутатіонпероксидазу та пероксиредоксини. Крім того, глутатіон-асоційовані ферменти, такі як глутатіонредуктаза та глутатіон-S-трансфераза, беруть участь у метаболізмі глутатіону та становлять вторинний рівень захисту. Під впливом активних форм кисню більшість залишків метіоніну перетворюються на сульфоксиди метіоніну, що призводить до структурних та функціональних модифікацій білків [13]. За допомогою метіонінсульфоксид-редуктази окислення метіоніну за допомогою АФК стає оборотним процесом, що захищає цілісність та стабільність білків від окисного пошкодження. Інші протеолітичні ферменти та ферменти репарації ДНК, які видаляють пошкодження з білка або ДНК, також були визначені як важливі антиоксиданти, які опосередковано функціонують в окисно-відновному балансі клітин [23].

Супероксиддисмутаза – це металофермент з добре відомими антиоксидантними властивостями. Перша СОД була відкрита півстоліття тому. Згодом чітко встановлено, що СОД є першою лінією захисту від вільних радикалів кисню, і переважна більшість організмів, які живуть у присутності кисню, експресують принаймні одну СОД [24]. У різних організмах, що мають різні каталітичні іони металів, еволюціонували три класи СОД: Cu/Zn-СОД, Mn-СОД/Fe-СОД та Ni-СОД. Окрім вимог до кофакторів іонів металів, ферменти СОД також мають чітку субклітинну локалізацію. Еукаріоти

експресують лише Cu/Zn-СОД (у цитоплазмі та позаклітинно) та Mn-СОД (у мітохондріях) [25].



**Рис. 1.4.2.1 Взаємозв'язок ензиматичних та неензиматичних антиоксидантних систем [23]**

Ферменти СОД каталізують дисмутацію супероксиду, утворюючи пероксид водню. Каталаза, глутатіонпероксидази перетворюють  $H_2O_2$  на воду.  $H_2O_2$  може реагувати з окисно-відновними металами (наприклад, залізом), утворюючи гідроксирадикал ( $OH^{\bullet}$ ) через реакцію Фентона/Габера-Вайса. Реакція між  $O_2^{\bullet-}$  та оксидом азоту ( $NO^{\bullet}$ ) утворює  $ONOO^-$ , розкладання якого, у свою чергу, призводить до утворення деяких високоокислювальних проміжних продуктів, включаючи  $NO_2^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$  та  $CO_3^{\bullet-}$ , а також, зрештою, стабільного  $NO_3^-$ . Отже, підвищений рівень  $O_2^{\bullet-}$  також може знижувати біодоступність  $NO^{\bullet}$  та спричиняти токсичність  $ONOO^-$ .  $O_2^{\bullet-}$  сам по собі може відновлювати тривалентне залізо ( $Fe^{3+}$ ) до двовалентного заліза ( $Fe^{2+}$ ) у залізо-сірчаних центрах білків, що призводить до інактивації ферментів та супутньої

втрати  $\text{Fe}^{2+}$  з ферментів, що, в свою чергу, підживлює хімію Фентона. Протонування  $\text{O}_2^{\cdot-}$  може утворювати більш реакційноздатний гідропероксильний радикал ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) [26].

Каталаза є основним антиоксидантним ферментом у більшості організмів, який каталізує розкладання перекису водню, контролюючи тим самим кількість цієї важливої клітинної сигнальної молекули. Фермент спрямований на пероксисоми, де він каталізує двоступеневу дисмутацію (диспропорцію)  $\text{H}_2\text{O}_2$  з та молекулярного кисню [27]. Крім того, за певних обставин каталаза може виконувати перекисні реакції в пероксисомах. Каталаза функціонує поряд з іншими основними клітинними системами обробки  $\text{H}_2\text{O}_2$ , такими як тіоредоксини, пероксиредоксини, глутаредоксини, супероксиддисмутаза та ферменти аскорбат/глутатіонового циклу, який складається з монодегідроаскорбатредуктази, дегідроаскорбатредуктази та глутатіонредуктази, для регулювання накопичення оксидантів та сигналізації у специфічний для кожного компартменту спосіб. Разом ці окисно-відновні системи утворюють мережу обробки  $\text{H}_2\text{O}_2$  [28].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкти та методи досліджень

У дослідженні використовували білих безпородних щурів віком 60, 150 та 360 днів з масою тіла відповідно  $92\pm 10$ ,  $127\pm 8$ ,  $216\pm 12$  г, які утримуються у віварії кафедри біохімії та біотехнології Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Протягом усього експериментального періоду тварини знаходилися в пластмасових клітках із піщаною підстилкою та вільним доступом до питної води.

Тварини отримували стандартний раціон віварію, без запровадження будь-яких обмежень у харчуванні. Усі маніпуляції, проведені під час експериментів, здійснювались із дотриманням вимог біоетики відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Шостим національним конгресом з біоетики (Київ, 2016 року).

Вік щурів, відібраних нами для дослідження, відповідав трьом віковим групам: юній (60–63 дні), молодій (138–150 днів) та зрілій (348–360 днів), що еквівалентно віковим етапам розвитку людини – приблизно 14–15, 24–25 та 44–45 років відповідно. Розподіл тварин за віковими групами здійснено з урахуванням літературних даних та рекомендованих таблиць відповідності віку щурів і людини [29].

Гостре токсичне ураження дикватом моделюють внутрішньошлунковим одноразовим введенням гербіциду в дозі,  $115,5$  мг/кг маси тіла тварин, що становить  $\frac{1}{2}$  LD<sub>50</sub> за допомогою спеціального зонду [30].

Дослідні тварини трьох вікових категорій – підліткового, молодого та зрілого віку – були розподілені на дві експериментальні групи:

- ✓ 1-ша група (К) – інтактні щури,
- ✓ 2-га група (DQ) – щури, яким моделювали гостре ураження, індуковане дикватом.

Виведення тварин з експерименту проводили відповідно шляхом цервікальної дислокації згідно з чинними рекомендаціями та етичними нормами.

## **2.2. Виділення мітохондріальної фракції**

Для проведення досліджень використовували печінкову тканину, яку попередньо очищали від залишків крові, промиваючи у холодному 0,9 % розчині натрію хлориду. “Після цього тканину гомогенізували в середовищі, що містило 250 мМ сахарози, 1 мМ ЕДТА та 10 мМ трис-НСІ (рН 7,4), і фільтрували крізь чотири шари марлі.”

Отриманий гомогенат центрифугували при 1000 g протягом 10 хвилин для осадження ядер і великих клітинних фрагментів. Надосад піддавали повторному центрифугуванню при 12000 g протягом 15 хвилин з метою осадження мітохондрій. Для підвищення чистоти мітохондріальної фракції осад промивали 250 мМ розчином сахарози та знову центрифугували за аналогічних умов. У результаті мітохондрії ресуспендували в 3 мл розчину сахарози [31].

## **2.3. Визначення генерації супероксидного аніон-радикалу**

Інтенсивність утворення супероксиду визначали за допомогою НСТ-тесту [32]. Метод базується на відновленні водорозчинного жовтого нітросинього тетразолію (НСТ) супероксидом до гранул синього формагану. Отриманий формаган екстрагували сумішшю диметилсульфоксиду з хлороформом. “Інтенсивність забарвлення вимірювали на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм. До мітохондріальної фракції в ізотонічному фосфатному буфері (рН 7,4) додавали 3% NADH. У контрольних зразках субклітинну фракцію замінювали відповідним об’ємом буфера. Розчин в пробах перемішували та інкубували 10 хв при 37°C, після чого додавали 0,2% розчин НСТ у трис-НСІ буфері (рН 7,4), перемішували та інкубували 5 хв при 37°C. Після чого додавали 2 мл розчинника (хлороформ:диметилсульфоксид у

співвідношенні 1:2 за об'ємом), інтенсивно перемішували протягом однієї хвилини, й центрифугували 5 хв при 1500 об/хв. Після цього відбирали супернатант і вимірювали його абсорбцію при 540 нм відносно контрольного зразка.”

#### **2.4. Визначення пероксиду водню**

Вміст пероксиду водню визначали колориметричним методом із використанням робочого розчину, який готували “шляхом змішування реагенту А ( $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в 2,5 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) та реагенту В (сорбітол — 100 ммоль/л і ксиленоловий помаранчевий — 125 мкмоль/л) у співвідношенні 1:100. У пробірки з 50 ммоль/л калій-фосфатним буфером (рН 6,0) додавали мітохондріальної фракції до загального об'єму 400 мкл. Для контролю використовували 400 мкл буферного розчину без зразка. До кожного зразка додавали 2,0 мл робочого розчину, ретельно перемішували та інкубували при температурі 37 °С протягом 15–20 хвилин.” Після інкубації вимірювали оптичну густина при довжині хвилі 540 нм щодо контролю. Концентрацію пероксиду водню визначали за допомогою калібрувального графіка та виражали в перерахунку на 1 мг білка [33].

#### **2.5. Визначення супероксиддисмутазної активності**

Визначення активності супероксиддисмутази проводили з використанням методу, заснованого на здатності цього ферменту пригнічувати автоокиснення адреналіну [34]. Реакція окиснення супроводжується утворенням адренохрому – продукту, що поглинає світло при довжині хвилі 347 нм. Наявність СОД зменшує швидкість утворення цього продукту, що дає змогу оцінити ферментативну активність.

“До 2,5 мл 0,2 М карбонатного буфера (рН 10,65) вносили 0,01 мл мітохондріальної фракції та 0,1 мл 0,1% розчину адреналіну. Реакційну суміш ретельно перемішували, після чого протягом трьох хвилин здійснювали

вимірювання екстинкції при  $\lambda = 347$  нм з інтервалом 60 секунд. Як контроль використовували буфер без досліджуваного зразка.”

Активність супероксиддисмутази розраховували в умовних одиницях на міліграм білка за відповідною формулою, яка відображає ступінь інгібування автоокиснення адреналіну.

## 2.6. Визначення каталазної активності

Активність каталази в клітинах печінки щурів визначали методом, що базується на здатності пероксиду водню утворювати стабільну жовту сполуку з молібдатом амонію, яку можна кількісно визначити спектрофотометрично [35]. Реакційна суміш дослідних зразків містила мітохондріальну фракцію та 0,03% розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Холоста проба включала лише пероксид водню та дистильовану воду. Через 10 хвилин інкубації реакцію зупиняли додаванням 4% розчину молібдату амонію. Контрольні проби містили дистильовану воду без клітин. Кількість утвореного забарвленого комплексу в дослідних та контрольних пробах визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм.

“Каталазну активність розраховували за формулою:

$$E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{дос}}) \cdot V \cdot t \cdot K, \text{ де}$$

$E$  – каталазна активність Мм хв мл/мг білка

$A_{\text{хол}}$  та  $A_{\text{дос}}$  – екстинкція холостої та дослідної

$V$  – об'єкт проби, мл

$t$  – час інкубації, хв

$K$  – коефіцієнт молярної екстинкції пероксиду водню ( $22,2 \cdot 10^3 \text{Мм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ )”

**Вміст протеїну визначали** за допомогою методу Лоурі [36].

## 2.7. Статистична обробка даних

Для статистичної обробки отриманих результатів використовували електронні таблиці прикладного програмного забезпечення Microsoft Excel

(версія Microsoft Office 2013). Дані представлено у форматі  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє арифметичне значення, а  $m$  – стандартна похибка середнього. Для порівняння показників між групами застосовували параметричний t-критерій Стьюдента. Різницю вважали статистично достовірною за умови, що значення  $p$  було менше 0,05. Обробка результатів і побудова графічного матеріалу здійснювалися за допомогою програмного пакета Microsoft Office.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

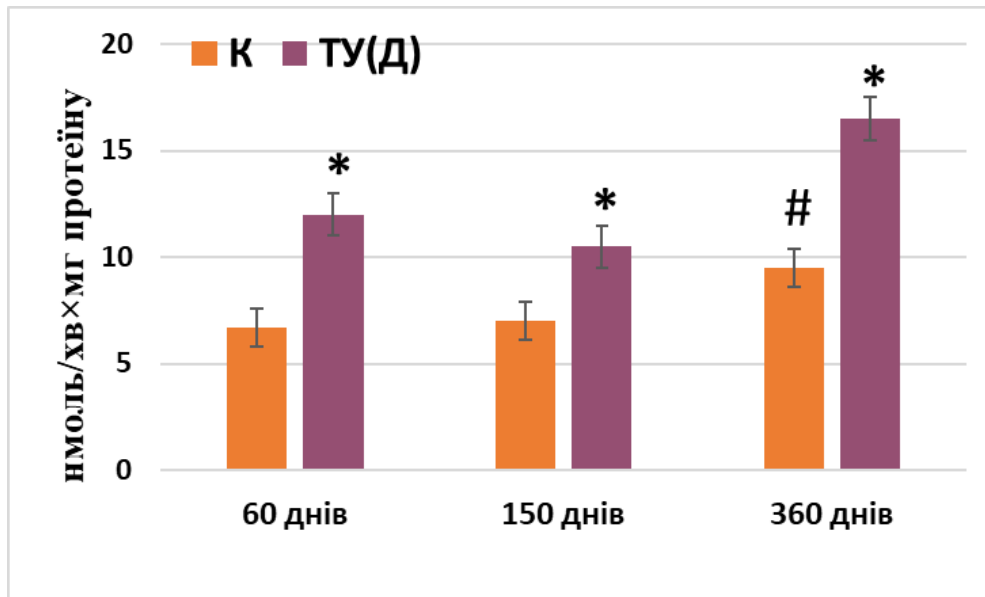
У сучасному світі інтенсивне використання агрохімікатів, зокрема гербіцидів, стало невід'ємною складовою сільськогосподарського виробництва. Численні дослідження свідчать про потенційну токсичність гербіцидів для людини, що вимагає ретельного вивчення біохімічних механізмів його дії на організм. Одним із ключових механізмів токсичної дії диквату є індукція оксидативного стресу, що супроводжується утворенням АФК, зокрема супероксид-аніону, пероксиду водню та гідроксильного радикалу [1].

Особливу небезпеку становить вплив гербіцидів на організм людей різного віку, оскільки ефективність антиоксидантного захисту змінюється з віком. Наприклад у дітей та літніх людей спостерігається підвищена вразливість до оксидативного стресу через недостатню зрілість або вікове виснаження антиоксидантних механізмів [14]. Зважаючи на відсутність достатньої кількості систематизованих даних щодо впливу диквату на показники оксидативного стресу в контексті вікової чутливості, дане дослідження є вкрай актуальним.

Результати проведених нами досліджень показали, що з віком спостерігається посилення генерації супероксидного аніон-радикалу в мітохондріальній фракції печінки навіть інтактних щурів. Так, у мітохондріях печінки щурів зрілого віку (360 днів) рівень супероксиду зростає порівняно з 60-денними (в 1,4 рази) та 150-денними (в 1,3 рази) тваринами відповідно. Це можна пояснити тим, що рівень супероксиду та інших АФК зростає з віком, і це є одним із ключових механізмів старіння організму. Таке явище пояснюється інтенсифікацією оксидативного стресу, зниженням ефективності антиоксидантних систем і зменшенням здатності клітин до самовідновлення [1].

Водночас у щурів із токсичним ураженням дикватом посилене продукування супероксиду в мітохондріальній фракції печінки спостерігається в усіх дослідних групах щурів незалежно від віку. У щурів 60-денного віку значення досліджуваного показника на 44 % перевищують рівень

контролю, тоді як в репродуктивних (150-денних) та зрілих (360-денних) – на 33% та 43 % відповідно порівняно з контрольними величинами відповідних вікових груп (рис. 3.1).



**Рис. 3.1. Інтенсивність генерації супероксиду в мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження дикватом**

*Примітка (тут і надалі): К – контроль, ТУ(Д) – тварини, яким моделювали токсичне ураження дикватом; # – статистично достовірна різниця порівняно з контрольними щурами 60-денного та 150-денного віку; \* – статистично достовірна різниця порівняно з контролем кожної вікової групи,  $p \leq 0,05$ .*

Отримані результати можна пояснити тим, що молодий організм (60 днів) є більш вразливим до токсичних впливів через незрілість компонентів антиоксидантної системи та вищу швидкість метаболічних перетворень. З літератури [2] відомо, що, наприклад, в дітей активність глутатіонпероксидази нижча, ніж у дорослих. У дітей рівень відновленого глутатіону, який є субстратом для глутатіонпероксидази, також може бути зниженим або недостатньо швидко регенеруватись у стресових умовах, що обмежує можливість ферменту виконувати свою функцію [37].

Також слід враховувати, що інтенсивний оксидативний стрес, спричинений дикватом, призводить до прямого окисного пошкодження білкових молекул, включаючи глутатіонпероксидазу. Це може змінювати

третинну структуру ферменту та знижувати його каталізує здатність. У дітей механізми відновлення пошкоджених білків і клітинних структур функціонують менш ефективно, ніж у дорослих, що посилює ефект.

Натомість у щурів зрілого віку (360 днів) клітини можуть проявляти знижену ефективність функціонування мітохондріального дихального ланцюга. Дикват, потрапляючи в організм, вступає у редокс-циклізацію, під час якої він приймає електрон і передає його кисню, утворюючи супероксид. В умовах вже порушеної мітохондріальної рівноваги, ця реакція значно посилює витік електронів і призводить до надлишкового утворення супероксиду, особливо в енергозалежних тканинах (печінка, мозок, міокард) [38].

З іншого боку, як зазначено в літературі [39], в літніх людей постійно присутній стан низькорівневого запалення, який активує макрофаги та нейтрофіли – клітини, що у відповідь на токсичний агент (у нашому випадку, гербіцид) продукують велику кількість супероксиду. Таким чином, імунна відповідь на гербіцид у людей літнього віку більш оксидативно-агресивна, що, в свою чергу опосередковано пояснює отримані нами результати.

Враховуючи, що рівень супероксиду в тканинах є не лише наслідком його надмірної генерації, але й результатом ефективності його знешкодження, важливе значення становить паралельне дослідження активності супероксиддисмутази – ключового ферменту, який каталізує дисмутацію супероксид-аніону до менш токсичних форм кисню. Саме цей фермент відіграє ключову роль у нейтралізації первинних оксидантів, перетворюючи їх у пероксид водню. Саме аналіз співвідношення між концентрацією супероксиду та активністю СОД дозволяє оцінити стан антиоксидантного захисту організму в умовах токсичного навантаження та з'ясувати вікові особливості оксидативного гомеостазу [12, 13].

Нами встановлено, що у відповідь на посилення генерації супероксидного аніон-радикала у 360-денних щурів контрольної групи зареєстровано підвищення активності супероксиддисмутази порівняно з

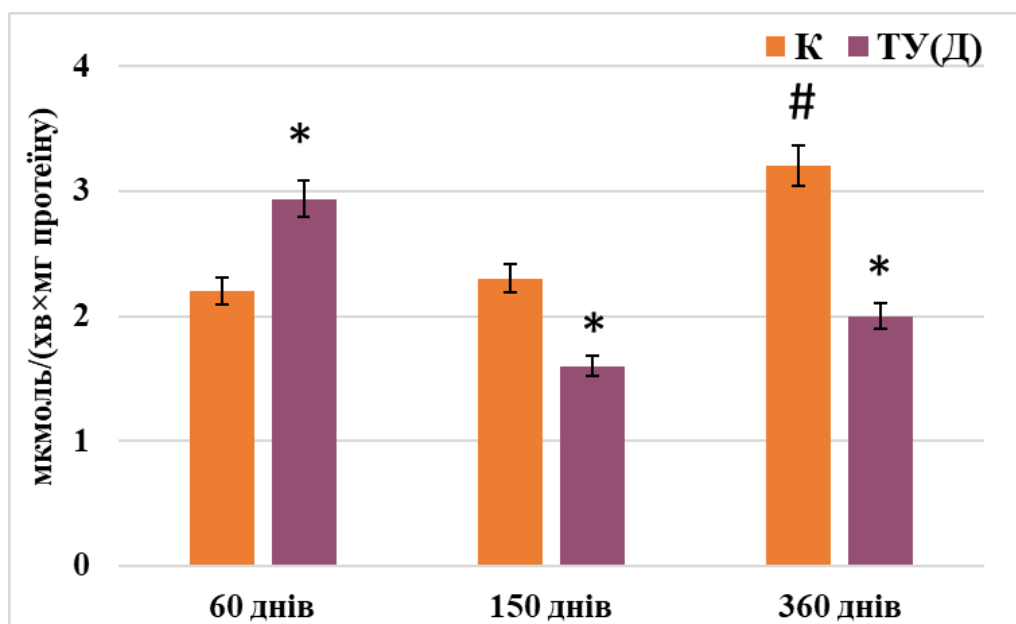
показниками підліткових (60 днів) та репродуктивних (150 днів) (рис. 3.2). Встановлений нами факт можна пояснити наступним чином. У зрілому віці зростає ендогенне утворення супероксиду – побічного продукту дихального ланцюга. Підвищення активності СОД є фізіологічною адаптацією до вікового підвищення рівня АФК, що дозволяє запобігти накопиченню окислювальних пошкоджень.

Разом з тим, зрілий вік супроводжується зниженням ефективності мітохондріального дихання, що збільшує «витік» електронів і утворення супероксиду в мітохондріях. Як відповідь на це, підвищується активність мітохондріальної СОД2, яка захищає мітохондріальні мембрани та ДНК від окислювального ушкодження [39].

Водночас з віком може активуватись транскрипційний фактор Nrf2, який стимулює експресію антиоксидантних генів, включно з СОД1 (цитозольна форма) і СОД2 (мітохондріальна форма). Така реакція є компенсаторною і підтримує редокс-гомеостаз навіть за відсутності зовнішніх токсикантів [40].

Натомість за умов токсичного ураження промисловим ксенобіотиком – дикватом, – залежно від вікових особливостей спостерігаються різноспрямовані зміни активності досліджуваного ензиму. Так, у щурів 60-денного віку активність СОД зростає на 24 % порівняно з контролем, тоді як у щурів репродуктивного та зрілого віку даний показник знижується на 30 % та 37 % відповідно порівняно з контрольними величинами зазначених вікових груп (рис. 3.2).

Можна припустити, що зростання активності супероксиддисмутази у печінці щурів юного віку (60 днів), у відповідь на дикват є адаптивною реакцією, спрямованою на нейтралізацію надлишку супероксиду, який утворюється під дією цього гербіциду (рис.3.2). Організм щурів у юному віці володіє високим регенераторним потенціалом і компенсаторними можливостями, що дозволяє йому швидко мобілізувати антиоксидантний захист у відповідь на токсичне навантаження. Це проявляється у підвищенні активності СОД як частини першої лінії захисту.



**Рис. 3.2. Активність супероксиддисмутази в мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження дикватом**

Ця реакція надзвичайно важлива для клітинного гомеостазу, оскільки надлишок  $O_2^{\cdot -}$  є токсичним і може запускати вільнорадикальні ланцюгові реакції, включно з перекисним окисленням ліпідів, модифікацією білків і пошкодженням ДНК [13].

Посилення активності СОД у печінці 60-денних щурів можна пояснити тим, що в молодому віці клітини мають вищу метаболічну активність і швидше реагують на стресові подразники. Крім того, у цей період функціональна здатність до індукції ферментів-антиоксидантів є найбільш вираженою [14].

У щурів репродуктивного віку (5 місяців), попри загалом зрілу антиоксидантну систему, у відповідь на інтоксикацію дикватом спостерігається зниження активності супероксиддисмутази (рис. 3.2). Це явище можна пояснити кількома біохімічними та молекулярними механізмами: по-перше, надмірна генерація супероксиду може викликати інактивацію СОД. Механізм полягає у нітруванні або окисненні активного центру ферменту, що порушує його функцію. Таким чином, перевищення рівня субстрату ( $O_2^{\cdot -}$ ) фактично пригнічує активність ферменту [41].

По-друге, це може бути виснаження кофакторів ферменту. СОД-1 (цитозольна форма) та СОД-2 (мітохондріальна) є металоферментами, активність яких залежить від наявності іонів міді та цинку (СОД1) або марганцю (СОД2). Токсичний вплив диквату може порушувати обмін металів або спричиняти зв'язування цих іонів у неактивні комплекси, що знижує ферментативну активність [42].

По-третє, щури репродуктивного віку часто піддаються підвищеному метаболічному навантаженню, особливо при хронічній дії токсикантів. Це призводить до часткового виснаження антиоксидантного пулу (зокрема глутатіону, NADPH), що опосередковано послаблює ефективність ферментної антиоксидантної відповіді, включно з СОД [43].

Організм може переорієнтовувати зусилля на альтернативні антиоксидантні шляхи, наприклад, посилювати активність каталази або глутатіонпероксидази за рахунок зниження активності СОД. Це може бути регуляторним механізмом зменшення утворення  $H_2O_2$ , що є продуктом дії СОД і також потенційно токсичним.

Отже, за умов токсичного ураження дикватом в мітохондріальній фракції печінки щурів 60-денного віку посилене продукування супероксиду супроводжується зростанням супероксиддисмутазної активності, тоді як у репродуктивних (150 днів) та зрілих (360 днів) тварин інтенсифікація генерації  $O_2^-$  призводить до зниження досліджуваної ензиматичної активності.

Отримані результати засвідчують, що у відповідь на дію диквату лише в молодих тварин запускається адаптаційна реакція першої ланки захисту ензиматичної антиоксидантної системи. Водночас у репродуктивних та зрілих тварин здатність до антиоксидантної ферментативної компенсації за умов токсичного ураження промисловим ксенобіотиком є зниженою, що вказує на вікову вразливість печінки в умовах субкомпенсованого оксидативного стресу, коли ресурси вже не можуть ефективно протидіяти токсичному навантаженню, попри вік тварини.

Отже, показник СОД є чутливим біомаркером ранньої реакції клітин на оксидативний стрес та може використовуватись для оцінки токсичності екзогенних агентів з урахуванням вікових змін.

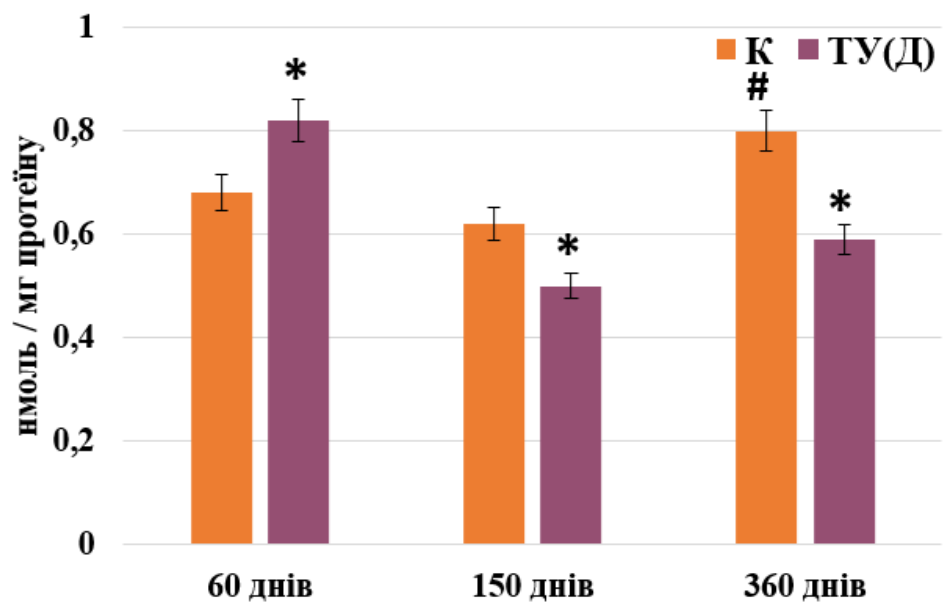
Встановлені зміни рівня активності супероксиддисмутази та концентрації супероксид-аніону в мітохондріальній фракції печінки свідчать про активацію або порушення первинного етапу антиоксидантного захисту клітини у різних вікових групах щурів за умов токсичного ураження дикватом. СОД є ключовим ферментом, який каталізує перетворення токсичного супероксиду ( $O_2^{\cdot-}$ ) у менш реакційноздатний, але все ще потенційно шкідливий метаболіт — пероксид водню ( $H_2O_2$ ). Таким чином, будь-яке зростання або зниження активності СОД безпосередньо впливає на рівень  $H_2O_2$  у клітинному середовищі.

Враховуючи, що  $H_2O_2$  здатний вільно проходити через клітинні мембрани і брати участь у каскаді перекисного окиснення ліпідів, а також викликати окисне пошкодження білків і ДНК, оцінка його концентрації є необхідним продовженням дослідження.

Як видно з рисунку 3.3, в інтактних щурів 360-денного віку рівень пероксиду водню зростає на 18 % (підліткові щури) та 29 % (тварини репродуктивного віку) відповідно.  $H_2O_2$  – менш реактивний, але дифузний окисник, здатний перетинати мембрани і впливати на сигнальні шляхи (наприклад, Nrf2, NF- $\kappa$ B). За нормальних умов  $H_2O_2$  далі розщеплюється каталазою або глутатіонпероксидазою. У молодих клітинах зазначені антиоксидантні ензими ефективно знешкоджують пероксид водню. З віком їх активність знижується, тому  $H_2O_2$  може накопичуватися, що почснює отримані нами результати.

Натомість після введення диквату у тварин 60-денного віку виявлено вірогідне зростання рівня  $H_2O_2$  (на 20 %) у мітохондріальній фракції печінки порівняно з відповідним контролем. Такі результати є наслідком складної взаємодії між утворенням супероксиду, активністю СОД і станом систем, відповідальних за утилізацію  $H_2O_2$ . У молодих щурів (60 днів) інтоксикація

дикватом супроводжується підвищеною генерацією супероксиду (рис. 3.1) та, як реакція, активацією СОД (рис. 3.2). Це сприяє посилене утворенню  $H_2O_2$ , який, за умов недостатньо сформованих механізмів детоксикації накопичується в клітинах. Такий ефект відповідає високому регенераторному потенціалу молодого організму, який намагається компенсувати оксидативний дисбаланс шляхом активації первинної антиоксидантної відповіді



**Рис. 3.3. Вміст пероксиду водню в мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження дикватом**

Водночас у щурів 150- та 360-денної вікової групи спостерігається протилежна тенденція: у 150-денних та 360-денних щурів нами зареєстровано зниження досліджуваного показника на 19 % та 26 % відповідно порівняно з контрольними величинами кожної вікової групи (рис. 3.3). Отримані нами дані узгоджуються з показниками супероксиддисмутазної активності за даних експериментальних умов (рис. 3.2). Незважаючи на посилену генерацію супероксиду в умовах дії диквату (рис. 3.1), активність СОД у цих тварин знижена.

Пероксид водню є одним із головних вторинних продуктів утворення активних форм кисню у клітині. Його рівень визначається балансом між

швидкістю утворення  $O_2^{\bullet-}$ , активністю СОД, яка каталізує дисмутацію супероксиду до  $H_2O_2$ , та ферментативними системами його утилізації – каталази, глутатіонпероксидази, пероксиредоксинів тощо. У разі порушення цього балансу, навіть відносно стабільний  $H_2O_2$  може перетворюватися в небезпечніші радикальні форми, зокрема через реакцію Фентона [44].

Як наслідок, ферментативна дисмутація супероксиду до  $H_2O_2$  відбувається менш ефективно, що і зумовлює менше утворення  $H_2O_2$  порівняно з молодими тваринами. Зниження рівня  $H_2O_2$  в цих умовах не свідчить про зменшення оксидативного стресу, а радше – про неспроможність клітини адекватно перетворювати  $O_2^{\bullet-}$  у менш токсичні форми.

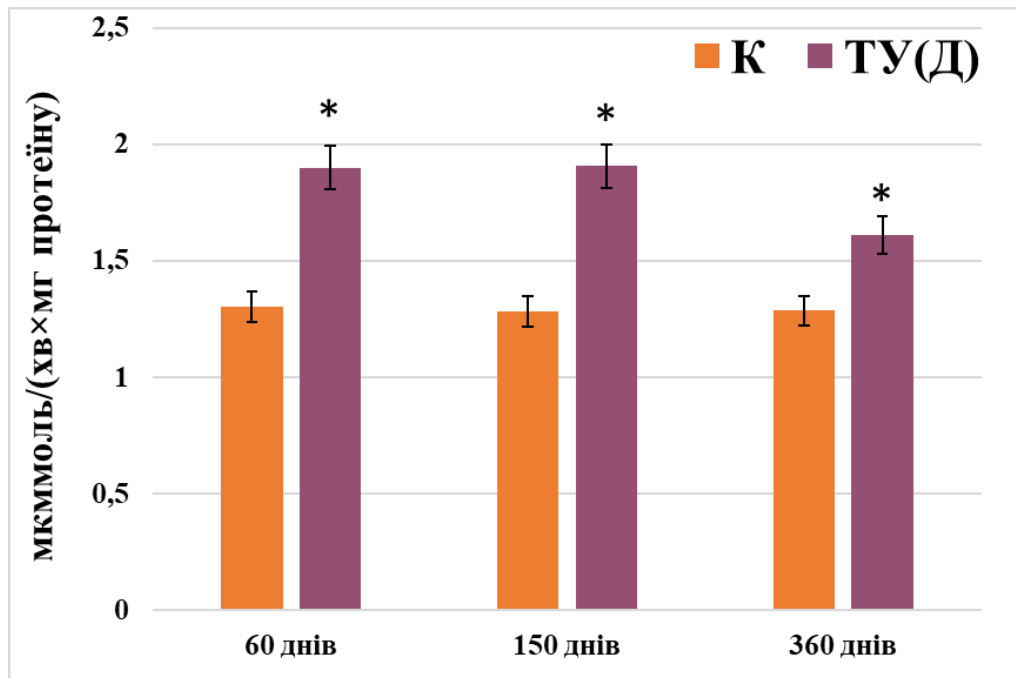
Більше того, надмірна генерація супероксиду в мітохондріях печінки репродуктивних (150 днів) та зрілих (360 днів) тварин здатна не лише порушувати функцію СОД (через окисне ураження її активних центрів), але й нітрувати або інактивувати ферменти, відповідальні за детоксикацію  $H_2O_2$ . Це призводить до небезпечної ситуації, коли обидва компоненти – супероксид і пероксид водню – потенційно можуть взаємодіяти в реакції Габера-Вайса або через реакцію Фентона (за наявності  $Fe^{2+}$ ), генеруючи гідроксильні радикали ( $\bullet OH$ ), які є найагресивнішими з АФК.

Таким чином, у старших щурів нижчий рівень  $H_2O_2$  порівняно з контролем відображає не ефективність антиоксидантного захисту, а його зниження та зміщення токсичного навантаження в бік утворення більш реактивних і небезпечних форм кисню.

Каталаза – один із головних ферментів антиоксидантного захисту клітини, що забезпечує детоксикацію пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) шляхом його розщеплення до води і молекулярного кисню. Цей фермент відіграє критичну роль у попередженні утворення гідроксильного радикалу ( $\bullet OH$ ), що утворюється в реакції Фентона за участі  $H_2O_2$  та  $Fe^{2+}$ .

Нами встановлено, що у всіх вікових групах щурів після введення диквату спостерігалось вірогідне підвищення активності каталази порівняно з

відповідними контролями (рис. 3.4), що свідчить про індукцію антиоксидантної відповіді на тлі можливого розвитку оксидативного стресу.



**Рис. 3.4. Каталазна активність в мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження дикватом**

Підвищення активності каталази у тварин підліткового (60 днів) на 32 % порівняно з контролем. Організм у відповідь на стресову ситуацію (ураження дикватом) активує антиоксидантні ферменти, включно з каталазою, як захисну реакцію, щоб нейтралізувати надлишковий  $\text{H}_2\text{O}_2$ . У підлітковому віці тварини мають високу пластичність метаболізму та здатність до адаптивної активації ферментних систем, що дозволяє каталазі швидко посилити свою активність.

Підвищення каталази не завжди одразу призводить до нормалізації рівня  $\text{H}_2\text{O}_2$ , особливо при постійній дії диквату, що безперервно продукує АФК. У такому разі вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  і далі зростає, але одночасно активується каталаза – клітина намагається врівноважити ситуацію, але поки що не досягає повного відновлення гомеостазу [45].

Отже, зростання активності каталази на тлі підвищеного рівня  $\text{H}_2\text{O}_2$  у мітохондріальній фракції печінки підліткових тварин (60-денних), уражених дикватом, є наслідком індукованої антиоксидантної відповіді, спрямованої на

нейтралізацію оксидативного стресу. Це відображає високу адаптивну здатність організму в молодому віці до боротьби з токсичним навантаженням через активацію ферментних захисних систем. Можна припустити, що такі результати, очевидно, відображають динамічну фазу стрес-відповіді, коли організм ще не повністю компенсував прооксидантний вплив.

Водночас нами зареєстровано вірогідне зростання каталазної активності в мітохондріальній фракції печінки щурів репродуктивного (на 37 %) та зрілого (на 25 %) віку порівняно з відповідними значеннями контролю (рис. 3.4).

Щодо репродуктивних тварин, які мають зрілу та функціонально активну антиоксидантну систему, то відповідь на оксидативний виклик є більш ефективною та швидкою, ніж у молодших або старіючих особин, що показано в наших дослідженнях. При достатньо сильній індукції каталазної активності та/або участі додаткових ферментів (глутатіонпероксидаза, пероксиредоксини), рівень  $H_2O_2$  може знижуватися навіть попри тривале утворення активних форм кисню. Це свідчить про компенсовану фазу антиоксидантної відповіді, коли клітина успішно справляється з прооксидантним навантаженням.

У репродуктивному віці організм знаходиться в піку метаболічної активності і має максимальну ефективність захисних систем, включно з антиоксидантами. Це забезпечує потужну відповідь на токсичне ураження, що і проявляється як зростання каталазної активності з одночасним зниженням рівня  $H_2O_2$ .

Водночас серед усіх вікових груп щурів підвищення каталазної активності у тварин зрілого віку (360 днів) відбувається найменш ефективно (лише на 25 %) порівняно з контролем (рис. 3.4). У зрілому віці збільшується витік електронів у мітохондріях, що призводить до утворення більшої кількості супероксиду ( $O_2^{\cdot-}$ ), а через активність супероксиддисмутази – до  $H_2O_2$ . Підвищення рівня каталази – це компенсаторний механізм, спрямований на утилізацію надлишку  $H_2O_2$ , щоб не допустити його накопичення і

спричиненого ним окисного стресу. У зрілому віці організм починає відчувати помірний, але стійкий оксидативний стрес, навіть при відсутності екзогенних токсикантів. Це стимулює активацію шляху Nrf2, що запускає транскрипцію антиоксидантних ферментів, включаючи каталазу [38].

У зрілому віці антиоксидантна система працює вже на межі функціональних можливостей, порівняно з репродуктивним або підлітковим віком. Реактивність клітин на прооксидантний стрес знижується, тому знижується ефективність адекватно активувати ферментативні захисні системи, зокрема каталазу.

Проте підвищення активності каталази є відображенням захисної відповіді, яка намагається стабілізувати редокс-гомеостаз. У зрілому віці може знижуватись активність глутатіонпероксидази через зниження пулу відновленого глутатіону або зменшення його ресинтезу. В такому разі каталаза бере на себе основне навантаження в детоксикації  $H_2O_2$ , що також сприяє підвищенню її активності як компенсаторного ферменту.

У тварин підліткового віку (60 днів) підвищення рівня пероксиду водню супроводжується зростанням каталазної активності, що свідчить про ефективну адаптивну відповідь на оксидативний стрес. У щурів репродуктивного та зрілого віку, навпаки, спостерігається зростання каталазної активності на тлі зниження вмісту  $H_2O_2$ , що вказує на компенсаторну реакцію організму. При цьому найнижчий внесок у реалізацію цього захисного механізму зареєстровано у щурів зрілого віку, що свідчить про зниження адаптаційного потенціалу антиоксидантної системи з віком.

Таким чином, отримані нами результати, вказують на обмежену ефективність антиоксидантних механізмів при токсичному ураженні промисловими ксенобіотиками в зрілому віці. Це підкреслює необхідність враховувати вікову чутливість до токсикантів та індивідуальні відмінності в оцінці ризиків і формуванні стратегій захисту.

## ВИСНОВКИ

1. За умов токсичного ураження дикватом в мітохондріальній фракції печінки щурів 60-денного віку відбувається посилене продукування супероксиду та пероксиду водню з одночасною активацією супероксиддисмутази та каталази.
2. У репродуктивних (150 днів) та зрілих (360 днів) тварин за умов дикват-індукованого ураження на тлі інтенсифікації генерації супероксидного аніон-радикала в мітохондріях печінки спостерігається зниження супероксиддисмутазної активності.
3. Зниження вмісту  $H_2O_2$  у мітохондріях печінки щурів репродуктивного та зрілого віку за умов введення токсичних доз диквату супроводжується активацією каталази.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dinis-Oliveira R. J. Human and experimental toxicology of diquat poisoning. *Human & Experimental Toxicology*. 2018. V. 37, № 11. P. 1131–1160. DOI: 10.1177/0960327118765330.
2. Ren Y. Imaging findings and toxicological mechanisms of nervous system injury caused by diquat. *Molecular Neurobiology*. 2024. V. 61, № 11. P. 9272–9283.
3. Wu Y. Kidney and lung injury in rats following acute diquat exposure. *Experimental and therapeutic medicine*. 2022. V. 23, № 4. P. 275.
4. Baker A. Catalase: a critical node in the regulation of cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*. 2023. V. 199. P. 56–66.
5. Liu H. Hepatic antioxidant response to diquat *Antioxidants*. 2024. V. 13, № 3. P. 312.
6. Lu S. *Periplaneta americana* extract pretreatment alleviates oxidative stress and inflammation and increases the abundance of gut *Akkermansia muciniphila* in diquat-induced mice *Antioxidants*. 2022. V. 11, № 9. P. 1806.
7. Zhang Q. Toxicity of diquat in aquatic systems *Toxics*. 2023. V. 11, № 2. P. 160.
8. Wang B. Diquat induces cell death and dopamine neuron loss via reactive oxygen species generation in *Caenorhabditis elegans* *Environmental Science & Technology*. 2025. DOI: 10.1021/acs.est.4c07783
9. Han H. Hydroxytyrosol attenuates diquat-induced oxidative stress by activating Nrf2 pathway and modulating colonic microbiota in mice *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2023. V. 113. Article ID: 109256.
10. Wu Y. Probiotic *Bacillus* alleviates oxidative stress-induced liver injury by modulating gut-liver axis in a rat model *Antioxidants*. 2022. V. 11, № 2. P. 291.
11. Peng Y. Extraction, characterization, and antioxidant activity of *Eucommia ulmoides* polysaccharides *Molecules*. 2024. V. 29, № 20 P. 4793.
12. Liu H. Hepatic antioxidant response to diquat *Antioxidants*. 2024. V.13, № 3 P. 312.

13. Duan M. Two cases of diquat poisoning in adolescent children *Italian journal of pediatrics*. 2024. V. 50, №. 1 P. 80.
14. Redza-Dutordoir M. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016. V. 1863, № 12. P. 2977–2992.
15. Fan C. Y. Acute diquat poisoning case with multiorgan failure and a literature review: a case report *World journal of clinical cases*. 2023. V. 11, №27. P. 6565.
16. Pizzino G. Oxidative stress: harms and benefits for human health *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. V.2017, <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
17. Hajam Y. A. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives *Cells*. 2022. V. 11, №. 3. P. 552.
18. Rimessi A. Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: molecular mechanisms, diseases and promising therapies *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016. V. 81. P. 281–293.
19. Ishihara Y. Dual role of superoxide dismutase 2 induced in activated microglia: oxidative stress tolerance and convergence of inflammatory responses *Journal of Biological Chemistry*. 2015. V. 290, №. 37. P. 22805–22817.
20. Pashkovskaia N. Mitochondrial ROS direct the differentiation of murine pluripotent P19 cells *Stem Cell Research*. 2018. V. 30. P. 180–191.
21. Magnani F. ROS generation by NADPH oxidases *Current Opinion in Structural Biology*. 2019. V. 59. P. 91–97.
22. Switzer C. H. The antioxidant and oxidant properties of hydropersulfides (RSSH) and polysulfide species *Redox Biology*. 2022.V. 57. Ar.102486.
23. Hayyan M. Superoxide ion: generation and chemical implications *Chemical Reviews*. 2016. V. 116, № 5. P. 3029–3085.

24. Wang Y. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling *Journal of Cell Biology*. 2018. V. 217, №.6. P. 1915–1928.
25. Baker A. Catalase: a critical node in the regulation of cell fate *Free Radical Biology and Medicine*. 2023. V. 199, P. 56–66.
26. Willems P. The Plant PTM Viewer, a central resource for exploring plant protein modifications *The Plant Journal*. 2019. V. 99, №. 4, P. 752–762.
27. Mergner J. Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome *Nature*. 2020. V. 579, №. 7799. P. 409–414.
28. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's *International Journal of Preventive Medicine*. 2013. Vol. 4, №. 6. P. 624.
29. Wu Y. Z. The experimental study of diquat on the half-lethal dose and pathological injury of related organs in Wistar rats *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*. 2018. V. 36, № 11. P. 813–818.
30. Kitagawa Y. Estimation of the in vivo translational activity of rat liver mitochondria without use of an antibiotic *The Journal of Biochemistry*. 1980. V. 88, № 3. P. 689–693.
31. Tsebrzhynskyi O. I. Кількісне визначення супероксиду НСТ-тестом *Тези доповідей науково-практичної конференції «Організація токсикологічної допомоги в Україні», Київ*. 2002. P. 65–66.
32. Jiang Z. Y. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation *FEBS Letters*. 1990. V. 268, №. 1. P. 69–71.
33. Misra H. P. Fridovich, I. Role of superoxide anion in antioxidation of epinephrine *Journal of Biological Chemistry*. 1972. V. 247, № 10. P. 3170–3175.
34. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range *Clinica Chimica Acta*. 1991. V. 196, № 2–3. P. 143–151.
35. Lowry O. H. Protein measurement with Folin reagent *Journal of Biological Chemistry*. 1951. V. 193, № 1. P. 265–275.

36. Sies H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020. V. 21, № 7. P. 363–383.
37. Xu Q. Acidifiers attenuate diquat-induced oxidative stress and inflammatory responses by regulating NF- $\kappa$ B/MAPK/COX-2 pathways in IPEC-J2 cells *Antioxidants*. 2022. V. 11, № 10. Article № 2002.
38. Wang Y. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling *Journal of Cell Biology*. 2018. V. 217, № 6. P. 1915–1928.
39. Cheron M. Aminomethylphosphonic acid alters amphibian embryonic development at environmental concentrations *Environmental Research*. 2020. V. 190. Article № 109944.
40. Montllor-Albalade C. Extra-mitochondrial Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) is dispensable for protection against oxidative stress but mediates peroxide signaling in *Saccharomyces cerevisiae* *Redox Biology*. 2019. V. 21. Article № 101064.
41. Kitada M. Manganese superoxide dismutase dysfunction and the pathogenesis of kidney disease *Frontiers in Physiology*. 2020. V. 11. Article № 755.
42. Wang P. Diquat exacerbates oxidative stress and neuroinflammation by blocking the autophagic flux of microglia in the hippocampus *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2024. V. 286. Article № 117188.
43. Kim K. Excessively enlarged mitochondria in the kidneys of diabetic nephropathy *Antioxidants*. 2021. V. 10, № 5. Article № 741.
44. Sun X. Dietary glucose oxidase and/or catalase supplementation alleviates intestinal oxidative stress induced by diquat in weaned piglets *Animal Science Journal*. 2021. V. 92, № 1. P. e13634.

## ДОДАТКИ

### Охорона праці та безпеки у надзвичайних ситуаціях

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватися наступних заходів безпеки:

- забороняється заходити в лабораторію в верхньому одязі
- працювати в біохімічній лабораторії можна тільки в спеціальному халаті, оскільки ймовірна можливість забруднення, псуванню одягу при потрапляння їдких реактивів.

### *Правила роботи з реактивами*

- концентровані кислоти та луги повинні знаходитись під витяжною шафою;
- усі дослідження з отруйними речовинами та речовинами з їдким запахом проводити тільки під витяжною шафою;
- наливати або насипати реактиви слід тільки над столом ;
- не слід залишати відкритими банки з реактивами;
- пролиті або розсипані реактиви потрібно негайно видалити зі столу, витерти стіл ганчіркою та промити водою;
- пролиті концентровані кислоти необхідно засипати піском, потім зібрати пісок лопаткою. Дане місце необхідно промити розчином соди та витерти ганчіркою;
- під час роботи з органічними розчинниками (спирти, ефіри, ацетон, бензол тощо) не можна визначати речовину за запахом, щоб уникнути отруєнням їх парами;
- наповнення піпеток розчинами органічних розчинників, кислот, лугів проводять тільки за допомогою груші;
- уважно стежити за тим, щоб реактиви (особливо кислоти і луги) не потрапляли на обличчя, руки та одяг;
- не ходити по лабораторії з концентрованими кислотами, а наливати їх тільки в певному, відведеному для цього місці;

- не забруднювати реактиви під час роботи: не плутати пробки від склянок, які містять різні реактиви; надлишок взятого реактиву не виливати назад у посуд; набирати кожен реактив тільки призначеною для нього піпеткою і в жодному разі не плутати їх;
- у випадку потрапляння на шкіру концентрованої кислоти, уражене місце необхідно промити великою кількістю води, а потім розведеним розчином соди;
- при потраплянні розчинів лугів на шкіру уражене місце потрібно обробити спочатку розведеною кислотою, а потім водою.

### ***Правила роботи з нагрівальними приладами***

- перед тим як запалити спиртівку – переконатися, що поблизу немає легкозаймистих рідин (спирт, ефір тощо);
- запалювати спиртівку можна тільки сірником;
- у пробірці можна нагрівати лише невелику кількість розчину, рідина повинна займати не більше 1/3 об'єму пробірки;
- пробірку при нагріванні необхідно направляти в сторону від себе і людей, які знаходяться поруч;
- не можна нахилитися над спиртівкою: спочатку пробірку з розчином потрібно прогріти всю, а потім нагрівати в потрібному місці, не виймаючи з полум'я спиртівки;
- не можна нагрівати пробку довго в одному місці, оскільки рідина швидко закипить і вихлюпнеться із пробірки;
- нагрівати пробірку потрібно нижче рівня рідини в ній;
- при нагріванні рідини не можна торкатися колбою палаючого гніту, завжди дотримуватися правил безпеки при нагріванні, не допускати виприскання рідин (час від часу відводити пробірку від полум'я, не нагрівати її у вертикальному положенні);
- після нагрівання слід відразу загасити спиртівку, накривши полум'я ковпачком;

- робота з водяною банею здійснюється тільки під тягою;
- при опіках на обпечене місце потрібно покласти вату, змочену розчином перманганату калію.

### ***Правила роботи з лабораторним обладнанням***

#### **Центрифуги**

- перед центрифугуванням центрифужні пробірки врівноважують та розміщують у центрифугу симетрично;
- центрифужна камера повинна бути закрита кришкою
- під час роботи центрифуги забороняється відкривати кришку камери;
- після відключення центрифуги необхідно дати можливість ротору зупинитися, забороняється гальмувати ротор рукою.

#### **Автоматичні піпетки**

- тримаючи піпетку у вертикальному положенні натиснути кнопку до першого упору (фаза А);
- занурити наконечник в рідину на глибину 3 до 5 мм (фаза С);
- доторкнутися наконечником до внутрішньої стінки посудини і спорожнити наконечник, плавно натискаючи на кнопку до першого упору з такою ж швидкістю як при взятті проби (фаза Д);
- почекати близько 1 секунди, натискаючи кнопку піпетки до другого упору, видалити залишки рідини і вийняти піпетку, ковзаючи наконечником по внутрішній стінці посудини (фаза Е);
- після зняття наконечника піпетка готова до повторення циклу роботи;
- забороняється набирати рідину піпеткою без наконечника;
- під час роботи з рідиною, що має температуру, відмінну від температури навколишнього середовища більше 5°C рекомендується багаторазово прополоскати наконечники;
- після закінчення роботи слід помістити піпетку в штативі.