

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів

Кафедра біохімії та біотехнології

БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ
ГЕПАТОБІЛІАРНОЇ СИСТЕМИ ЗА УМОВ ВПЛИВУ
ДІЕТИЛФТАЛАТУ

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 200 М групи

Рахматова Катерина Вікторівна

Керівник:

к.б.н., доцент Кеца О. В.

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри

протокол № ____ від „____” _____ 2025 р.

зав. кафедри _____ доцент Волощук О. М.

Чернівці–2025

АНОТАЦІЯ

У магістерській роботі досліджено вплив діетилфталату (ДЕФ) на функціональний стан гепатобіліарної системи з використанням комплексу біохімічних маркерів. У ході дослідження визначення активності основних ферментів функціонального стану гепатобіліарної системи – аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), лужної фосфатази (ЛФ), γ -глутамілтранспептидази (ГГТ), концентрації загального білірубіну, тимолової проби.

Встановлено, що введення ДЕФ призводить до дозо- та часозалежних змін маркерів функціонального стану печінки. Показано, що у дозі 5,4 мг/кг ДЕФ викликав значне підвищення активності АЛТ та АСТ вже на 14-й день впливу ксенобіотика, що свідчить про пошкодження гепатоцитів. До 21-го дня експерименту обидві дози ксенобіотика (2,5 та 5,4 мг/кг) викликали помітне підвищення всіх досліджуваних сироваткових маркерів функції печінки.

Підвищена активність ГГТ та ЛФ, поряд з підвищеним рівнем загального та прямого білірубіну, свідчила про розвиток холестатичної дисфункції. Крім того, збільшення значень тимолового тесту вказувало на порушення білоксинтезуючої функції печінки.

Ключові слова: аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, лужна фосфатаза, γ -глутамілтранспептидаза, білірубін, печінка, діетилфталат.

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

_____ К. В. Рахматова

ABSTRACT

In the master's thesis, the effect of diethyl phthalate (DEP) on the functional state of the hepatobiliary system was investigated using a set of biochemical markers. In the course of the study, the activity of the main enzymes that reflect the functional state of the hepatobiliary system was determined – alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (GGT), as well as the concentration of total bilirubin and the thymol turbidity test.

It was established that administration of DEP leads to dose- and time-dependent changes in markers of liver functional state. It was shown that at a dose of 5.4 mg/kg, DEP caused a significant increase in ALT and AST activity as early as day 14 of xenobiotic exposure, indicating hepatocyte damage. By day 21 of the experiment, both xenobiotic doses (2.5 and 5.4 mg/kg) caused a noticeable increase in all studied serum markers of liver function. Increased activity of GGT and ALP, along with elevated levels of total and direct bilirubin, indicated the development of cholestatic dysfunction.

In addition, the increased values of the thymol test pointed to impaired protein-synthetic function of the liver.

Keywords: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyl transpeptidase, bilirubin, liver, diethyl phthalate.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Структура, класифікація та біологічна роль біохімічних маркерів стану печінки	8
1.1.1 Загальна характеристика основних ферментів та метаболітів, що використовуються для оцінки функціонального стану печінки	8
1.1.2. Гамма-глутамілтрансфераза як показник печінкової та біліарної функції	9
1.1.3. Аланінамінотрансфераза та її роль у діагностиці уражень печінки	10
1.2. Роль змін активності біохімічних маркерів у розвитку паталогічних станів печінки	12
1.3. Токсична дія диетилфталату	14
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	17
2.1. Об'єкт та методи досліджень	17
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	23
ВИСНОВКИ	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	35
ДОДАТКИ	38

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

АЛТ - аланінамінотрансфераза

ГГТ- гамма-глутамілтрансфераза

ДЕФ – діетилфталат

ЛФ – лужна фосфатаза

МЕФ – моноетилфталат

ВСТУП

У сучасному світі інтенсивного техногенного розвитку людина щоденно зазнає впливу численних хімічних речовин, багато з яких мають потенційно токсичні властивості. Особливу небезпеку становлять ксенобіотики – чужорідні для організму сполуки, здатні викликати структурно-функціональні порушення в органах та системах. Однією з таких речовин є діетилфталат (ДЕФ) – широко розповсюджений компонент у виробництві пластиків, косметичних засобів, лакофарбових матеріалів, пестицидів, а також медичних виробів.

Гепатобіліарна система відіграє ключову роль у метаболізмі, детоксикації та виведенні ксенобіотиків. Саме печінка першою зазнає ушкодження при надходженні токсичних речовин, і тому функціональний стан гепатоцитів є важливим об'єктом дослідження при токсичних ураженнях. Вплив фталатів, зокрема діетилфталату, на печінку пов'язують із розвитком окисного стресу, порушенням ферментативної активності, змінами у метаболізмі ліпідів та білків, а також апоптозом клітин печінкової паренхіми.

Упродовж останніх десятиліть все більше науковців зосереджують увагу на вивченні біохімічних маркерів, які дозволяють об'єктивно оцінити функціональний стан гепатобіліарної системи. До таких маркерів належать активність трансаміназ (АЛТ, АСТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ), рівень білірубіну, альбуміну, загального білка, а також показники оксидативного стресу — малонового діальдегіду (МДА), глутатіону тощо. Їх зміни є чутливими індикаторами токсичного ураження і можуть свідчити про порушення бар'єрної, метаболічної та синтетичної функцій печінки.

Значення вивчення біохімічних маркерів за умов впливу ДЕФ полягає не лише в поглибленні фундаментального розуміння механізмів гепатотоксичності, але й у можливості ранньої діагностики токсичних гепатопатій. Розробка таких діагностичних підходів є надзвичайно актуальною у зв'язку з широким використанням фталатів у побуті та

промисловості, їх здатністю до накопичення в організмі та тривалої дії навіть у низьких дозах.

Актуальність теми дослідження обумовлена зростанням частоти захворювань гепатобіліарної системи, пов'язаних із токсичним навантаженням на організм, зокрема у промислово розвинених регіонах. Крім того, результати експериментальних досліджень можуть мати значення для профілактики, ранньої діагностики та корекції патологічних станів печінки, викликаних фталатами.

Враховуючи вище вказане *метою роботи* було визначити біохімічні маркери функціонального стану печінки щурів за умов дії ксенобіотика діетилфталату.

Відповідно до мети були поставлені наступні *завдання*:

1. Дослідити вплив діетилфталату на активність трансаміназ – аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) – з метою оцінки проявів цитолітичного синдрому.
2. Оцінити зміни активності γ -глутамілтранспептидази (ГГТ) під дією різних доз та тривалості експозиції діетилфталату для визначення ознак холестатичної дисфункції.
3. Визначити активність лужної фосфатази (ЛФ) як маркера порушення жовчовидільної функції печінки та оцінити її динаміку при надходженні діетилфталату.
4. Дослідити зміни рівнів загального білірубину та його фракцій (прямого та непрямого) для виявлення порушень пігментного обміну та можливого розвитку холестазу.
5. Оцінити параметри тимолової проби як маркера білоксинтезуючої функції печінки та визначити ступінь її порушення під впливом діетилфталату.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Структура, класифікація та біологічна роль біохімічних маркерів стану печінки.

1.1. Загальна характеристика основних ферментів та метаболітів, що використовуються для оцінки функціонального стану печінки

Печінка є центральним органом метаболізму, детоксикації, синтезу білків, зокрема факторів згортання крові, а також накопичення енергетичних субстратів. Для оцінки її функціонального стану широко застосовуються біохімічні показники, які відображають ушкодження гепатоцитів, порушення жовчовиділення або синтетичну дисфункцію [1, 2].

Амінотрансферази

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) і аспартатамінотрансфераза (АСТ) – це ферменти, що локалізуються переважно в цитозолі (АЛТ) і мітохондріях (АСТ) гепатоцитів. Підвищення їхньої активності в сироватці крові свідчить про ушкодження клітинної мембрани печінки та вихід ферментів у кровотік. АЛТ вважається більш специфічним маркером печінки, тоді як АСТ може зростати також при ураженні серцевого м'яза чи скелетних м'язів [3, 4].

Гамма-глутамілтрансфераза та лужна фосфатаза

Ці ферменти є індикаторами холестазу. ГГТ бере участь у транспорті амінокислот і відновленні глутатіону. Вона є чутливим, але малоспецифічним маркером, що підвищується при внутрішньопечінковому або позапечінковому застої жовчі, а також при зловживанні алкоголем [5]. ЛФ — фермент, активність якого зростає при порушенні відтоку жовчі, переважно при механічній жовтяниці [6].

Білірубін

Пігмент, що утворюється внаслідок катаболізму гемоглобіну. Загальний білірубін складається з непрямого (некон'югованого) і прямого (кон'югованого) компонентів. Підвищення рівня непрямого білірубіну

характерне для гемолітичної жовтяниці або порушення кон'югації в гепатоцитах, тоді як зростання прямого – для холестатичних порушень [7].

Комплексна оцінка функціонального стану печінки включає інтерпретацію всіх зазначених показників у динаміці, з урахуванням клінічних проявів, анамнезу та результатів інструментальних досліджень.

Отже, наведені біохімічні маркери – активність амінотрансфераз, ГГТ, ЛФ, а також рівні загального білірубіну та його фракцій – відіграють ключову роль у комплексній оцінці функціонального стану печінки. Їхнє дослідження дає змогу своєчасно виявляти цитолітичні, холестатичні та метаболічні порушення, що є важливим для діагностики, контролю перебігу патологічних процесів і оцінки впливу потенційно гепатотоксичних агентів.

1.1.2. Гамма-глутамілтрансфераза як показник печінкової та біліарної функції

Гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ) — це мембранозв'язаний фермент, який бере участь у метаболізмі глутатіону, зокрема в процесі перенесення гамма-глутамілових груп до акцепторних амінокислот. Найвища активність ГГТ виявляється в нирках, печінці, підшлунковій залозі, селезінці й простаті. У клінічній практиці визначення ГГТ застосовується переважно як чутливий маркер порушень жовчовиділення (холестази) та ушкодження гепатоцитів, особливо у поєднанні з іншими печінковими ферментами [2, 5].

Активність ГГТ у сироватці крові значно зростає при внутрішньо- або позапечінковому холестазі, обструкції жовчних шляхів, первинному біліарному холангіті, а також у разі токсичних або медикаментозних уражень жовчовивідної системи [6]. У таких випадках підвищення ГГТ, як правило, супроводжується підвищенням лужної фосфатази (ЛФ), але на відміну від ЛФ, ГГТ має вищу чутливість, хоча й нижчу специфічність [4]. Висока активність ГГТ без змін ЛФ може свідчити про інші фактори, наприклад,

зловживання алкоголем, прийом гепатотоксичних препаратів або індукторів мікросомальних ферментів.

Підвищення активності ГГТ також спостерігається при гепатоцелюлярних ураженнях, таких як вірусні гепатити, токсичні ураження печінки (наприклад, вплив фталатів, включно з діетилфталатом), цироз та гепатити неясної етіології. Проте у випадку ізольованого гепатоцелюлярного ушкодження, ГГТ рідко використовується як незалежний маркер, оскільки його підвищення менш специфічне, ніж активність АЛТ або АСТ [3].

Фермент є важливим індикатором індукції мікросомальних ферментів печінки, особливо в контексті дії ксенобіотиків, включаючи лікарські засоби та ендокринно-активні речовини (наприклад, діетилфталат). У тваринних моделях дослідження змін активності ГГТ дозволяє оцінити ступінь ураження гепатоцитів під впливом токсичних чинників [13,14].

Отже, ГГТ – високочутливий індикатор порушень жовчовиділення та токсичного ураження печінки, зокрема при дії ксенобіотиків, таких як діетилфталат. Аналіз динаміки активності ГГТ у поєднанні з іншими біохімічними показниками дає можливість більш точно оцінити характер і ступінь ушкодження гепатобіліарної системи, а також виявити ранні прояви холестатичних і гепатоцелюлярних порушень.

1.1.3. Аланінамінотрансфераза та її роль у діагностиці уражень печінки

АЛТ, або сироваткова глутамат-піруваттрансаміназа (ГПТ), – це внутрішньоклітинний фермент, який каталізує зворотну реакцію переносу аміногрупи від аланіну до α -кетоглутарату з утворенням пірувату та глутамату (рис.1.1). У нормальних умовах АЛТ локалізується переважно в цитоплазмі гепатоцитів, а також у меншій кількості в клітинах серця, скелетних м'язів, нирок і підшлункової залози [2].

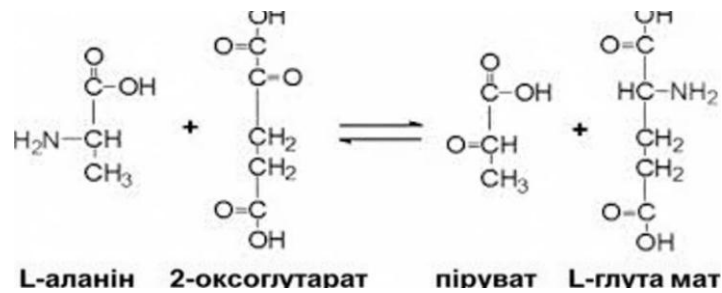


Рис.1.1 Схема реакції трансамінування за участі аланінамінотрансферази

АЛТ є одним із найважливіших біохімічних маркерів гепатоцелюлярного ураження, оскільки її активність у сироватці крові зростає при ушкодженні клітинної мембрани гепатоцитів. Це може спостерігатися при вірусних гепатитах, медикаментозній гепатотоксичності, ішемічному гепатиті, неалкогольній жировій хворобі печінки, токсичному ураженні (наприклад, при дії фталатів) тощо [4, 17].

Підвищення рівня АЛТ часто є першою ознакою патології печінки, навіть за відсутності клінічних симптомів. Найвищі значення АЛТ (>1000 МО/л) типові для гострих вірусних гепатитів (наприклад, гепатит А, В, С), ішемічного гепатиту та токсичного ураження печінки [3].

У пацієнтів із хронічними захворюваннями печінки, включаючи жирову хворобу печінки або хронічний гепатит, рівень АЛТ зазвичай помірно підвищений, але при прогресуванні у цироз він може знижуватись, що свідчить про зниження кількості функціональних гепатоцитів [19].

Для уточнення характеру ураження використовують співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітиса). Значення менше 1 характерне для вірусного гепатиту, тоді як значення >2 найчастіше свідчить про алкогольне ураження печінки [20]. Однак оцінка цього співвідношення має обмежену точність і повинна застосовуватися разом з іншими клініко-лабораторними показниками.

Попри високу чутливість, АЛТ не є повністю специфічним маркером виключно печінки. Її активність може бути підвищеною при інтенсивному фізичному навантаженні, травмах м'язів або при захворюваннях серця [6]. Крім того, на рівень ферменту можуть впливати деякі фізіологічні стани (наприклад, вагітність) або метаболічні порушення.

Отже, АЛТ є базовим і інформативним лабораторним показником при первинному обстеженні пацієнтів із підозрою на патологію печінки, однак для підвищення специфічності його доцільно поєднувати з іншими маркерами: АСТ, білірубін, ГГТ, ЛФ, альбуміном та показниками згортання крові.

1.2. Роль змін активності біохімічних маркерів у розвитку патологічних станів печінки

Біохімічні маркери функціонального стану печінки є надзвичайно чутливими індикаторами її ушкодження та дозволяють виявити патологічні процеси ще на доклінічній стадії. Зміни активності таких ферментів, як АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛФ, а також рівнів метаболітів (білірубін, альбумін, аміак, сечовина), відображають як характер, так і ступінь ураження печінкової тканини [2,23].

Одним із найпоширеніших варіантів патології печінки є гепатоцелюлярне ураження, що супроводжується руйнуванням мембран гепатоцитів. У такому випадку в кров потрапляють внутрішньоклітинні ферменти, зокрема АЛТ і АСТ. Значне зростання АЛТ частіше вказує на гостре ураження печінки, як-от вірусні гепатити або медикаментозна токсичність, тоді як зростання АСТ переважає при алкогольному ураженні печінки чи ураженні мітохондрій [17].

Зміна співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітіса) дозволяє орієнтовно диференціювати між різними типами ушкодження [20].

При порушенні жовчовиділення зростає активність ферментів, локалізованих у мембранах жовчних капілярів – ГГТ і ЛФ. Їхня концентрація підвищується при внутрішньопечінковому або поза печінковому холестазі, обструкції жовчних протоків, а також при токсичних впливах (наприклад, діетилфталату) [5]. У клінічній практиці саме ГГТ часто використовується як ранній маркер алкогольного або медикаментозного ураження, оскільки реагує на індукцію мікросомальних ферментів печінки [14].

Зниження рівня альбуміну, подовження протромбінового часу, зниження сечовини та підвищення аміаку свідчать про зниження синтетичної здатності гепатоцитів. Такі зміни характерні для прогресуючих хронічних уражень, зокрема цирозу.

Гіпоальбумінемія асоціюється з розвитком набрякового синдрому, а гіпо-протромбінемія — з геморагічними проявами [28].

Порушення обміну білірубіну є ключовою ознакою жовтяниць різного генезу. Зростання рівня непрямого білірубіну характерне для порушення кон'югації або надмірного гемолізу, тоді як зростання прямого білірубіну — для холестазу або механічної обструкції [3].

Під впливом ксенобіотиків, таких як фталати (зокрема діетилфталат), відбувається індукція мікросомальних ферментів, активація оксидантного стресу та пошкодження мембран гепатоцитів. Це супроводжується підвищенням АЛТ, АСТ, ГГТ і маркерів перекисного окиснення ліпідів, таких як малоновийдіальдегід (МДА) [13,31]. Хронічне надходження таких сполук у низьких дозах може спричинити поступовий розвиток стеатогепатиту або фіброзу печінки.

Отже, зміни активності біохімічних маркерів є не лише індикатором функціонального стану печінки, але й важливим патогенетичним компонентом розвитку гепатопатій. Моніторинг динаміки цих показників дозволяє оцінити ступінь ушкодження, ефективність терапії та прогноз для пацієнта.

1.3. Токсична дія діетилфталату

Діетилфталат (ДЕФ) — це похідне фталевої кислоти, що широко використовується як пластифікатор у виробництві полімерів, косметичних засобів, фармацевтичних препаратів, побутової хімії та пакувальних матеріалів. Він належить до групи фталатів — ендокринно-руйнівних речовин (endocrine-disrupting chemicals, EDCs), які здатні втручатися в гормональну регуляцію та метаболізм організму людини [14].

Основним шляхом надходження ДЕФ в організм є пероральний (через їжу та воду), інгаляційний та через шкіру. Після потрапляння в організм діетилфталат метаболізується з утворенням моноетилфталату (рис.1.3), який вважається основним біомаркером впливу фталатів [33].

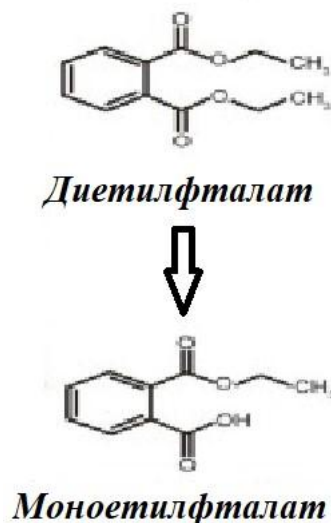


Рис.1.2. Схема гідролізу діетилфталату з утворенням моноетилфталату

Гепатотоксичність діетилфталату

Печінка є основним органом, відповідальним за метаболізм і детоксикацію ксенобіотиків. При надходженні фталатів у печінці активуються ферментні системи цитохрому Р450, зокрема СYP2E1 та СYP3A, що призводить до утворення реактивних метаболітів і індукції оксидативного стресу [13, 35].

Гепатотоксична дія ДЕФ реалізується через кілька механізмів:

- Порушення мембранної цілісності гепатоцитів, що проявляється зростанням активності АЛТ, АСТ, ГГТ у сироватці крові [16];
- Підвищення рівня малонового діальдегіду (МДА) — маркера перекисного окислення ліпідів, що свідчить про ушкодження клітинних мембран [17];
- Зниження вмісту відновленого глутатіону (GSH) — основного антиоксиданту гепатоцитів;
- Зниження рівня альбуміну та порушення біосинтетичної функції печінки;
- Активізація апоптозу через зміну експресії білків Bcl-2/Bax [18].

У досліджах на тваринах виявлено, що тривале надходження ДЕФ у малих дозах може призводити до стеатозу печінки, фіброзу, зміни структури гепатоцитів, зростання ядерної площі та порушення мітозу. При високих концентраціях спостерігали цитоліз, некроз та дегенеративні зміни в печінковій паренхімі [19].

Згідно з дослідженнями, більше 90% населення Європи та США має сліди фталатів у сечі, зокрема метаболітів діетилфталату [20]. Фталати проникають через плацентарний бар'єр і можуть накопичуватися в тканинах плода, впливаючи на розвиток печінки, ендокринної та репродуктивної систем [21]. Особливо вразливими до дії фталатів є вагітні жінки, діти та люди з хронічними захворюваннями печінки.

У Європейському Союзі та багатьох країнах світу використання діетилфталату у виробництві дитячих товарів та косметики обмежене або заборонене згідно з Регламентом (ЄС) № 1907/2006 (REACH). Проте повністю уникнути його надходження неможливо через повсюдне поширення в навколишньому середовищі.

Перспективним напрямом є дослідження захисних агентів, таких як антиоксиданти (вітамін Е, N-ацетилцистеїн, флавоноїди), які здатні зменшувати ушкодження печінки, викликане впливом фталатів [22].

У контексті сучасних даних особливо важливо підкреслити, що тривалий вплив малих доз ДЕФ може спричиняти латентні зміни – від порушення ліпідного обміну та розвитку стеатозу до перебудови клітинного метаболізму, що підсилює вразливість печінки до інших токсичних чинників. Деякі дослідження також вказують на можливі епігенетичні ефекти фталатів, які здатні впливати на функціонування печінки тривалий час після припинення контакту з токсикантом.

Комплексна оцінка біохімічних маркерів, включно з АЛТ, АСТ, ГГТ, ЛФ, білірубінном і його фракціями, а також тестами, що відображають білоксинтезувальну здатність печінки, дає змогу виявляти ранні прояви токсичної дії ДЕФ. Додаткові експериментальні дослідження, спрямовані на пошук антиоксидантних та цитопротекторних агентів, можуть стати основою для розробки ефективних профілактичних і корекційних підходів.

Отже, діетилфталат – поширеним ксенобіотиком із вираженим гепатотоксичним потенціалом, який реалізується через індукцію оксидативного стресу, порушення мембранної цілісності гепатоцитів, дисфункцію антиоксидантної системи та активацію апоптозу. З огляду на широке застосування ДЕФ у промисловості та його здатність проникати в біологічні рідини, тканини, дослідження механізмів його токсичної дії є надзвичайно актуальним.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт та методи досліджень

У дослідженні використовувалися білі безпородні щури масою 150–180 г, яких утримували на стандартному віварійному раціоні, збалансованому за основними поживними речовинами. Тварини мали необмежений доступ до питної води та корму. Усі експериментальні процедури проводили відповідно до принципів біоетики та Міжнародних рекомендацій щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами, а також згідно з вимогами Директиви 86/609/ЄЕС стосовно захисту тварин, що використовуються в наукових цілях.

Згідно з метою та завданнями роботи, щурів було розподілено на три групи по 12 особин у кожній:

- I група (контрольна) – інтактні тварини без впливу досліджуваного чинника;
- II група – тварини, яким перорально вводили діетилфталат (ДЕФ) у дозі 2,5 мг/кг маси тіла;
- III група – тварини, яким перорально вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла.

Вибір доз базувався на літературних даних, які вказують, що максимально допустиме добове надходження ДЕФ не повинно перевищувати 5 мг/кг маси тіла [23]. Відповідно, у дослідженні було використано середню дозу 2,5 мг/кг та підвищену дозу 5,4 мг/кг. Введення препарату здійснювали щодня протягом 21 доби. Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 14-й та 21-й день після початку експерименту, відбираючи по 6 тварин з кожної експериментальної групи. Кров брали з центральної сонної артерії у попередньо пронумеровані центрифужні пробірки. Отримані проби центрифугували протягом 15 хв при 1000об/хв. з метою одержання сироватки.

У сироватці крові визначали вміст загального, прямого та непрямого білірубіну, активність АЛТ та ГГТ. Окрім того, визначали вміст ЛФ.

Визначення загального білірубіну

Дослідження концентрації загального білірубіну проводили із застосуванням комерційного набору реагентів High Technology, Inc. (США) згідно з інструкцією виробника. Метод ґрунтується на реакції білірубіну з діазотованою сульфаніловою кислотою у кислому середовищі з утворенням пофарбованої сполуки — азобілірубіну, інтенсивність забарвлення якої прямо пропорційна вмісту білірубіну в зразку.

Для визначення загального білірубіну використовують кофеїн-бензоатний активатор, що переводить непрямий (зв'язаний з альбуміном) білірубін у розчинну форму, доступну для реакції.

Хід виконання аналізу:

1. У пробірку вносили 1,0 мл реактиву №1 та 0,05 мл сироватки крові.
2. Додали 0,2 мл реактиву №2, ретельно перемішують.
3. Інкубували проби протягом 5 хв при температурі (20–25) °С.
4. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 546 нм відносно холостої проби.

5. Концентрацію білірубіну розраховували за формулою:

$$C(\text{мг/дл}) = A(\text{зразка})/A(\text{стандарту}) * C(\text{стандарту}),$$

де $A(\text{зразка})$ — оптична густина зразка,

$A(\text{стандарту})$ — оптична густина стандарту,

$C(\text{стандарту})$ — концентрація стандарту.

Методика визначення прямого білірубіну

Вміст прямого (кон'югованого) білірубіну визначали аналогічним методом, але без додавання активатора, оскільки він розчинний у воді та безпосередньо вступає в реакцію з діазотованою сульфаніловою кислотою.

Хід виконання аналізу:

1. У пробірку додали 1,0 мл реактиву №1 та 0,05 мл сироватки крові.
2. Внесли 0,2 мл реактиву №2, перемішують.
3. Інкубували 5 хв при кімнатній температурі.

4. Оптичну густина вимірювали при 546 нм відносно холостої проби.
5. Концентрацію прямого білірубіну обчислювали за тією ж формулою, що і для загального білірубіну.

Методика визначення АЛТ

Метод ґрунтується на визначенні швидкості утворення піровиноградної кислоти (пірувату) внаслідок реакції переамінування між аланіном та α -кетоглутаратом за участю ферменту АЛТ. Піруват, що утворюється, відновлюється NADH у присутності лактатдегідрогенази (ЛДГ) з утворенням лактату. Зменшення оптичної щільності NADH вимірюється спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Активність ферменту прямо пропорційна швидкості зниження поглинання.

Хід аналізу

1. Реактиви попередньо довели до температури +37 °С.
2. У кювету внесли робочий розчин субстрату та буфера.
3. Додали досліджувану сироватку у визначеному об'ємі.
4. Перемішали та відразу розпочали вимірювання зміни оптичної щільності при 340 нм протягом 1–3 хв.
5. Розрахунок активності ферменту проводили за зміною поглинання NADH.

Методика визначення ГГТ

Метод ґрунтується на визначенні швидкості утворення р-нітроаніліну внаслідок перенесення γ -глутамільної групи з γ -глутаміл-п-нітроаніліду на акцептор — гліцилгліцин. У результаті реакції звільняється р-нітроанілін, який має інтенсивне жовте забарвлення і поглинає світло при довжині хвилі 405 нм. Зростання оптичної щільності прямо пропорційне активності ферменту в досліджуваному зразку

Хід аналізу

1. Довели реактиви до температури +37 °С.

2. У кювету внесли субстратний розчин та буфер.
3. Додали зразок сироватки.
4. Перемішали та розпочали вимірювання оптичної щільності при 405 нм.
5. Вимірювали збільшення оптичної щільності щохвилини протягом 1–3 хв.

Розрахунок результатів був проведений за формулою

$$A = \Delta E / \text{хв.} * 1510, \text{ де}$$

A – активність γ -ГТ в дослідному зразку, Од/л.

ΔE – зміна оптичної щільності дослідного зразка за хвилину, одиниць оптичної щільності.

1510 – теоретичний чинник перерахунку для вираження активності γ -ГТ в Од/л

Методика визначення ЛФ

Метод базується на кінетичному вимірюванні швидкості гідролізу р-нітрофенілфосфату (рNPP) до р-нітрофенолу (рNP) у лужному середовищі під дією ЛФ. У лузі рNP набує інтенсивного жовтого забарвлення з максимумом поглинання при 405 нм. Приріст оптичної густини за одиницю часу прямо пропорційний активності ферменту в зразку.

Хід аналізу

1. Довели буфер і субстрат до +37 °С.
2. У кювету внесли:
 - Буферний реагент 1,0 мл
 - Субстратний розчин 0,25 мл
 Перемішали, термостатували 1 хв.
3. Додали зразок сироватки 50 мкл, швидко перемішали.
4. Негайно розпочали реєстрацію приросту оптичної густини при 405 нм протягом 1–3 хв (з інтервалом 15–30 с).
5. Розрахунок активності виконали за середнім $\Delta E/\text{хв}$ із лінійної ділянки кривої.

Методика визначення АСТ

Метод базується на реакції, каталізованій АСТ, у результаті якої утворюється оксалоацетат. Далі оксалоацетат відновлюється малатдегідрогеназою (МДГ) до L-малату з одночасним окисненням NADH до NADH⁺. Швидкість зменшення концентрації NADH, що реєструється за зниженням оптичної густини при 340 нм, прямо пропорційна активності АСТ у досліджуваному зразку сироватки.

Хід аналізу

У термостатовану кювету (при 37°C) вносили 1000 мкл робочого реагенту.

2. Додавали 100 мкл сироватки крові (зразка).
3. Суміш швидко перемішували та поміщали в камеру біохімічного аналізатора.
4. Вимірювання оптичної густини (ОП) проводили при довжині хвилі 340 нм протягом 3 хвилин із інтервалом у 1 хвилину.
5. Розраховували середню зміну оптичної густини за хвилину Δ /

Методика визначення тимолової проби

Визначення тимолової проби проводили за методом Маклагана (метод преципітації) за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) при довжині хвилі 660 нм.

Принцип проби ґрунтується на явищі преципітації (осадження) білкових фракцій сироватки крові (головним чином gamma- та beta-глобулінів, а також ліпопротеїнів) у кислому середовищі під дією тимол-вероналового буфера. Ступінь помутніння прямо корелює з рівнем глобулінів і вимірюється фотометрично.

Хід аналізу

1. Підготували дві пробірки: "Дослід" та "Стандарт".
2. Пробірка "Дослід":
 - 6,0 мл тимол-вероналового буфера.

- 0,05 мл дослідної сироватки.
3. Пробірка "Стандарт":
- 6,0 мл тимол-вероналового буфера.
 - 0,05 мл стандартного розчину.
4. Вміст пробірок ретельно перемішували та інкубували протягом 30 хвилин у темному місці або при температурі 37°C.
5. Через 30 хвилин вимірювали оптичну густину (ОП) дослідної проби та стандарту проти дистильованої води або проти самого тимол-вероналового буфера на ФЕК при довжині хвилі 660 нм.

Статистична обробка результатів

Обробку експериментальних даних проводили на персональному комп'ютері з використанням табличного редактора Microsoft Excel 2010 for Windows. Для статистичної обробки отриманих результатів застосовували методи варіаційного аналізу із використанням критерію Стьюдента. У графіках дані представлено у формі середнього значення (M) з відповідною похибкою середнього (m). Відмінності між досліджуваними групами вважали статистично значущими за умови, що рівень імовірності становив $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серед численних ефектів ДЕФ заслуговує вивчення його негативного впливу на печінку – ключовий орган детоксикації та метаболізму, який першим реагує на надходження ксенобіотиків і зазнає найбільшого навантаження при їх знешкодженні [13]. Саме печінка бере на себе основну роль у метаболізмі ДЕФ, внаслідок чого піддається структурно-функціональним змінам, які можуть бути ранніми маркерами токсичності та предикторами подальших системних порушень [14, 15].

Оскільки печінка – головна мішень дії ксенобіотиків, то токсична дія ДЕФ на печінку може проявлятися в порушенні проникності клітинних мембран, активації процесів вільнорадикального окиснення біомолекул, дисбалансі антиоксидантної системи, порушенні білкового, вуглеводного та ліпідного обміну [16]. Вибір двох доз ДЕФ (2,5 мг/кг та 5 мг/кг) був обґрунтований попередніми токсикологічними дослідженнями, які вказують на відсутність летального ефекту при таких концентраціях, але наявність потенційного субтоксичного впливу. Це дозволило оцінити як порогові, так і виражені прояви токсичності речовини. Контрольні точки (14-та та 21-ша доба) обрані з метою вивчення як початкових реакцій організму на токсикант, так і розвитку відстрочених або кумулятивних змін у функціональному стані печінки.

Оцінка біохімічних показників функціонального стану печінки показала, що надходження ДЕФ в організм викликає дозозалежні зміни активності ключових ферментів гепатоцелюлярного ушкодження та холестазу.

Результати проведених досліджень показали, що на 14-ту добу експерименту у тварин, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг, активність АЛТ не відрізнялась від показників контрольної групи, що свідчить про відсутність суттєвого порушення цілісності гепатоцитів на ранньому етапі дії токсиканта. У групі тварин, які отримували ДЕФ у дозі 5 мг/кг, активність

АЛТ достовірно підвищилась у 2,5 раза порівняно з інтактними тваринами ($P \leq 0,05$) (рис.3.1).

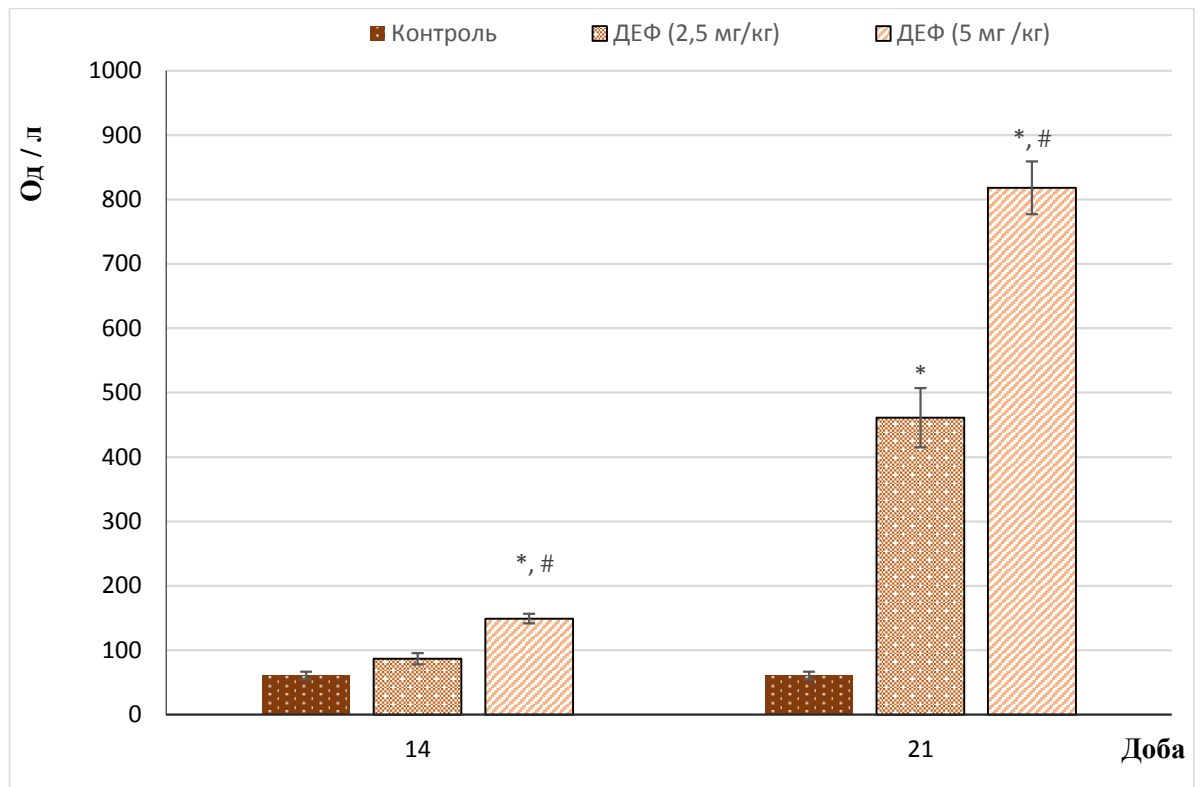


Рис.3.1. Аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення диетилфталату

Примітка (тут і надалі): К – контроль; ДЕФ (2,5 мг/кг) – тварини, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла; ДЕФ (5 мг/кг) – тварини, які отримували ДЕФ у дозі 5 мг/кг маси тіла;

** $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; # $P \leq 0,05$ порівняно зі значеннями щурів, яким диетилфталат вводили у дозі 2,5 мг/кг маси тіла.*

Виявлене нами підвищення свідчить про початкові прояви цитолізу гепатоцитів, оскільки АЛТ є більш специфічним маркером ушкодження печінки. Зростання активності ферменту може бути пов'язане з мембранними порушеннями гепатоцитів під дією токсиканта, що спричиняє вихід АЛТ із клітин у кров.

Щодо показників ензимної активності АСТу сироватці крові тварин, то виявлено, що щурі, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг активність цього

ферменту також не змінювалась порівняно з контролем (рис.3.2). Проте у групі щурів з дозою 5 мг/кг спостерігалось достовірне підвищення активності АСТ у 2,1 раза ($P \leq 0,05$) (рис.3.2). АСТ менш специфічний для печінки, ніж АЛТ, оскільки він також присутній у серці, скелетних м'язах та нирках. Тому підвищення АСТ може свідчити не лише про початковий цитоліз гепатоцитів, але й про можливий системний вплив токсиканта на інші тканини.

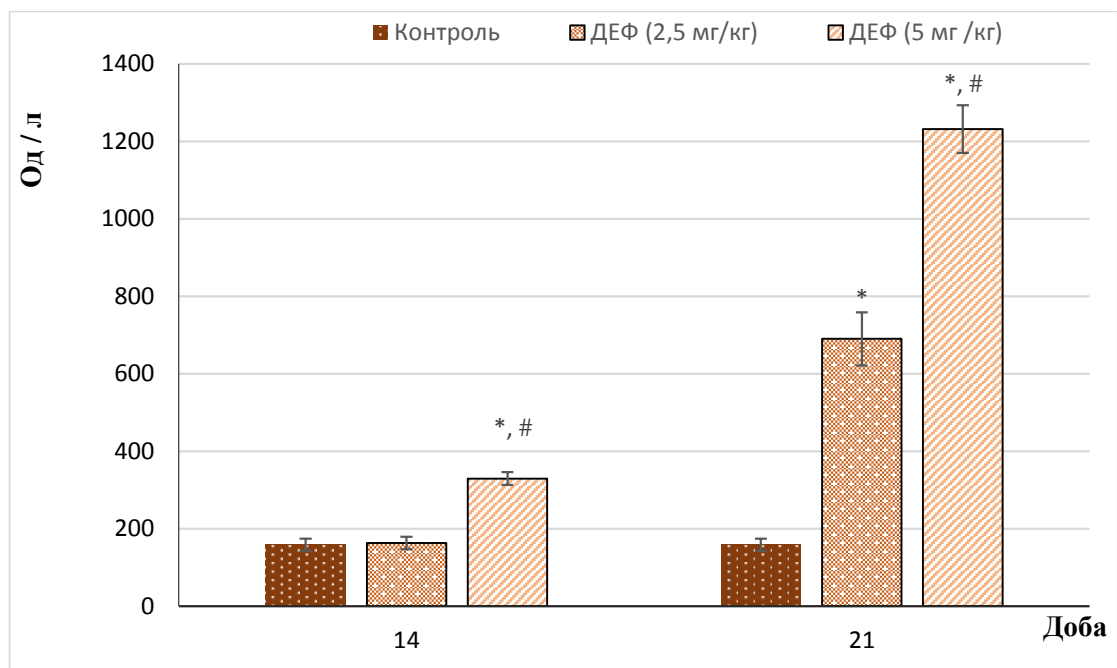


Рис.3.2. Аспаратамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення диетилфталату

На 21-шу добу дослідження у тварин обох дослідних груп спостерігалися більш виражені порушення. Так, у групі тварин, яким вводили нижчі дози ДЕФ активність АЛТ зростала у 7,6 рази (рис.3.1), а АСТ – у 2,1 рази (рис.3.2) порівняно з контролем ($P \leq 0,05$), що вказує на наростання токсичного ураження печінки при тривалому надходженні ДЕФ навіть у нижчій дозі. У групі щурів, яким вводили ДЕФ у дозі 5 мг/кг маси тварин ці показники були ще вищими. Так, активність АЛТ зростала у 13,5 рази (рис.3.1), а АСТ – у 7,8 рази відносно контрольної групи ($P \leq 0,05$) (рис.3.2).

Така динаміка підтверджує наявність дозозалежного гепатоцелюлярного ушкодження, ймовірно, внаслідок оксидативного стресу,

порушення енергетичного метаболізму та пошкодження мітохондріальної мембрани, що характерне для дії фталатів [24].

На основі отриманих результатів видно, що тривале введення ДЕФ призводить до вираженого підвищення активності трансаміназ, що свідчить про наростання токсичного ураження печінки та пошкодження гепатоцитів у щурів. Однак, оскільки АЛТ та АСТ відображають, головним чином, цитоліз гепатоцитів, для оцінки холестатичного компонента ураження печінки доцільно проаналізувати ензимну активність ГГТ, яка є чутливим маркером пошкодження жовчних протоків та мембран клітин печінки і дозволяє оцінити можливі порушення жовчоутворюючої та екскреторної функції печінки під впливом токсиканта.

Результати дослідження ензимної активності ГГТ, яка відображає стан жовчовивідної системи та індикатора для процесів холестазу, показали, що на 14-ту добу досліджуваний показник у групи тварин, яким вводили ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла не відрізнявся від показників контролю (рис.3.3).

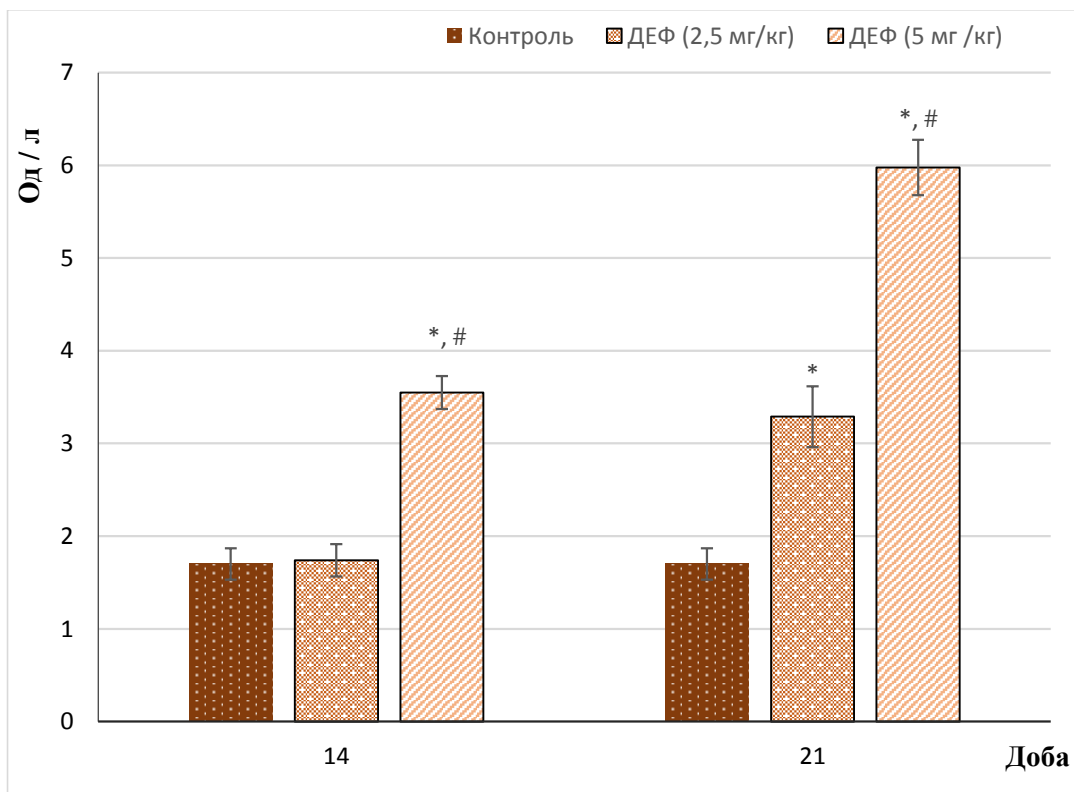


Рис.3.3. Ензимна активність γ -глутамілтрансферази в сироватці крові щурів за умов введення диетилфталату

Водночас, у групі щурів, яким вводили ДЕФ у дозі 5 мг/кг відмічено помірне, але достовірне підвищення активності ГГТ у 2,1 раза порівняно з контролем ($P \leq 0,05$) (рис.3.3). Це свідчить про початок формування жовчовивідної дисфункції на тлі більшої дози токсиканта.

На 21-шу добу спостерігалось чітке зростання активності ГГТ у всіх дослідних групах. Так, у тварин, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг, активність ферменту зростала у 1,9 раза, а у тварин, які отримували 5 мг/кг – у 3,5 раза відносно контрольних значень ($P \leq 0,05$) (рис.3.3). Зростання ГГТ може бути пов'язане як із порушенням функції жовчовивідних шляхів, так і з активацією ферментативної антиоксидантної системи у відповідь на окиснювальний стрес, індукований ДЕФ [25].

Отримані результати щодо активності трансаміназ та ГГТ вказують на розвиток дозозалежного гепатоцелюлярного ушкодження та формування ознак жовчовивідної дисфункції під впливом ДЕФ. З метою комплексної оцінки функціонального стану печінки було проаналізовано також зміни активності ЛФ, яка є важливим маркером холестазу та відображає порушення цілісності жовчовивідних шляхів.

Аналіз результатів досліджень показав, що на 14-ту добу експерименту у щурів, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла, активність ЛФ достовірно не відрізнялася від показників контрольної групи, що свідчить про збереження функціональної спроможності жовчовивідної системи на ранньому етапі за умов нижчого рівня токсичного навантаження. Водночас, у групі тварин, яким вводили ДЕФ у дозі 5 мг/кг, відмічалось статистично значуще підвищення активності ЛФ у 1,6 рази порівняно з контролем ($P \leq 0,05$), що може свідчити про початкові прояви внутрішньопечінкового холестазу та компенсаторне посилення синтезу ферменту.

Трижизневе введення нижчої дози ДЕФ сприяло зростанню активності ЛФ у 1,6 рази відносно контрольних значень ($P \leq 0,05$), що підтверджує поступове поглиблення порушень функції гепатобіліарної системи при тривалому впливі навіть низьких доз токсиканта (рис.3.4).

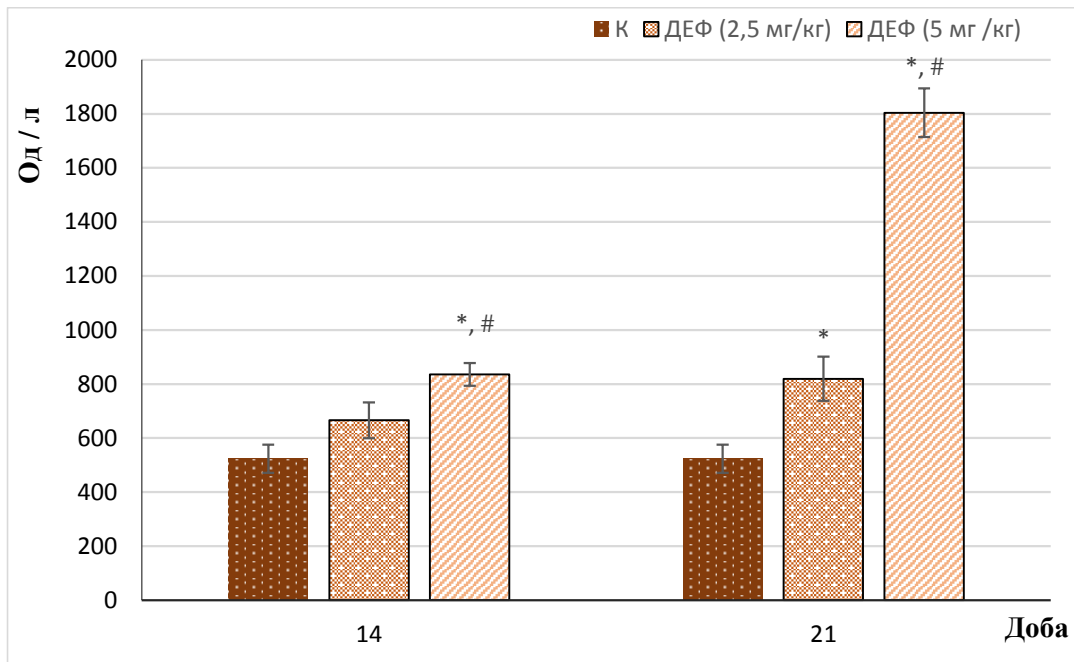


Рис.3.4. Ензимна активність лужної фосфатази в сироватці крові щурів за умов введення диетилфталату

У тварин, які отримували вищу дозу ДЕФ, спостерігалось більш виражене зростання активності ЛФ – у 3,4 рази порівняно з інтактними тваринами (рис.3.4). Така динаміка є характерною для розвитку прогресуючого холестазу на тлі оксидативного стресу, індукованого впливом фталатів.

Отримані результати свідчать, що підвищена доза ДЕФ спричиняє суттєві порушення функціонального стану печінки. Зростання активності ЛФ відносно інтактного контролю може вказувати на значну блокаду жовчовидільних шляхів або пошкодження клітин, відповідальних за транспорт жовчі. Такий виражений холестатичний ефект узгоджується з відомою здатністю фталатів індукувати оксидативний стрес, який, у свою чергу, поглиблює структурні та функціональні порушення у гепатобіліарній системі. Це означає, що вищі дози ДЕФ спричиняють прогресуюче погіршення жовчоутворення та жовчовиділення, що може бути маркером токсичного ураження печінки.

Для більш детальної оцінки порушень гепатобіліарної системи було досліджено рівні загального та прямого білірубину. Встановлено, що після

двотижневого введення ксенобіютика достовірні зміни концентрації загального білірубину у тварин виявлені за умов введення ДЕФ у дозі 5 мг/кг з підвищенням його вмісту у середньому на 50 % відносно контролю ($P \leq 0,05$) (рис.3.5).

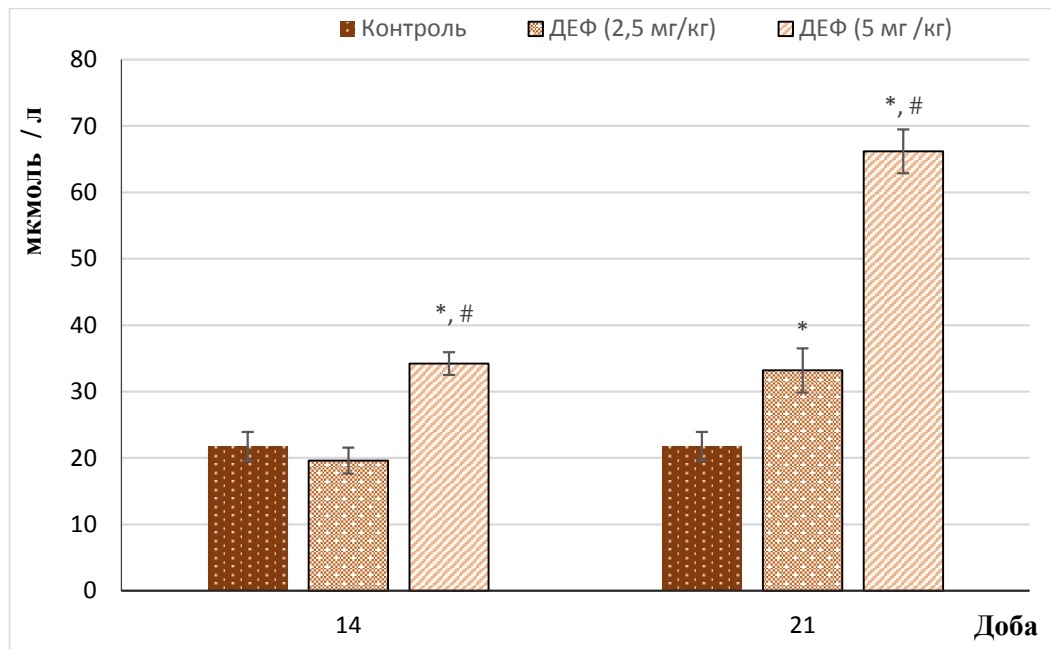


Рис.3.5. Вміст загального білірубину в сироватці крові щурів за умов введення диетилфталату

Щодо визначення прямого білірубину, то у цій групі також виявлена тенденція до підвищення у сироватці крові – у 1,6 рази порівняно з інтактними тваринами (рис.3.6), що може вказувати на початок порушення процесів кон'югації та вивільнення білірубину в кров'яне русло.

На 21-шу добу дослідження спостерігалися більш виражені зміни. Так, у групі щурів, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг, загальний білірубін підвищувався у 1,6 раза (рис.3.5), а прямий – у 1,4 рази порівняно з контролем ($P \leq 0,05$) (рис.3.6). У групі тварин, яким вводили вищу дозу токсиканта, зростання було значнішим: рівень загального білірубину перевищував контрольні значення у 3 рази (рис.3.5), а прямого – у 2,4 рази порівняно з контролем ($P \leq 0,05$) (рис.3.6).

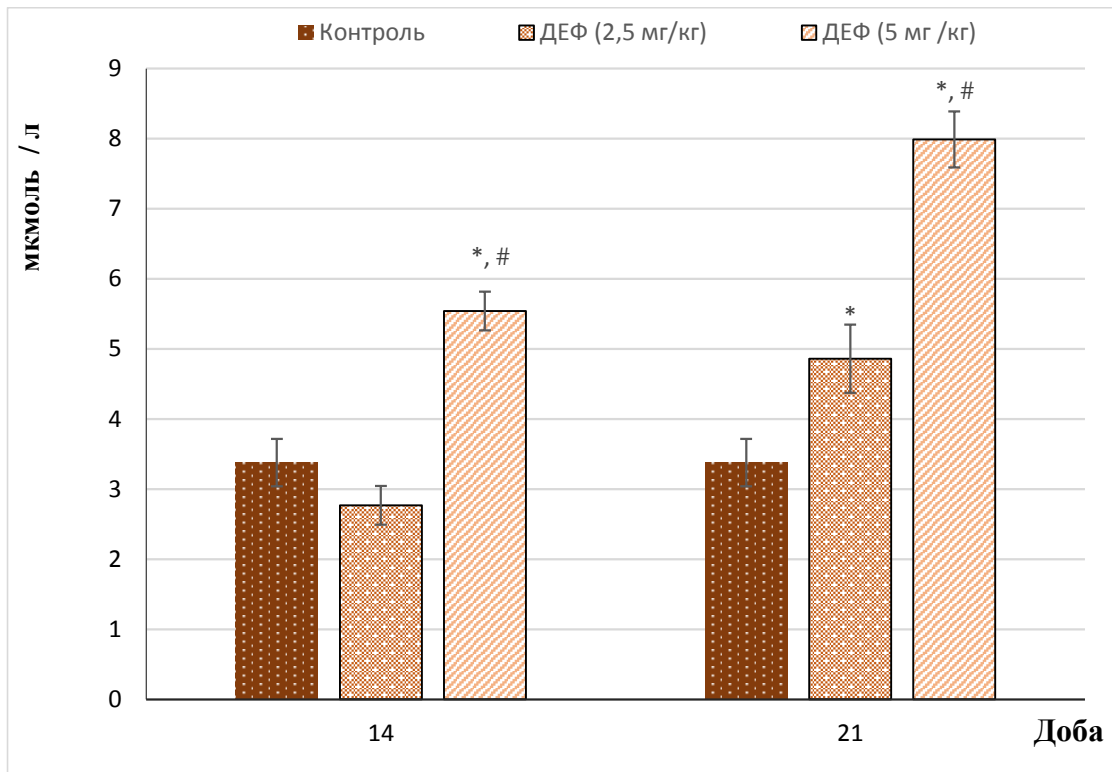


Рис.3.6. Вміст прямого білірубину в сироватці крові щурів за умов введення діетилфталату

Дані дослідження свідчать, що під впливом ДЕФ у тварин поступово розвиваються порушення функцій гепатобіліарної системи. Уже на ранніх етапах спостерігається підвищення рівня загального білірубину, що вказує на збій у процесах його утворення та виведення. Одночасне зростання прямого білірубину свідчить про погіршення кон'югації та утруднення екскреції жовчних пігментів.

За більш тривалого впливу токсиканта зміни стають виразнішими та набувають чітко вираженого дозозалежного характеру: чим вища доза, тим сильніше порушуються механізми, відповідальні за переробку й транспорт білірубину. Це свідчить про поглиблення холестатичних явищ та наростання ушкодження печінкових клітин, що може бути наслідком токсичного та оксидативного впливу фталату.

Отже, тривале надходження ДЕФ призводить до прогресуючого дисбалансу в роботі системи жовчоутворення та жовчовиділення, що є характерною ознакою розвитку гепатотоксичності.

Зважаючи на отримані результати щодо змін рівнів загального та прямого білірубіну, що вказують на розвиток холестатичних порушень і прогресуюче ушкодження гепатоцитів, для більш поглибленої оцінки синтетичної функції печінки було проведено аналіз тимолової проби. Цей тест дозволяє визначити ступінь диспротеїнемії та оцінити порушення колоїдно-осмотичних властивостей плазми крові, що виникають при ушкодженні паренхіми печінки.

Результати дослідження показали, що на 14-ту добу експерименту в тварин, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг, показники тимолової проби достовірно не відрізнялися від контрольних значень, що свідчить про збереження білоксинтетичної функції печінки на ранньому етапі токсичного впливу (рис.3.7). Водночас у групі тварин, яким вводили ДЕФ у дозі 5 мг/кг, зафіксовано тенденцію до підвищення показників тимолової проби – у середньому на 43 % відносно контролю (рис.3.7), що може відобразити початкові ознаки диспротеїнемії та зниження синтетичної активності печінки.

На 21-шу добу дослідження спостерігалися більш виражені зміни. У групі тварин, які отримували нижчу дозу ДЕФ, показники тимолової проби зростали у 1,7 рази порівняно з контролем ($P \leq 0,05$), що свідчить про початок виражених порушень синтетичної функції гепатоцитів. У щурів, які отримували ДЕФ у дозі 5 мг/кг, значення тимолової проби перевищували контрольні показники у 2,6 рази ($P \leq 0,05$), що підтверджує глибокі порушення білкового метаболізму та істотне зниження функціональної активності печінки (рис.3.7).

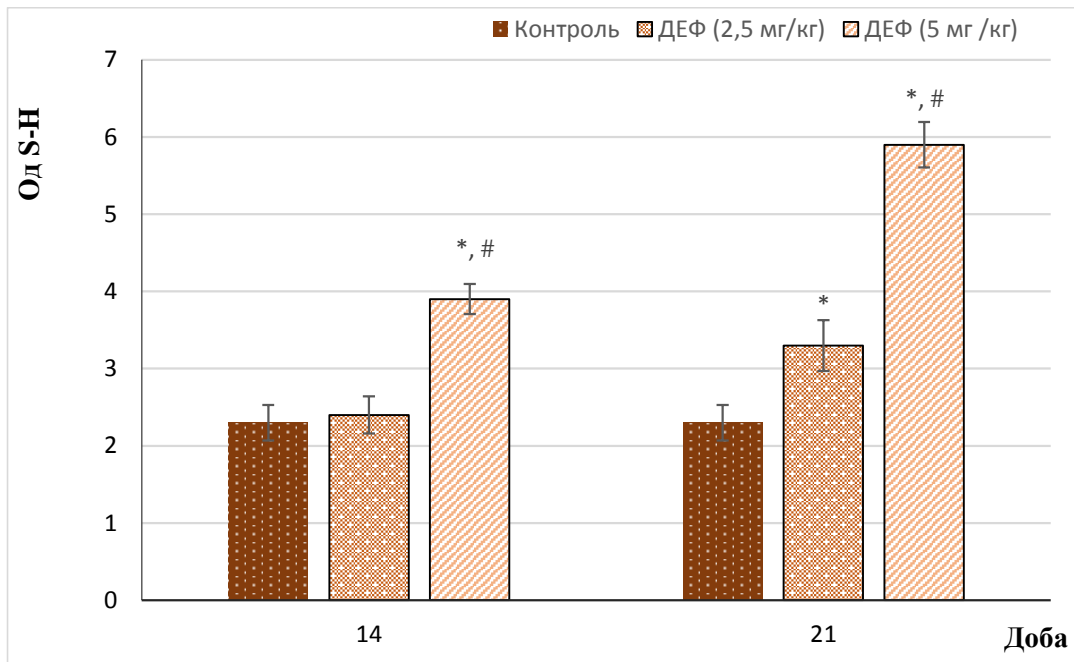


Рис. 3.7. Показник тимолової проби у крові щурів за умов введення диетилфталату

Отже, зміни показників тимолової проби узгоджуються з динамікою активності печінкових ферментів та рівнями білірубину, що свідчить про комплексне ушкодження гепатоцитів і поступовий розвиток дисфункції гепатобіліарної системи при дозозалежному впливі ДЕФ.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що на 14-ту добу введення ДЕФ в організм лише вища доза (5 мг/кг) викликала достовірне підвищення активності АЛТ і АСТ в сироватці крові, тоді як доза 2,5 мг/кг не спричиняла суттєвих змін. На 21-шу добу в обох дослідних групах спостерігалось різке посилення цитолізу, що проявлялося підвищенням активності трансфераз у крові, особливо за вищої дози токсиканта.

2. Двотижневе введення ДЕФ показало, що у тварин, які отримували 2,5 мг/кг, активність ГГТ в крові залишалася на рівні контролю, тоді як доза 5 мг/кг викликала достовірне підвищення активності ферменту, що свідчить про ранні ознаки порушення жовчовивідної функції. Подальше надходження ксенобіотика в організм призводило до суттєвого зростання ГГТ в обох групах, причому більш виражено за вищої дози.

3. Аналіз показників ЛФ та білірубіну продемонстрував, що навіть відносно короткочасний вплив ДЕФ спричиняє початкові холестатичні порушення, які з часом посилюються. Після тритижневого введення ДЕФ в обох групах відмічалось суттєве підвищення активності ЛФ та рівнів загального і прямого білірубіну, причому більш виражене за вищої дози.

4. Підвищення показника тимолової проби показало, що за дії ДЕФ може порушуватися білоксинтетична функція печінки, що особливо виражено за умов тритижневого введення ДЕФ за дози 5 мг/кг.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Возіанова Ж.І. Інфекційні хвороби: підручник. К.: Медицина, 2018. Т. 1. 752 с.
2. Бабак О.Я., Серета В.В. Клінічна біохімія. Харків: ХНМУ, 2017. 356 с.
3. Thapa B.R., Walia A. Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*. 2007. 74(7). 663–671.
4. Giannini E.G., Testa R., Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005. 172(3). 367–379.
5. Whitfield J.B. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2001. 38(4). 263–355.
6. Pagana K.D., Pagana T.J. Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference. 14th ed. Elsevier, 2022.
7. Sherlock S., Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. 12th ed. Blackwell Publishing, 2011.
8. Люлька І.С., Прокопов Ю.О. Токсикологічна оцінка фталатів: вплив на функцію печінки в експерименті. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. 4(158). 130–135.
9. Wang Y., Zhu H., Kannan K. A review of biomonitoring of phthalate exposures. *Toxics*. 2019. 7(2). 1–21.
10. Ozer J., Ratner M., Shaw M., Bailey W., Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008. 245(3). 194–205.
11. Kim H.C., Nam C.M., Jee S.H., Han K.H., Oh D.K., Suh I. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases. *Hepatology*. 2004. 39(6). 1443–1451.
12. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G. Serum transaminase activities in liver disease. *Lancet*. 1957. 1(6975). 685–687.
13. Панасюк М.І. та ін. Печінка та токсичні ураження: клініко-біохімічні аспекти. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2021. 16(1). 32–39.

14. Hauser R., Calafat A.M. Phthalates and human health. *Occupational and Environmental Medicine*. 2005. 62(11). 806–818.
15. Rowdhwal S.S.S., Chen J. Toxic effects of diethyl phthalate: An overview. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. 25(8). 8075–8086.
16. Kim S., Cho Y.H., Park J. et al. Diethyl phthalate exposure and liver function in children and adolescents. *Environmental Research*. 2019. 171. 1–8.
17. Панасюк М.І., Гайдучик Н.М., Слюсаренко І.І. Вільнорадикальне окиснення як механізм токсичної дії фталатів. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2021. 16(1). 40–45.
18. Aly H.A.A., Domènech O., Abdel-Naim A.B. Protective effects of vitamin E against diethyl phthalate-induced apoptosis in rat liver. *Toxicology Letters*. 2016. 258. 59–68.
19. Heudorf U., Mersch-Sundermann V., Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2007. 210(5). 623–634.
20. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Updated Tables, March 2018.
21. Frederiksen H., Skakkebaek N.E., Andersson A.M. Metabolism of phthalates in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007. 51(7). 899–911.
22. Mankidy R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P. Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*. 2013. 217(1). 50–58.
23. Mondal S., Mukherjee S. Long-term dietary administration of diethyl phthalate triggers loss of insulin sensitivity in two key insulin target tissues of mice. *Human & Experimental Toxicology*. 2020. 39(7). 984–993.
24. Zhao Y., Chang Y.H., Ren H.R., Lou M., Jiang F.W., Wang J.X. et al. Phthalates induce neurotoxicity by disrupting the Mfn2-PERK axis-mediated endoplasmic reticulum-mitochondria interaction. *J Agric Food Chem*. 2024. 72(13). 7411–7422.

25. Ketsa O.V., Husliakova A.P., Marchenko M.M. Free radical processes in the liver mitochondria of rats exposed to diethyl phthalate. *Ukr Biochem J.* 2024. 96(1). 73–79.

ДОДАТКИ

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

10. По закінченні роботи слід привести в порядок своє робоче місце: помити посуд, протерти поверхню робочого лабораторного столу, закрити водопровідні крани, вимкнути електричні прилади.

Правила техніки безпеки при роботі з центрифугою

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

Правила техніки безпеки при роботі з фотоелектрокалориметром і спектрофотометром

1. Прилади мають бути заземлені.
2. Під час профілактичних робіт прилади повинні бути відключені від мережі.
3. Забороняється експлуатація спектрофотометра при знятих кожухах приладу і освітлювача і знятої кришки стабілізатора.
4. Забороняється відкривати прилад, працювати на несправному приладі, залишати прилад включеним без нагляду.
5. Робота на фотоелектроколориметрі повинна проводитися в чистому приміщенні, вільному від пилу, парів кислот і лугів.
6. Поблизу колориметра не повинні розташовуватися громіздкі вироби, що створюють незручності у роботі оператора.

7. Регулювальні роботи, пов'язані з проникненням за постійного огороження до струмоведучих частин колориметра, зміна ламп, заміна несправних деталей, повинні проводитися після від'єднання колориметра від електромережі.

Заходи надання першої допомоги

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

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

3. При термічних опіках обпечене місце присипають двовуглекислим натрієм (питна сода), крохмалем або тальком, або прикладають примочки з 96% етилового спирту, 2% свіжо приготованим розчином питної соди або 2% розчином перманганату калію. Потім змащують уражене місце маззю від опіків.

При важких опіках потерпілого слід негайно відправити до медпункту.

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