

**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 печінки у сироватці
крові щурів за умов введення диетилфталату**

**Дипломна робота
освітнього рівня «Бакалавр»**

Виконала: студентка IV курсу, групи 400
напряму підготовки 091.6 – «Біологія»

Банарь І. В.

Керівник: к.б.н., доцент Кеца О.В.

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від „__” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена вивченню біохімічних маркерів функціонального стану печінки в сироватці крові щурів – ензимних активностей аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ) за умов введення в організм різних доз диетилфталату (ДЕФ).

Показано, що за умов тритижневого введення різних доз ДЕФ – 2,5 мг/кг та 5,4 мг/кг маси тварин спостерігається підвищення рівня ензимних активностей АЛТ, АСТ та ГГТ в сироватці крові щурів, яке більшою мірою виражене за дії високих доз ДЕФ (5,4 мг/кг маси тварин).

Встановлено, що по мірі збільшення дози та терміну введення в організм ДЕФ виявлено зниження співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітіса), що може вказувати на порушення функціонального стану печінки.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Амінотрансферази як маркери функціонального стану печінки	7
1.1.1. Структура та функції аланінамінотрансфераз	7
1.1.2. Біологічна роль аспартатамінотрансферази у організмі	9
1.2. Участь γ-глутамілтрансферази у метаболічних процесах в організмі	12
1.3. Механізми гепатотоксичності за дії ксенобіотиків на організм	15
1.4. Токсичні механізми дії фталатів	16
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	21
2.1. Об'єкт та методи досліджень	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
ВИСНОВКИ	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	35
ДОДАТКИ	40

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АСТ – аспартатамінотрансфераза

ГГТ – γ -глутамілтрансфераза

ДЕФ – диетифталат

МЕФ – моноетифталат

ВСТУП

Диетилфталат (ДЕФ) відноситься до фталатів з короткими алкільними ланцюгами, які часто використовуються для виготовлення різних продуктів. Людина часто широко піддається впливу ДЕФ. Як пластифікатор цей ксенобіотик додають до пластикових полімерів, щоб зберегти гнучкість – пластикові плівки, гума, зубні щітки, іграшки тощо. Окрім пластику, ДЕФ присутній у засобах особистої гігієни (косметика, парфуми, спреї для волосся, лак для нігтів, мило, миючі засоби і лосьйони), промислових матеріалах (барвники, упаковки, герметики), медичних продуктах (кишковорозчинні покриття на таблетках, матеріали для відбитків зубів тощо) [1].

Фталати, включаючи ДЕФ, не зв'язуються ковалентно з продуктами, і тому легко вивільняються в навколишнє середовище, де вони можуть поглинатися перорально, через органи дихання або через шкіру. Після перорального впливу ДЕФ переважно локалізується в нирках і печінці з наступним відкладенням у жировій тканині [2]. В організмі ДЕФ метаболізується в активний метаболіт моноетилфталат (МЕФ), який зрештою виводиться із сечею та слугує біомаркером впливу ДЕФ [3]. Рівень МЕФ, як правило, залишається високим порівняно з іншими метаболітами фталату в сечі в різних вікових групах. Це вказує на те, що ДЕФ є одним із найвищих рівнів впливу фталатів на організм людини, жінок дітородного віку, причому основним джерелом є засоби особистої гігієни [4].

Негативний вплив фталатів на організм людини, зокрема печінку, значною мірою залежить від дози застосованого ксенобіотика [5]. У нашому дослідженні токсичність ДЕФ на біохімічному рівні вивчалася шляхом аналізу функції деяких енізимів функціонального стану печінки. Енізими аспартатамінотрансфераза (АСТ), аланінамінотрансфераза (АЛТ) і γ -глутамілтрансфераза (ГГТ) зустрічаються у всіх клітинах організму, але в основному в клітинах печінки. Вони функціонують для моніторингу

захворювань або пошкоджень печінки, тому їх підвищення в крові може слугувати корисним показником для моніторингу ураження печінки.

Враховуючи вище вказане *метою роботи* було визначити біохімічні показники функціонального стану печінки у сироватці крові щурів за умов введення в організм різних доз диетифталату.

У зв'язку з цим поставлені наступні завдання:

1. Визначити аланінамінотрансферазну та аспаратамінотрансферазну активності в сироватці крові щурів за умов введення різних доз диетифталату.
2. Оцінити показник відношення рівня ензимної активності АСТ до рівня ензимної активності АЛТ – індекс де Рітіса.
3. Дослідити зміни ензимної активності ГГТ в сироватці крові щурів за умов введення різних доз диетифталату.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Амінотрансферази як маркери функціонального стану печінки

1.1.1. Структура та функції аланінамінотрансфераз

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) – це ензим, який виробляється в основному в клітинах печінки та нирок, та в менших кількостях міститься в м'язах і серці. Цей ензим в основному локалізується в цитозолі гепатоцита, проте при пошкодженні печінки рівень АЛТ в крові підвищується [6].

До складу молекули АЛТ входить біля 496 амінокислотних залишків (залежно від ізоформи). Період напіврозпаду ензиму в клітинах організму становить приблизно 47 ± 10 годин. Молекула ензиму АЛТ кодується геном, що міститься у довгому плечі восьмої хромосоми геному людини [7].

АЛТ каталізує перенесення аміногрупи від L-аланіну до α -кетоглутарату, а продуктами реакції є L-глутамат і піруват (рис.1.1) [8].

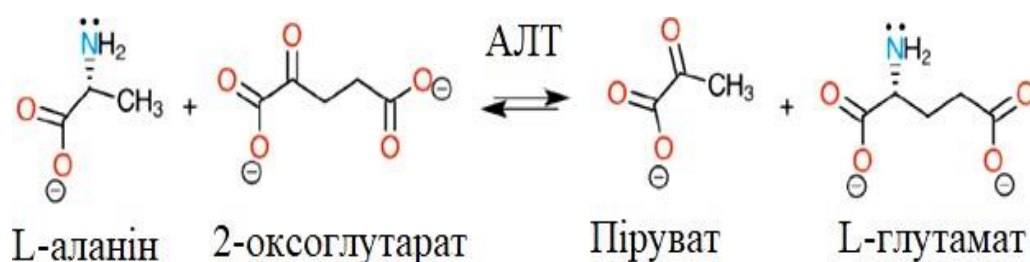


Рис.1.1. Трансаміназна реакція, яка каталізується аланінамінотрансферазою

На рис.1.1 загальної реакції, яка каталізується АЛТ, неподільна електронна пара показана поряд із реакційноздатними амінними групами L-аланіну та L-глутамату [8].

Реакція, що каталізується АЛТ проходить у дві стадії. У проходженні цього процесу необхідний кофермент піридоксальфосфат [9]. У першій напівреакції (1) L-аланін перетворюється на піруват із супутнім перетворенням кофактора, зв'язаного з основою Шиффа, Lys-піридоксаль-5-фосфат (П5Ф) (вітамін B₆), у вільний Lys і піридоксамін-5-фосфат (ПМФ) (каталітичним залишком лізину є Lys240). У другій і останній напівреакції

(2) молекула 2-оксоглутарату перетворюється на L-глутамат, а ПМФ повертається назад у кофактор стану спокою ферменту (Lys240-П5Ф) (рис.1.2) [9].

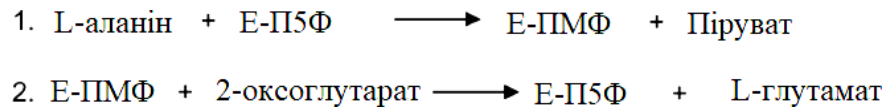


Рис.1.2. Етапи каталітичної реакції за дії аланінамінотрансферази

Примітка: E – ензим; П5Ф – піридоксаль-5-фосфат; піридоксамін-5-фосфат.

У печінці ця реакція є критичним процесом циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [10].

Аланінамінотрансферазна активність у клітинах печінки у три тисячі разів може перевищувати активність АЛТ у крові в нормі. За умов пошкодження печінки при різних патологічних станах АЛТ виходить з пошкоджених клітин печінки кров'яне русло, що призводить до значного підвищення ензимної активності у сироватці крові. Як вказано вище АЛТ також локалізується в м'язовій, жировій тканині, тонкому кишечнику, головному мозку та простаті [11]. Проте, слід зауважити, що концентрація та активність АЛТ у цих органах і тканинах організму значно нижча порівняно з печінкою [12].

Незначне підвищення АЛТ в сироватці крові також може бути пов'язано з різними фізіологічними факторами. Так, екстремальне фізичне навантаження може спричинити короточасне, зворотне підвищення АЛТ (у 2-2,5 рази). Підвищення АЛТ після фізичного навантаження може бути пов'язано з травмами м'язів [8, 13].

Біологічна роль АЛТ також полягає в тому, що цей ензим перетворює амінокислоту аланін у піруват, який опосередковано вступає в цикл Кребса, з генерацією клітинної енергії. Проте, тест на визначення активності АЛТ в сироватці крові використовується для виявлення пошкодження печінки [14].

АЛТ допомагає виробляти піруват – необхідний у циклі трикарбонових кислот (ЦТК). Реакція трансамінування є першою стадією метаболізму амінокислот, яка завершується утворенням АТФ. За допомогою коферменту П5Ф (вітаміну В₆) АЛТ прискорюється перетворення L-аланіну та α -кетоглутарату в L-глутамат і піруват в рамках ЦТК [14]. Окрім того, субстрати та продукти реакції, яка каталізується АЛТ мають й інші біологічні функції в клітинах. Так, L-аланін – незамінна амінокислота, що бере участь у метаболізмі цукрів та органічних кислот, імунітеті та генерації енергії; α -кетоглутарат – кетонна похідна глутарової кислоти, яка визначає швидкість ЦТК, синтез протеїнів та деградацію білків в м'язах; L-глутамат – незамінна амінокислота та похідне глутаміну, яка слугує джерелом енергії, а також діє як важливий нейромедіатор – його роль в ефекті Варбурга забезпечує джерелом енергії для ракових клітин, особливо в мозку; піруват – результат метаболізму глюкози, коли одна молекула глюкози перетворюється на дві молекули пірувату, вони переносять молекули вуглецю в мітохондрії для подальшої обробки [14, 15]. За відсутності кисню піруват піддається ферментації з утворенням лактату – менш ефективного джерела клітинної енергії. Результати діапазону АЛТ використовують виключно для вивчення функції печінки, а не для вимірювання ефективності циклу Кребса [10].

Отже, постійно високі результати рівня АЛТ завжди вказують на проблеми з печінкою.

1.1.2. Біологічна роль аспаратамінотрансферази у організмі

У той час як АЛТ в основному виробляється в печінці АСТ виробляється у великих кількостях і у серцевому м'язі. АСТ також виробляється в печінці, скелетних м'язах, нирках, підшлунковій залозі, селезінці, легенях і еритроцитах [16].

Коли тестуються рівні АЛТ і АСТ, результати можуть вказувати на різні патології. Якщо обидва результати тесту підвищені, зазвичай

діагностують патологію печінки. У випадку при високих рівнях лише АСТ та нормальних рівнях АЛТ в сироватці крові найвірогіднішою причиною гіперферментемії АСТ є інфаркт міокарда, оскільки пошкоджені клітини серцевого м'яза вивільняють АСТ в кровотік [17].

Більшість підвищених рівнів АЛТ вказують на порушення роботи печінки. Незначне підвищення результатів обох тестів вказує або на пошкодження скелетних м'язів, або на ранні стадії патології печінки. Тест на АЛТ зазвичай проводиться разом з тестом на АСТ. При пошкодженні гепатоцитів підвищується проникнення мембран, у результаті чого ензим потрапляє у кровотік [18].

АСТ є ензимом, який каталізує перенесення аміногрупи з L-аспартату на α -кетоглутарат. АСТ також каталізує взаємоперетворення аспартату та α -кетоглутарату в оксалоацетат і глутамат (рис.1.3) [19].



Рис.1.3. Трансаміазна реакція, яка каталізується аспартатамінотрансферазою

Як прототип трансаміназ, кофактором АСТ є П5Ф для перенесення аміногрупи з аспартату на відповідну кетокислоту. Існує два ізоензими АСТ – цитозольний ензим (GOT1/cAST) походить в основному з еритроцитів і серця. Мітохондріальний ензим (GOT2/mAST) присутній переважно в мітохондріях печінки [20].

І АЛТ, і АСТ каталізують перенесення аміногрупи від амінокислоти до α -кетоглутарату [18]. До амінокислот належать L-аланін і L-аспартат, продукти реакції – L-глутамат і/або піруват, або оксалоацетат відповідно (рис.1.4а) [21]. Ці реакції можуть бути зворотніми, а субстрати і продукти цих реакцій важливі для багатьох клітинних процесів, окрім очевидної ролі у

метаболізмі амінокислот. Тому, вважається, що АЛТ і АСТ беруть участь у різноманітних фізіологічних процесах та енергетичному гомеостазі. Одна з важливих ролей АЛТ у циклі аланін-глюкоза (рис.1.4б) [21]. У м'язах АЛТ перетворює піруват в амінокислоту аланін за допомогою аміногрупи глутамату. Аланін потрапляє в кровообіг і поглинається печінкою, де АЛТ в гепатоцитах може перетворювати його назад на піруват, який використовуватиметься в утворенні глюкози [17].

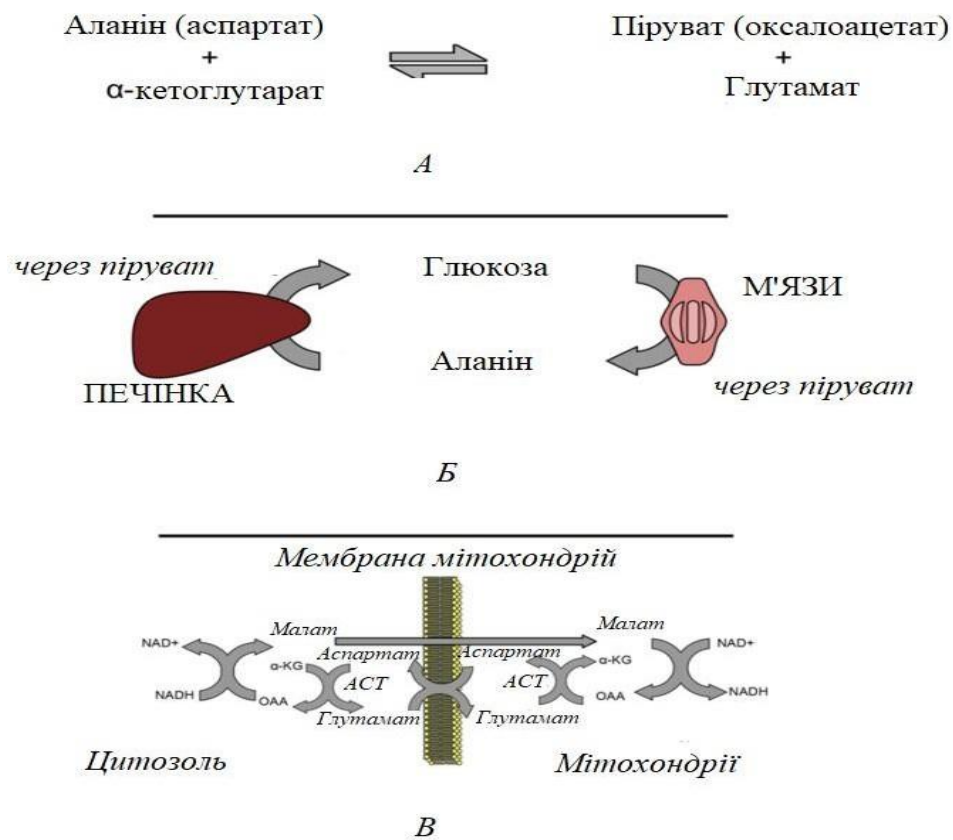


Рис.1.4. Функції аланінаміно- й аспартамінотрансфераз

Ця система особливо важлива для регуляції рівня глюкози під час стресових станів, таких як голодування або інтенсивні фізичні вправи. Також було запропоновано, що мітохондріальна ізоформа АЛТ є особливо важливий у глюконеогенезі в деяких випадках [17].

Важлива фізіологічна функція АСТ полягає у підтримці співвідношення $NAD^+/NADH$ в клітинах. АСТ – це критичний партнер у

малат-аспартатному човнику, який окислює NADH у цитозолі та знижує NAD⁺ в мітохондріальному матриксі для полегшення гліколізу та транспорту електронів, відповідно (рис.1.4в) [21].

Досліджуючи кров при дії різних ксенобіотиків з метою визначення ураження печінки необхідно визначати рівні АЛТ і АСТ, що дозволить провести моніторинг стану печінки. Нормальне співвідношення АСТ:АЛТ повинно бути менше одиниці [19]. АЛТ визначається як частина печінкової панелі при підозрі на порушення функції печінки. Панель печінки складається з наступних аналізів крові: АЛТ, АСТ, γ -глутамілтрансфераза (ГГТ), альбумін (білок, що виробляється печінкою), лужна фосфатаза (ЛФ) – фермент жовчних проток, кон'югований білірубін, загальний білірубін, загальний білок.

Отже, АЛТ і АСТ можна вважати надійними біомаркерами, які показують пошкодження клітин печінки.

1.2. Участь γ -глутамілтрансферази у метаболічних процесах в організмі

γ -Глутамілтрансфераза (ГГТ) – еволюційно консервативний глікопротеїн клітинної поверхні, який з'єднується з клітинною мембраною через N-кінець. Каталітична активність цього ензиму знаходиться в межах домену позаклітинного білка [22]. У людини ГГТ синтезується як ферментативно неактивний пропептид, що складається із 569 залишків амінокислот [23], який піддається активації шляхом ауторозщеплення на дві субодиниці. N-глікозилювання має важливе значення для правильного згортання, ауторозщеплення та активації ГГТ людини [22]. ГГТ – найпоширеніший ензим на мембранах клітин із секреторними або абсорбційними властивостями, які вистилають залози та протоки по всьому тілу, наприклад, нирки та жовчовивідну систему, причому найвищий рівень активності ГГТ виявляється в нирках [24]. Ця типова локалізація ГГТ

дозволяє припустити, що ензим бере участь у транспортуванні амінокислот через послідовність реакцій, які називають «гамма-глутаміловим циклом». Однак ГГТ може бути важливим для доступності клітинам амінокислоти цистеїну. Ензим також експресується на базолатеральних поверхнях ниркових епітеліальних клітин [22].

ГГТ видаляє γ -глутамільну групу з широкого спектру позаклітинних субстратів, включаючи білки, шляхом розщеплення γ -карбокських зв'язків глутамату в цих сполуках. Частина γ -глутамілу може бути передана іншим акцепторам (воді або амінокислотам), що призводить до вивільнення глутамату або утворення нових сполук γ -глутамілу. Основним фізіологічним субстратом ГГТ є відновлений глутатіон [γ -глутаміл-цистеїніл-гліцин (GSH)]. Ензим не атакує альфа-карбокський зв'язок глутамату в пептидах або протеїнах [25].

Найважливішою фізіологічною функцією ГГТ є участь ензиму в гомеостазі цистеїну і GSH. Ця функція підтверджується результатами про те, що дефіцит ГГТ, або клінічний, або експериментальний, пов'язаний з глутатіонурією через відсутність активності ГГТ на апікальній поверхні клітин у проксимальних каналцях нирок. При цьому спостерігається знижений вміст цистеїну в плазмі та клітинах [26].

ГГТ метаболізує глутатіон у присутності амінокислоти з утворенням γ -глутаміл амінокислоти та цистеїнілгліцину. Потім γ -глутаміл амінокислоти метаболізуються до оксопроліну, а амінокислота та оксопролін перетворюються назад у глутатіон. На метаболіти червоного кольору суттєво впливають ксенобіотики (рис.1.5) [27].

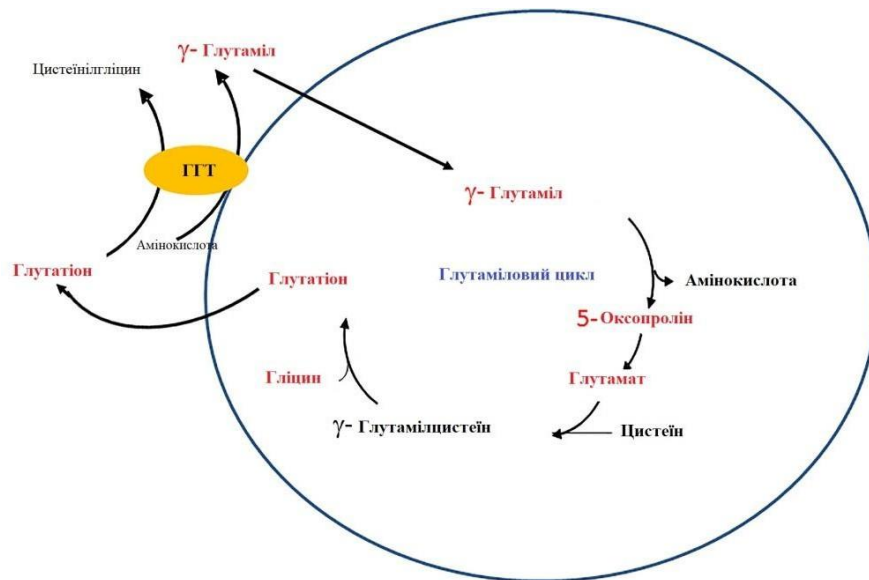


Рис.1.5. Участь γ -глутамілтрансфераза у γ -глутаміловому циклі

ГГТ – одна з багатьох пептидаз, яка розщеплює кінцеві пептидні зв'язки протеїнів або пептидів. При цьому С-кінцева амінокислота повинна бути глутаміною, а специфічність полягає в (γ) глутаміловій частині субстрату [28].

Цей ензим може каталізувати три різні реакції: 1. Гідроліз; 2. Внутрішня транспептидація; 3. Зовнішня транспептидація. Глутатіон є звичайним субстратом цього ензиму в організмі. ГГТ бере участь у транспорті амінокислотних залишків через плазматичну мембрану клітин. Цей процес здійснюється шляхом перенесення γ -глутамілової ділянки молекули глутатіону до молекули амінокислоти, яка транспортується. Саме це дозволяє амінокислотам легше перетинати плазматичні мембрани клітин [29].

Отже, основна концентрація ГГТ присутня в гепатоцитах. ГГТ виявляється в епітеліальних клітинах жовчного дерева, переважно в міждолькових жовчних протоках і жовчних протоках. Це є причиною того, що він сприйнятливий до пошкодження жовчних шляхів. На клітинному рівні ГГТ локалізується в мікросомах цитоплазми і в клітинній мембрані, тому підвищення активності цього ензиму в крові може вказувати на пошкодження клітин печінки.

1.3. Механізми гепатотоксичності за дії ксенобіотиків на організм

Різні види ксенобіотиків по-різному впливають на функціональний стан гепатобіліарної системи та можуть призвести до ураження печінки. Сьогодні розрізняють дві основні патогенетичні форми пошкоджень у печінці за умов впливу на організм екзогенних факторів – токсичні ураження й ідіосинкразичні пошкодження печінки [30].

Токсичні ураження печінки полягають в тому, що в організмі екзогенні токсичні речовини після біотрансформації можуть частково втрачати токсичність, проте часто в процесі біотрансформації таких речовин можуть утворюватися проміжні або кінцеві метаболіти, які проявляють гепатотоксичні властивості. Окрім того, малотоксичні речовини можуть перетворюватися у більш токсичні. Утворені продукти метаболізму можуть як безпосередньо впливати на структуру гепатоцитів, так і чинити опосередкований вплив на метаболічні реакції [30]. Подібний вплив ксенобіотиків на гепатобіліарну систему може бути дозозалежним та може визначатися тривалістю прийому препарату. Ксенобіотик або його метаболіт викликає ураження гепатоцитів. Такі зміни можуть супроводжуватися проявами невираженого запалення зі змінами біохімічних показників [31]. Період від прийому ксенобіотика до проявів токсичного впливу досить короткий та може становити кілька днів. До гепатотоксичних речовин можна віднести лікарські препарати, засоби косметичної хімії, харчові добавки у великих кількостях та інше. До складу багатьох цих речовин входять фталати, які в першу чергу можуть проявляти негативний вплив на організм з розвитком пошкоджень у печінці [32].

Ідіосинкратичні ураження печінки в основному зумовлені імунними порушеннями. Такі порушення розвиваються у зв'язку з тим, що певна речовина або її метаболіти утворюють стійкі сполуки з протеїнами, саме такі комплекси починають виступати у ролі антигенів, на які реагує імунна

система. Такий тип ураження печінки може викликатися розвитком ненормальної метаболічної реакції, при цьому будуть утворюватися патологічні транспортні протеїни й органели. Ідіосинкратичний тип пошкодження печінки непередбачуваний. Ідіосинкразію можуть викликати як лікарські препарати, так й інші види ксенобіотиків [33].

Ідіосинкратичний тип пошкодження не залежить від дози речовини та, утворених з неї метаболітів. Цей тип пошкодження непередбачуваний і може виражатися більш інтенсивною запальною реакцією у печінковій тканині. Латентний період між введенням ксенобіотика і появою ідіосинкразії зазвичай коливається від кількох днів до кількох місяців [34]. Фактори ризику розвитку лікарської ідіосинкразії можуть бути генетичні і негенетичні.

Застосування ксенобіотиків може викликати багаторазове підвищення рівня печінкових ензимів у плазмі крові, що переважно вказує на розвиток важкого токсичного ураження печінки (печінкову недостатність). Клінічні ознаки ураження печінки за дії різних ксенобіотиків різноманітні та визначаються типом ураження печінки. Пошкодження печінки може регресувати або стабілізуватися при припиненні введення в організм гепатотоксичних засобів. Це може покращити функціональний стан печінки, однак еволюція гістологічних змін у цьому органі відбувається значно повільніше. Під час продовження введення ксенобіотика процес може прогресувати і формуватися гепатотоксичність з переходом у цироз печінки, з формуванням печінкової недостатності [33].

Отже, застосування екзогенних ксенобіотиків, зокрема диетилфталатів (ДЕФ), з гепатотоксичною дією може визначати функціональний стан печінки.

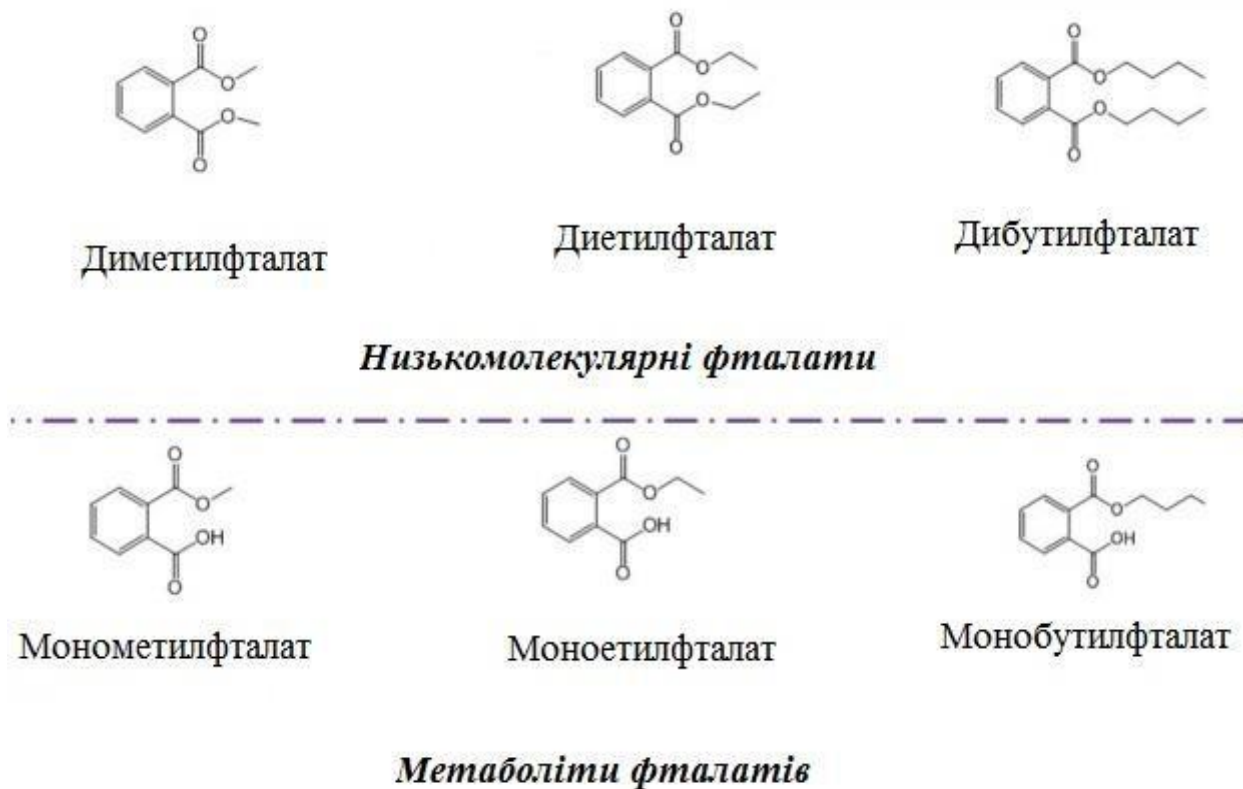
1.4. Токсичні механізми дії фталатів

Фталати є одними з найпоширеніших пластифікаторів у полімерних виробках, і вони все частіше впливають на організм людини у всьому світі,

створюючи проблеми зі здоров'ям. Фталати часто використовуються як допоміжні речовини в капсулах із контрольованим вивільненням у препаратах з кишковорозчинним покриттям. Зазвичай кишковорозчинні покриття на препаратах використовуються як бар'єр, який контролює вивільнення пероральних ліків у травній системі, де вони всмоктуються. Пацієнти, які приймають ці препарати, можуть бути в групі ризику [35]. Сьогодні відомо, що як у тварин, так і у людей фталати головним чином відповідають за дисфункцію яєчок, токсичність для яєчників, зниження стероїдогенезу. У зв'язку з цим, для кращого розуміння проблем для здоров'я, пов'язаних із застосуванням фталатів та їх метаболітів, потрібні ще додаткові дослідження. Важливо відзначити, що різноманітні форми фталатів і їх біомедичні ефекти повинні бути корисними для дослідження в різних тканинах або органах, зокрема печінки. Проте механізми токсичності цих сполу ще до кінця не вивчені [36].

Фталати – складні ефіри 1,2-дигідродифталіксової кислоти з помірною токсичністю. Незважаючи на те, що вони є відносно безпечнішими та нетоксичними для людських потреб, занепокоєння зростає, оскільки вони є молекулами, що порушують роботу ендокринної системи [37].

З метою аналізу впливу фталати часто групують за нижчою молекулярною масою (довжина бічного ланцюга складного ефіру, від одного до чотирьох атомів вуглецю – диметилфталат (ДМФ), ДЕФ і дибутилфталат (ДБФ) і за більшою молекулярною масою (довжина бічного ланцюга складного ефіру, п'ять або більше) (рис.1.6) [38].



Диметилфталат

Диетилфталат

Дибутилфталат

Монометилфталат

Моноетилфталат

Монобутилфталат

Рис.1.6. Основні фталати та їхні метаболіти

Фталати з високою молекулярною масою використовуються в основному в ПВХ-полімерах і пластизолях, пластмасах, харчовій упаковці та харчових продуктах, вінілових іграшках і вінілових покриттях для підлоги, а також будівельних виробках. Фталати з низькою молекулярною масою часто використовуються в засобах особистої гігієни, фарбах, адгезивах та кишковорозчинних таблетках [35].

Один із шляхів впливу на людину – їжа (пакувальні матеріали, харчова промисловість). Найчастіше використовують ДЕФ, ацетат фталат целюлози і фталат гідроксипропілметилцелюлози. Ці речовини можуть змінювати біохімічні процеси в організмі і викликати зміни з потенційним впливом на гормональні функції. Це може призвести до несприятливих клітинних ефектів, оскільки токсичність фталатів залежить від диалкільних або алкіл/арильних бічних ланцюгів [36].

Розуміння основних механізмів впливу фталатів допоможе проаналізувати вплив і ризик токсичності фталатів на численні органи людини.

Дослідження біомоніторингу людини вимірювали вихідні фталати в сироватці крові та їх метаболіти в сечі людини, спермі та грудному молоці. Дослідження показали, що вплив фталатів пов'язаний з окислювальним стресом у людей. Деякі дослідження пов'язують вплив фталатів із передчасним телархе, ендометріозом, низька якість сперми, знижений рівень тестостерону, ожиріння, діабет і рак молочної залози [38].

Один із найбільш значущих ефектів фталатів стосується розвитку плода та репродуктивних аномалій і називається «фталатним синдромом» (наприклад, вплив на розвиток або яєчка, виробництво інсуліноподібного фактора 3). Крім того, вплив фталатів може бути пов'язано з резистентністю до інсуліну та ожирінням у людей [38].

ДЕФ та інші використовуються в іграшках, сумках, рукавичках і пластикових трубках для покращення гнучкості та надання полімерним виробам м'якості та податливості. ДЕФ широко використовуються в косметиці, такій як духи, засоби після гоління, шампуні, макіяж і засоби для догляду за нігтями. Косметика та засоби особистої гігієни є основними джерелами впливу на людину низькомолекулярних фталатів. Пластикові плівки харчової упаковки містять фталати (такі як ДЕФ і ДБФ) на рівні до 10% за вагою. Міграція пластифікатора відбувається, коли харчова пакувальна плівка вступає в безпосередній контакт з харчовими продуктами, а жирна їжа та високі температури посилюють міграцію. Їжа – основне джерело впливу високомолекулярних фталатів. Зокрема, харчові продукти, упаковані в пластик/ПВХ, сприяють впливу високомолекулярних фталатів на людей [1].

Основним джерелом впливу ДЕФ – одного з основних фталатів, які містяться в сечі людини – є косметика та засоби особистої гігієни [37]. Дослідження показали підвищені концентрації фталатів у повітрі та пилу в

приміщенні [3]. Фактично, серед різноманітних забруднювачів, виміряних у внутрішньому пилу, фталати, особливо ДЕФ, є основними забруднювачами внутрішнього пилу та повітря. Повідомлялося, що фталати також зустрічаються в фармацевтичних препаратах, особливо в безрецептурних ліках/сиропах [38].

Сьогодні не вистачає даних щодо біомоніторингу про вплив фталатів на організм, особливо на основний гомеостатичний орган – печінку.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт та методи досліджень

Експериментальні дослідження виконували з використанням білих безпородних щурів масою 110-130 г. Усі піддослідні тварини знаходилися на стандартному харчовому раціоні у віварії. Харчовий раціон був збалансований за всіма компонентами, зокрема необхідними мікроелементами та макроелементами. У тварин був вільний доступ до води та харчового раціону.

Усі роботи з щурами (утримання, необхідні маніпуляції, евтаназію) проводили відповідно до затверджених положень згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та відповідно до положень вітчизняних фахівців з біоетики – «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», які були ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

В експерименті використали 36 тварин, які були розділені на 3 групи.

I група – контрольна (інтактні тварини);

II група – щури, яким щоденно вводили фталати, у вигляді ДЕФ у дозі 2,5 мг на кг маси тварин;

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

У кожній групі знаходилося по 12 тварин. Введення ДЕФ здійснювали протягом 21-ї доби. Проте евтаназію тварин проводили на 14-у та 21-у доби після початку застосування ксенобіотика. На кожен добу проводили евтаназію 6 тварин з кожної експериментальної групи.

Кров забирали з сонної артерії тварин у скляні центрифужні пробірки. Після цього проби центрифугували протягом 10 хв при 1500 об/хв з метою виділення сироватки крові.

Для визначення біохімічних маркерів функціонального стану печінки у виділеній сироватці крові визначали ензимні активності АЛТ, АСТ і ГГТ.

Окрім того, за допомогою математичних методів розраховували коефіцієнт де Рітса.

Визначення аланінамінотрансферазної активності у сироватці крові

Принцип методу визначення активності цього ензиму в сироватці крові полягає в амінуванні 2-оксоглутарату L-аланіном, яке здійснюється за дії АЛТ. У результаті цієї реакції утворюються продукти L-глутамат та піруват. Визначення полягає у вимірюванні оптичної густини комплексів 2,4-дінітрофенілгідразонів 2-оксоглутарату і пірувату в лужному середовищі. Так як гідразон пірувату має вищий коефіцієнт молярної екстинції, то можна спостерігати прямо пропорційну залежність оптичної густини реакційної суміші від активності досліджуваного ензиму [39].

Хід визначення

1. У дві пробірки – дослідну та холосту додавали субстратно-буферний розчин в об'ємі 0,4 мкл, після чого проби інкубували 3 хв при температурі плюс 37°C.
2. Після завершення інкубації до об'єму рідини в холостій пробірці додавали 0,4 мкл стоп-реагенту. При цьому відбувалася зупинка реакції.
3. Зупинивши реакцію, в обидві пробірки – дослідну та холосту вносили сироватку крові в об'ємі 0,08 мкл.
4. Пробірки інкубували 60 хв при температурі плюс 37°C.
5. Після завершення часу інкубації (через 60 хв) до дослідної пробірки додавали стоп-реагенту в об'ємі 0,4 мкл.
6. Пробірки витримували протягом 20 хв при кімнатній температурі.
7. Через 20 хв (після закінчення часу інкубації) до обох пробірок (дослідної та холостої) додавали 0,4N розчин гідроксиду натрію в об'ємі 4 мкл.
8. Пробірки витримували 10 хв при кімнатній температурі.

9. Вимірювання оптичної густини дослідної проби проводили проти холостої на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 520 нм.

10. Ензимну активність АЛТ розраховували за калібрувальним графіком з використанням для побудови цього графіка пірвинограднокислого натрію (концентрація 2,0 ммоль/л).

Визначення аспаратамінотрансферазної активності у сироватці крові проводили за методом Райтмана-Френкеля (як і у випадку АЛТ) з використанням діагностичного набору «Філісіті-Діагностика» (Україна).

Принцип методу полягає в тому, що за дії АСТ відбувається переамінування з утворенням глутамату та оксалоацетату. Зупинку ензимного процесу проводили додаванням 2,4-динітрофенілгідразину 2,4-(ДНФГ). У результаті реакції в лужному середовищі утворюються забарвлені гідрозони оксалоацетату та пірувату. Слід зауважити, що гідрозон пірувату утворюється під час самовільного декарбоксілювання оксалоацетату та має більшу оптичну густину. За величиною абсорбції визначають активність АСТ [39].

Хід визначення

1. У дослідну та холосту пробірки додавали субстратно-буферний розчин в об'ємі 0,5 мкл. Після цього пробірки інкубували 5 хв при температурі плюс 37°C.

2. Після інкубації у дослідну пробірку вносили 0,1 мкл сироватки крові.

3. Дослідну та холосту пробірки знову інкубували 60 хв при температурі плюс 37°C.

4. Після інкубації (через 60 хв) до дослідної пробірки додавали 2,4-ДНФГ в об'ємі 0,5 мкл. До холостої пробірки додавали як 0,5 мкл 2,4-ДНФГ, так і 0,1 мкл сироватки крові.

5. Пробірки залишали на 20 хв при кімнатній температурі.

6. Після закінчення часу до дослідної та холостої пробірок додавали 0,4N розчин гідроксиду натрію в об'ємі 5 мкл.

7. Проби витримували 10 хв при кімнатній температурі.
9. Вимірювання оптичної густини дослідної проби проводили проти холостої на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 505 нм.
10. Ензимну активність АСТ розраховували за калібрувальним графіком з використанням для побудови цього графіка пірвінограднокислого натрію (концентрація 2,0 ммоль/л).

Визначення γ -глутамілтрансферазної активності у сироватці крові проводили з використанням лабораторного набору «Філісіті-Діагностика» (Україна).

Принцип методу полягає в тому, що за дії ГГТ глутаміновий залишок з субстрату γ -L-(+)-глутаміл-4-нітроаніліда транспортується на дипептидний акцептор – це гліцилгліцин. В умовах цієї реакції вилучається хромоген-п-нітроанілін. Оптичну густину реакційної суміші вимірювали після зупинки реакції оцтовою кислотою [40].

Хід визначення

1. У 4 пробірки – дослідну, холосту, калібрувальну та пробу порівняння додавали робочий субстратний розчин у об'ємі 1 мкл. Після цього пробірки інкубували 5 хв при температурі плюс 37°C.
2. Після закінчення часу інкубації у дослідну пробірку вносили 0,1 мкл сироватки крові. Відразу проводили повторне інкубування всіх 4-х пробірок протягом 15 хв при температурі плюс 37°C.
3. По закінченню інкубації у дослідну пробірку додавали 6 мкл розчину оцтової кислоти. Водночас, у холосту пробірку додавали розчин оцтової кислоти в об'ємі 6 мкл та 0,1 мкл сироватки крові. У калібрувальну пробірку додавали калібратора в об'ємі 0,05 мкл, розчину оцтової кислоти в об'ємі 6 мкл та 0,05 мкл дистильованої води. У пробу порівняння додавали розчину оцтової кислоти в об'ємі 6 мкл та 0,1 мкл дистильованої води. Всі 4 вище перераховані пробірки витримували 5 хв при кімнатній температурі.

4. Оптичну густину дослідної пробірки ($E_{\text{досл}}$) вимірювали проти холостої пробірки. Тоді як оптичну щільність калібрувальної проби ($E_{\text{кал}}$) вимірювали проти проби порівняння. Вимірювання здійснювали на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 405 нм.

Ензимну активність ГГТ розраховували за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 3 \times 3,6 / \text{мг білка} / 15 \text{ хв},$$

де 3 – коефіцієнт перерахування, мккат/л;

3,6 – коефіцієнт перерахування, кмоль;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби, од. опт. густини;

$E_{\text{кал}}$ – оптична густина калібрувальної проби, од. опт. густини.

Ензимну активність ГГТ виражали в мкмоль/хв на мг протеїна [40].

Вміст білка визначали методом Лоурі [41].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням персонального комп'ютера. При цьому для аналізу результатів використовували пакет аналізу табличного редактора «Excel 2010 for Windows». Результати розраховували методом варіаційної статистики, а обробку результатів дослідження проводили із застосуванням t-критерія Стьюдента. У графіках результати представляли, як середнє арифметичне значення (M) та похибка середнього арифметичного (m) ($M \pm m$). Різницю між групами вважали достовірною, якщо коефіцієнт вірогідності становив $p < 0,05$ [42].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Масове збільшення використання штучних ксенобіотиків у різних галузях промисловості викликає необхідність постійно вивчати можливий вплив таких речовин на живі клітини організму. Сьогодні до таких, широко використовуваних, речовин належать фталати.

Фталати являють собою різноманітну групу синтетичних ефірів фталевої кислоти, які відрізняються довжиною та розгалуженням алкільних бічних ланцюгів. Довголанцюгові фталати часто використовують як пластифікатори, а коротколанцюгові фталати – як розчинники. Як пластифікатори, фталати підвищують довговічність і гнучкість продукту. У гнучкому пластику, такому як полівінілхлорид (ПВХ), фталати можуть становити до 80% ваги кінцевого продукту. Більш короткі та летючі фталати широко використовуються як розчинники та носії в різноманітних продуктах особистої гігієни, включаючи лосьйони, духи, шампуні, лаки для волосся та засоби для макіяжу. Фталати також використовуються в м'яких трубках медичних пристроїв і як допоміжні речовини в ліках.

Найбільш використовуваними фталатами є: диетилфталат (ДЕФ), дибутилфталат (ДБФ), диізононілфталат (ДІНФ), диметилфталат (ДМФ). У пластмасі фталати не зв'язані ковалентно зі структурою, що призводить до їхнього вимивання та потрапляння у продукти харчування. У такий спосіб ці ксенобіотики забруднюють їжу, воду, ґрунт, повітря та пил. Вважається, що низькомолекулярні фталати, зокрема ДЕФ, більш токсичні ніж високомолекулярні.

Людина піддається впливу фталатів та їх сумішей переважно через споживання фталатвмістимої їжі, а також через вдихання фталатів, що передаються повітрям, і прямого контакту шкіри з продуктами, що містять фталат. Тобто джерела надходження цих речовин в організм людини досить різноманітні, що може негативно позначитися на функціонуванні різних органів у організмі, зокрема печінки.

Функції печінки в організмі спрямовані на підтримання гомеостазу, за рахунок того, що цей орган виконує найрізноманітніші функції – біотрансформація ксенобіотиків, захист, синтез речовин та їх виділення тощо. Печінка бере участь у процесах травлення та у процесах кровотворення. У печінці здійснюються основні етапи вуглеводного, жирового, білкового та мінерального обмінів, а також обміну вітамінів.

Оскільки однією з функцій печінки є біотрансформація ксенобіотиків, то порушення функцій цього органу в організмі знижує детоксикацію цих речовин. З іншого боку, токсичні речовини можуть негативно впливати на процеси, що відбуваються у печінці. Тому, визначення функціонального стану печінки за дії різних ксенобіотиків є досить актуальним. Стан печінки оцінювали за активністю у сироватці крові амінотрансфераз – АЛТ та АСТ.

Результати проведених досліджень показали, що чотирнадцятиденне введення ДЕФ у дозі 2,5 мг на кг маси тварин не призводить до підвищення активності АЛТ, оскільки значення не відрізнялися від показників інтактних тварин. За умов введення вищих доз ДЕФ – 5,4 мг/кг виявлено підвищення активності досліджуваної амінотрансферази у сироватці крові. Так, аланінамінотрансферазна активність у 1,9 рази перевищувала значення групи інтактних тварин ($p \leq 0,05$) (рис.3.1). Підвищення ензимної активності АЛТ у сироватці крові може бути наслідком вивільнення цього ензиму з гепатоцитів. Вивільнена АЛТ транспортується до внутрішньодолькових просторів печінки, після чого потрапляє в кров [43]. Тому, можна вважати, що потрапляння АЛТ у сироватку крові – наслідок підвищення проникливості мембран клітин печінки або наслідок загибелі гепатоцитів.

Оскільки ензим внутрішньоклітинно локалізується в мітохондріях, то вивільнення його у кров може бути наслідком пошкодження мітохондрій. При цьому надалі може спостерігатися подальша загибель гепатоцитів, проте не завжди.

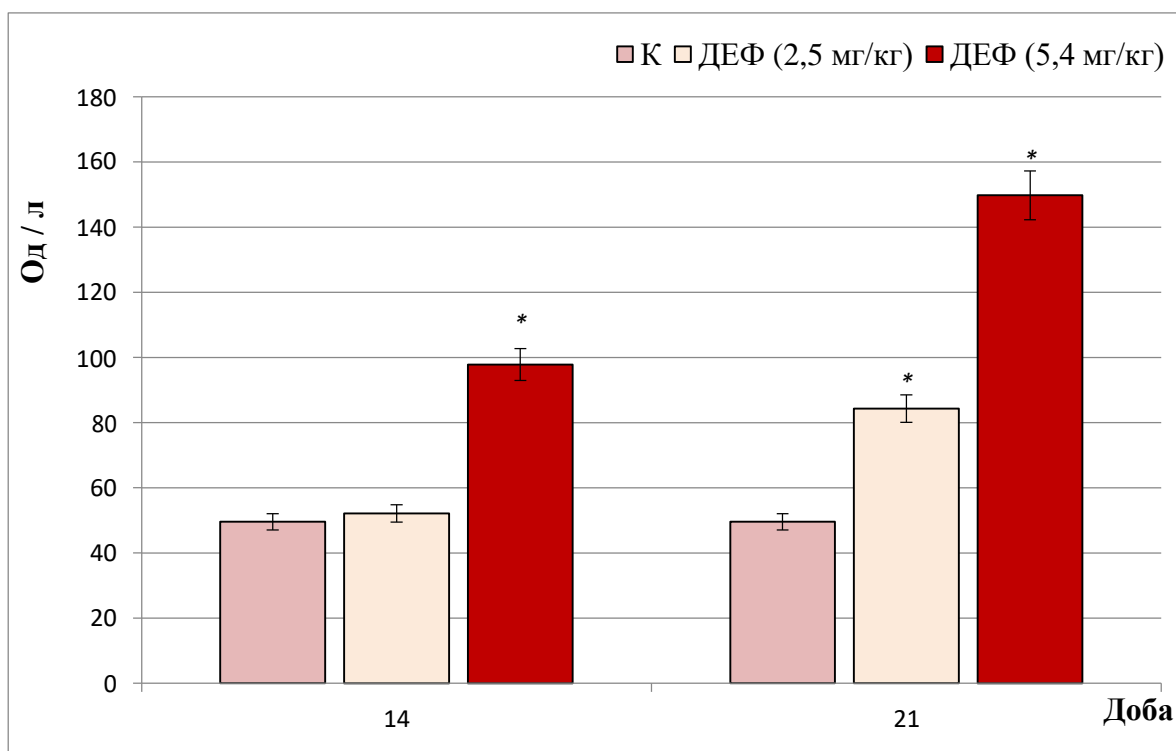


Рис.3.1. Аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення різних доз диетилфталату

*Примітка (тут і надалі): К – контрольна група щурів; ДЕФ (2,5 мг/кг) – щурі, яким вводили диетилфталат у дозі 2,5 мг на кг маси тварин; ДЕФ (5,4 мг/кг) – щурі, яким вводили диетилфталат у дозі 5,4 мг на кг маси тварин; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками інтактних тварин, ($p \leq 0,05$).*

Подальше введення ДЕФ протягом 21-ї доби призводило до більш суттєвішого підвищення ензимної активності АЛТ, оскільки ензимна активність досліджуваного ензиму підвищувалася у 1,7 рази за дії ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тварин та у 1,8 рази за дії ДЕФ у дозі 5,0 мг/кг маси тварин (рис.3.1).

З отриманих результатів випливає, що з підвищенням дози введення та терміну впливу на організм ДЕФ виявляється гіперферментемія АЛТ, що може вказувати на порушення функціонування печінки.

Щодо визначення активності іншої амінотрансферази – АСТ, то активність цього ензиму в сироватці крові підвищувалася у 1,4 рази за умов

введення в організм ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг протягом чотирнадцяти днів, що статистично достовірно відрізнялося від показників групи контролю ($p \leq 0,05$) (рис.3.2). Водночас чотирнадцятиденне введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг не призводило до зміни аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові (рис.3.2).

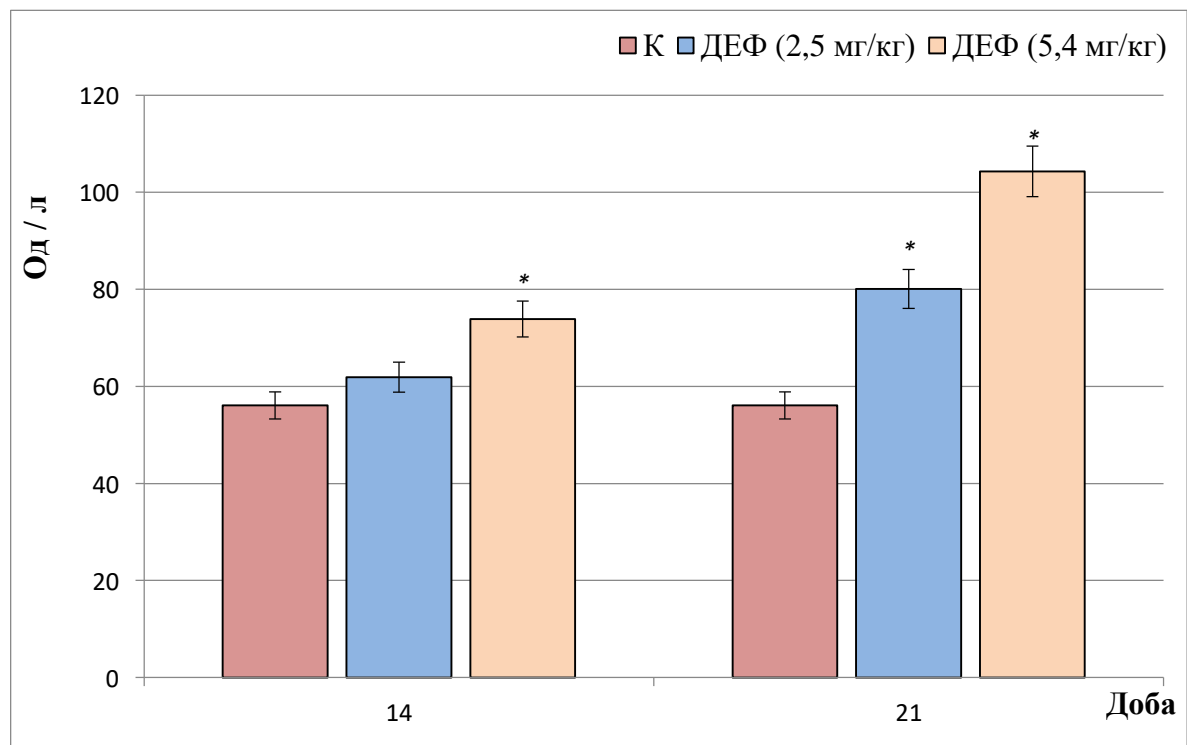


Рис.3.2. Аспартатамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення за умов введення різних доз диетилфталату

За умов трижизневого введення різних доз ДЕФ виявлено більш виражене підвищення аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові, оскільки досліджуваний показник у 1,3 рази та у 1,9 рази перевищував показник контролю за умов введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг та 5,4 мг/кг маси тварин відповідно ($p \leq 0,05$) (рис.3.2).

Підвищення рівня АСТ у сироватці крові за дії ДЕФ може бути результатом проходження двох окремих процесів – вивільнення через порушення плазмолемі гепатоцитів або пасивне вивільнення як результат загибелі клітин печінки. Проте, АСТ є не тільки маркером пошкодження

клітин печінки, але й кардіоміоцитів, то його гіперферментемія може бути результатом пошкодження клітин серця. Тому, щоб перевірити, що є причиною гіперферментемії АСТ ми визначили співвідношення ензимних активностей АСТ до АЛТ – коефіцієнт де Рітіса. Цей показник часто використовують при диференційній діагностиці пошкоджень печінки та серця. Інтерпретація показника коефіцієнта де Рітіса полягає в тому, що його підвищення спостерігається при пошкодженні міокарду, тоді як зниження вказує на пошкодження печінки.

Результати проведених досліджень показали зниження співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітіса), яке найбільше виражене на 21-у добу введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг, оскільки досліджуваний показник був у 1,6 рази нижче показника контролю та становив $0,69 \pm 0,043$ (рис.3.3).

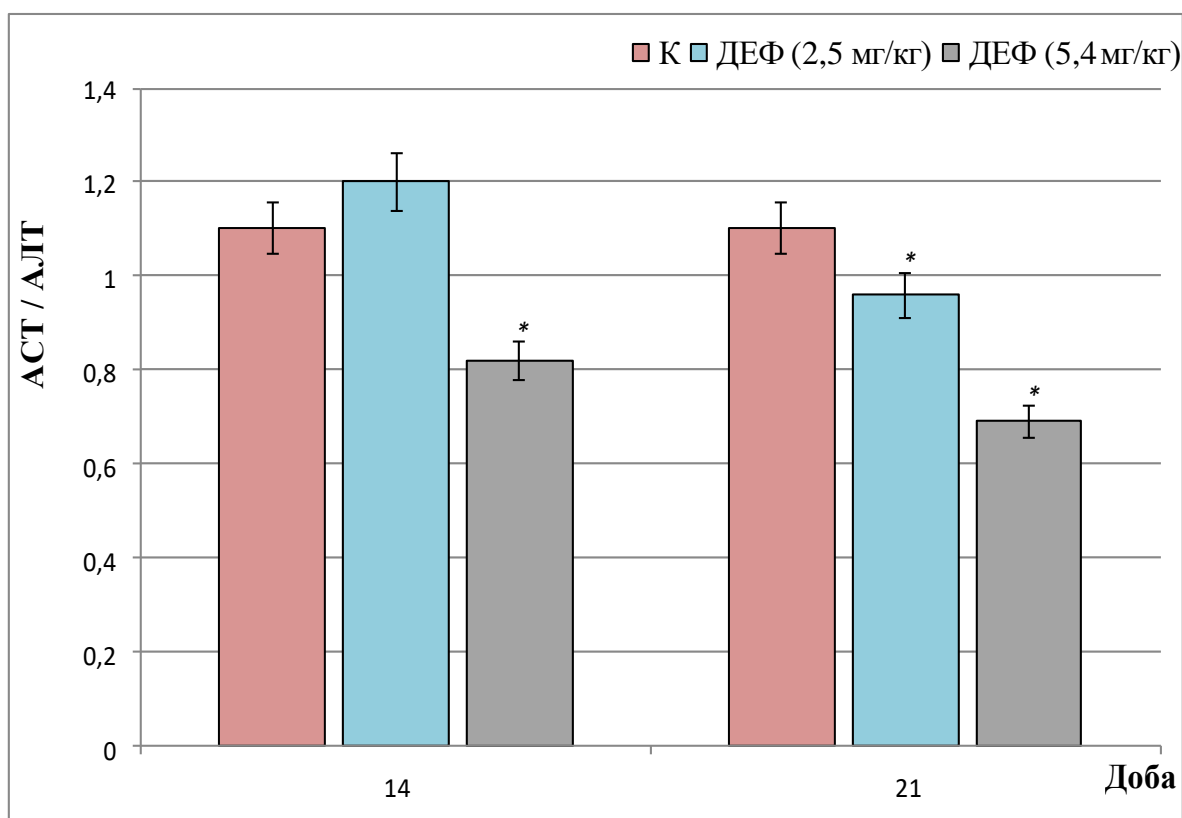


Рис.3.3. Співвідношення АСТ/АЛТ у тварин, яким вводили різні дози диетилфталату

При тритижневому введенні ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг виявлено зниження коефіцієнта де Рітіса у 1,2 рази порівняно з показником інтактних тварин із показником $0,96 \pm 0,073$ ($p \leq 0,05$) (рис.3.3). Зменшення коефіцієнта де Рітіса може вказувати на порушення функціональної активності саме печінки, оскільки гіперферментемія АЛТ перевищує гіперферментемію АСТ, а показник де Рітіса знаходиться в межах нижче 1 (значення, які нижче 1 вказують на пошкодження печінки).

Таким чином, виявлене нами підвищення ензимної активності трансаміназ вказує на гепатоцелюлярне пошкодження. Імовірно, внаслідок цитолізу клітин печінки досліджувані ензими надходять у кров, що виражається збільшенням їх активності у сироватці крові [43]. Дисфункціонування печінки може бути викликане або прямим впливом ДЕФ на печінку, або впливом утворених продуктів метаболізму ДЕФ. Встановлено, що ДЕФ метаболізується в організмі до продуктів, які ініціюють дегенеративні процеси як в печінці, так і в інших органах [44].

Отже, за умов підвищення дози та тривалості введення ДЕФ в організм посилюється шкідливий вплив цього ксенобіотика на печінку.

Іншим маркером функціонального стану печінки вважається підвищення ензимної активності ГГТ у сироватці крові, враховуючи локалізацію та біологічну роль ГГТ у клітинах.

Аналіз результатів показав підвищення γ -глутамілтрансферазної у сироватці крові за умов введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тварин на 14.-у добу експерименту, що у 1,3 рази перевищувало показник контролю (рис.3.4). Введення нижчих доз ДЕФ протягом двох тижнів не призводило до змін досліджуваного показника порівняно з контролем.

По мірі збільшення дози та терміну введення ДЕФ ензимна активність ГГТ збільшувалася ще більше. Так, на 21-у добу експерименту ензимна активність ГГТ підвищувалася у 1,3 рази при введенні ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг та у 1,9 рази при введенні ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг порівняно з показниками контролю (рис.3.4).

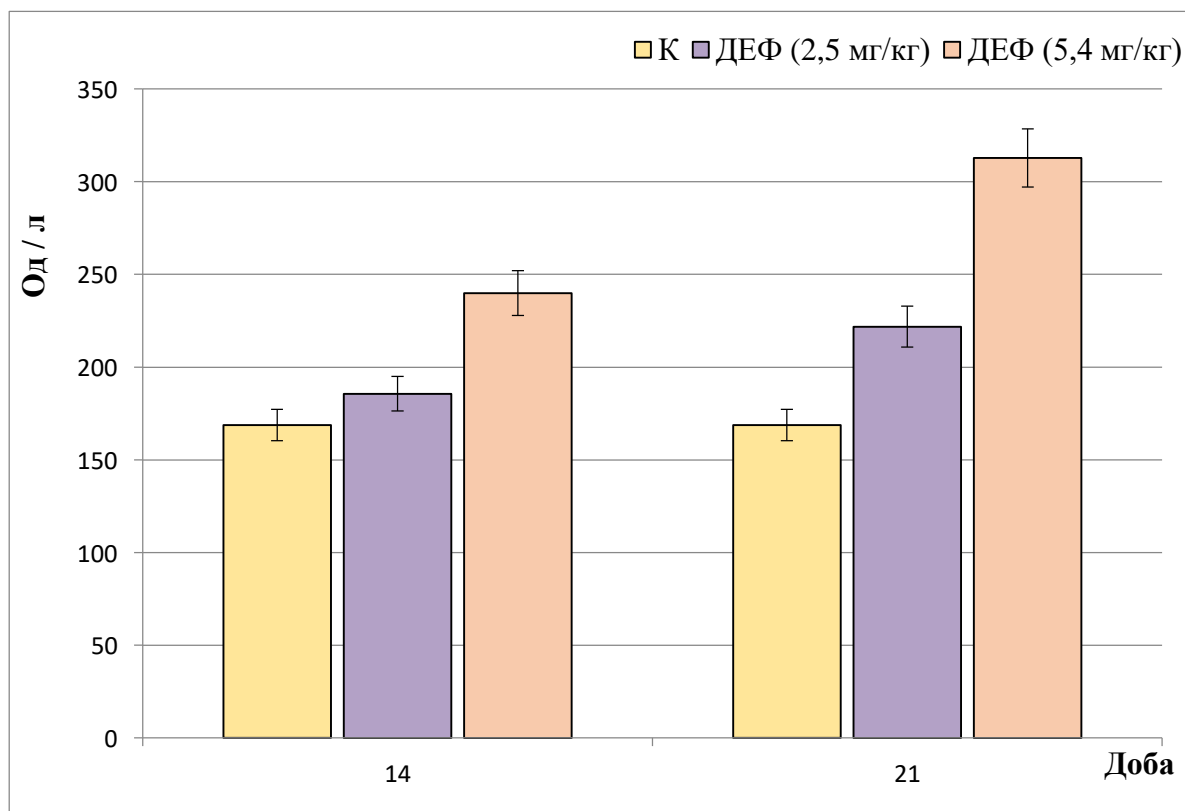


Рис.3.4. Ензимна активність γ -глутамілтрансферази в сироватці крові щурів за умов введення за умов введення різних доз диетилфталату

Підвищення сироваткового рівня γ -глутамілтрансферазної активності вказує на пошкодження клітин печінки [43]. Відомо, що ГГТ у великій кількості знаходиться на плазмолемі клітин печінки, тому будь-які пошкодження плазматичної мембрани будуть супроводжуватися вивільнення цього ензиму у кров'яне русло. Як видно з результатів дослідження більш виражену мембранодеструктивну дію ДЕФ проявляє за умов його тритижневого введення в організм у дозі 5,4 мг/кг маси тварин.

Отже, виявлена нами гіперферментемія АЛТ, АСТ і ГГТ вказує на порушення функціонального стану печінки за дії різних доз ДЕФ. Ці зміни в організмі можуть відображатися відповідними патологічними наслідками, які включають дисфункцію печінки. Тритижнєве введення в організм як

високих, так і середніх доз ДЕФ супроводжується дисфункціонуванням печінки, а це, в свою чергу, може свідчити про порушення білок-синтетичної функції печінки та вихід досліджуваних ензимів (АЛТ, АСТ і ГГТ) у кров'яне русло

ВИСНОВКИ

1. За умов тритижневого введення різних доз ДЕФ виявлено підвищення рівня ензимних активностей АЛТ, АСТ та ГГТ в сироватці крові щурів, яке більшою мірою виражене за дії високих доз ДЕФ (5,4 мг/кг маси тварин).

2. По мірі збільшення дози та терміну введення в організм ДЕФ виявлено зниження співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітіса), що може вказувати на порушення функціонального стану печінки.