

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

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

**СТАН КОМПОНЕНТІВ ЕНЗИМНОЇ ЛАНКИ
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В СУБКЛІТИННИХ
ФРАКЦІЯХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ДИЕТИЛФТАЛАТУ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, групи 600М

спеціальності 091-Біологія

ОП «Біохімія та лабораторна

діагностика»

Швець Анастасія Олександрівна

Керівник:

к.б.н., доцент **Кеца О. В.**

Чернівці - 2023

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню та дослідженню у тканинах печінки ензимів, які належать до ферментативної ланки антиоксидантної системи за дії різних доз та термінів введення диетилфталату (ДЕФ).

Показано, що при двотижневому вживанні мінімальної і максимальної дози – 2,5 та 5,4 мг/кг маси тіла ензиматична активність досліджуваних нами ензимів підвищується, а тритижневе введення максимальної дози ДЕФ призводить до поступового зниження активності ензимів.

Встановлено, що при введенні різних доз ДЕФ протягом 14-ти діб активність антиоксидантних ензимів підвищується, що свідчить про збільшення інтенсивності вільнорадикальних процесів у організмі. Одночасне введення максимальної дози протягом 21-ї доби призводить до зниження ензимів, що може бути результатом дії надлишкової кількості побічних продуктів у процесі їх функціонування.

Ключові слова: печінка, мікросомальна фракція, цитозоль, диетилфталат, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза, відновлений глутатіон.

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study and investigation of enzymes belonging to the enzymatic link of the antioxidant system in liver tissues under the influence of different doses and terms of diethyl phthalate (DEP) administration.

It has been shown that with a two-week administration of the minimum and maximum dose of 2.5 and 5.4 mg/kg body weight, the enzymatic activity of the enzymes studied by us increases, and a three-week administration of the maximum dose of DEP leads to a gradual decrease in enzyme activity.

It has been established that when administered in different doses of DEP for 14 days, the activity of antioxidant enzymes increases, which indicates an increase in the intensity of free radical processes in the body. Simultaneous administration of the maximum dose for 21 days leads to a decrease in enzymes, which may be the result of an excessive amount of by-products in the process of their functioning.

Key words: liver, microsomal fraction, cytosol, diethyl phthalate, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, reduced glutathione.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Будова та функції супероксиддисмутази	9
1.2. Будова та функції каталази.....	12
1.3. Загальна характеристика відновленого глутатіону.....	15
1.4. Будова та функції глутатіонпероксидази	18
1.5. Будова та функції глутатіон-S-трансферази	20
1.6. Загальна характеристика диетилфталату.....	23
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	26
2.1. Об'єкти та матеріали досліджень.....	26
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	30
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	40
ДОДАТКИ.....	48
Додаток 1. Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях.....	48
Додаток 2. Надання першої допомоги.....	50

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ

CAT – каталаза

GSH – відновлений глутатіон

GSH-Px – глутатіонпероксидаза

GSH-Rd – глутатіонредуктаза

GSSG – окислений глутатіон

GST – глутатіон-S-трансфераза

SOD – супероксиддисмутаза

АФК – активні форми кисню

ДФФ – диетилфталат

МЕФ – моноетилфталат

ПВХ – полівінілхлориди

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ВСТУП

Розвиток технологій надає дуже багато переваг, яке пов'язується із утворенням великої кількості поллютантів, які можуть потрапляти та зберігатися у воді, ґрунті та повітрі. Найбільш розповсюдженими забруднювачами є пластифікатори, які активно використовуються у виробництві [1].

Найпоширеніша група пластифікаторів – фталати. Це група синтезованих хімічних речовин, які використовуються для виробництва полівінілхлоридів, які здатні надавати предметам гнучкості, міцності, прозорості [2].

Серед всієї групи, чільне місце посідає – диетилфталат (ДЕФ), який входить до складу іграшків, меблів, клею, засобів косметичного й індивідуального використання та навіть до складу фармацевтичних та медичних матеріалів [2]. Оскільки, дана група здатна адсорбуватися частинками у воді та ґрунті, то це призводить до того, що вони зберігаються в навколишньому середовищі протягом багатьох років. В організм людини ці ксенобіотики найчастіше можуть потрапляти різноманітними шляхами, але найпоширеніший спосіб через шкіру [3]. Також, відомо, що фталати володіють токсичними властивостями, які можуть порушувати перебіг різноманітних метаболічних шляхів у клітинах, що призводить до порушення роботи багатьох систем організму та в кінцевому результаті до виникнення різних захворювань. Тому, питання остаточного механізму через що та як саме вони проявляють свою токсичність до цих пір залишається відкритим [3].

Сьогодні актуальним залишається питання щодо проведення досліджень впливу ДЕФ на організм в цілому, оскільки ці речовини є сторонніми сполуками для організму, тому необхідно встановити механізм дії токсичності.

Виходячи із даних багатьох джерел немає остаточної інформації щодо допустимої норми ДЕФ, яка буде вважатися безпечною. Тому, також, актуальним залишається дослідити можливі допустимі та небезпечні концентрації даного пластифікатора на організм людини та тварини. Можливий період, що в організмі посилюються процеси вивільнення активних форм кисню (АФК), які призводять до стану окисного стресу. І для пригнічення їх генерації в організмі активується антиоксидантна система захисту [4].

Відомо, що ензимну ланку антиоксидантного захисту формують такі ензими: супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатіонпероксидаза (GSH-Px), глутатіон-S-трансфераза (GST) та глутатіонредуктаза (GSH-Rd), які становлять першу лінію бар'єру, що надає підтримку та стресостійкість організму, який піддався впливу різних токсичних сполук [5]. Оскільки, дані ензими тісно взаємопов'язані між собою, де вони контролюють та підтримують рівень вільних радикалів, тож, актуальним залишається дослідити активацію або інактивацію антиоксидантних ензимів у субклітинних структурах печінки щурів при надходженні в організм ДЕФ, що дозволить передбачити і попередити вільнорадикальне окиснення біомолекул у клітинах (ліпідів, протеїнів, нуклеїнових кислот) [4, 6].

Мета роботи: оцінити активність антиоксидантних ензимів у субклітинних фракціях печінки щурів за дії різних доз та термінів введення ДЕФ.

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

1. Визначити ензиматичну активність супероксиддисмутази в печінці щурів за умов дії різних концентрацій диетилфталату.
2. Дослідити ензиматичну активність каталази в печінці щурів за умов дії різних концентрацій диетилфталату

3. Визначити глутатіонпероксидазну та глутатіонтрансферазну активності в печінці щурів за умов дії різних концентрацій диетилфталату.
4. Оцінити рівень відновленого глутатіону в цитозольній фракції печінки щурів за умов дії різних доз диетилфталату.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Будова та функції супероксиддисмутази

Основними компонентами ензимної ланки антиоксидантної системи є такі ензими: супероксиддисмутаза (SOD, *EC 1.15.1.1*), каталаза (CAT, *EC 1.11.1.6*), глутатіонпероксидаза (GSH-Px, *EC 1.11.1.9*), глутатіон-S-трансфераза (GST, *EC 2.5.1.18*), глутатіонредуктаза (GSH-Rd, *EC 1.8.1.7*) Останні три ензими використовують відновлений глутатіон, який належить до неензимної ланки антиоксидантної системи, як субстрат у реакціях детоксикації [7].

Супероксиддисмутази (SOD, *EC 1.15.1.1*) – це родина антиоксидантних ензимів, які належить до класу оксидоредуктаз та беруть участь у знешкодженні супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\bullet-}$), щоб запобігти окисному стресу [8].

В еукаріотичних організмах функціонують три ізоформи супероксиддисмутази, які для своєї діяльності, використовують кофактори у вигляді іонів металів: [9]

Супероксиддисмутаза (SOD1, Cu/Zn) – мідь-цинкова залежна ізоформа, яка функціонує у цитозолі та ядрі.

Супероксиддисмутаза (SOD2, Mn) – манган залежна ізоформа, яка функціонує в мітохондріях.

Супероксиддисмутаза (SOD3, EC) – мідь-цинкова залежна ізоформа, яка потребує іонів металів, як кофакторів для того, щоб підтримувати свій окисно-відновлений потенціал, але функціонує в позаклітинному просторі [9, 10].

Мідь-цинкова залежна супероксиддисмутаза (SOD1, Cu/Zn) – являє собою висококонсервативний гомодимерний металовмісний ензим, з молекулярною масою 32 кДа, який складається із двох субодиниць, у якому кожний мономер утворений із 153-х амінокислотних залишків. В основному

локалізується в цитозолі, у менших концентраціях – ядрі, міжмембранному мітохондріальному просторі та пероксисомах [11].

Структура (SOD1, Cu/Zn) набуває форму восьмиланцюгової β -діжки у вигляді грецького ключа. Умовно його структуру можна поділити на 3 основні частини:

1. N-кінцева ділянка, являє собою аміно-кінець, яка включає три домени β -ланцюга.

2. Ланцюг, який забезпечує зв'язування із іонами металів, тобто, кожна субодиниця містить два кофактори: один іон міді (Cu) та один іон цинку (Zn). Іон міді (Cu) необхідний для каталізу і зв'язаний із чотирма залишками гістидину, а іон цинку (Zn) стабілізує структуру ензиму і зв'язаний із трьома залишками гістидину та одним залишком аспартату. І крім цього, кожна субодиниця, яка зв'язана із іонами металів стабілізується дисульфідними зв'язками, які виникають між залишками цистеїну та забезпечують структурну сталість.

3. С-кінцева ділянка, являє собою карбоксильний кінець, яка включає останні три домени β -ланцюга та електростатичний ланцюг, який відіграє роль як у структурній, так і у каталітичній активності (рис. 1.1) [11, 12].

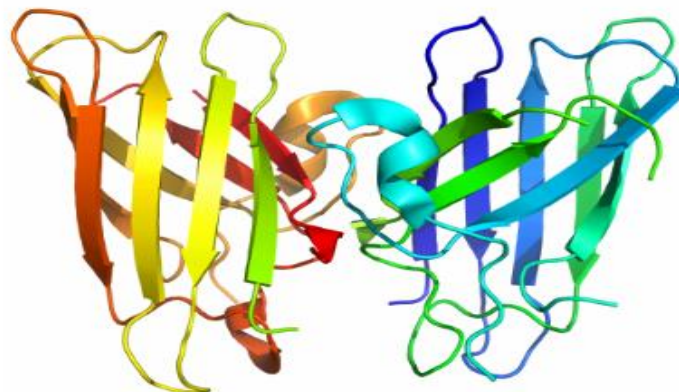


Рис 1.1. Кристалічна структура супероксиддисмутази (SOD1, Cu/Zn)

Родина супероксиддисмутази відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті організму від генерації активних форм кисню, а саме супероксидного аніон-радикала, який вивільняється в ході різних реакцій організму, основними з яких є окислювальні спалахи з клітин імунної системи (нейтрофілів) і як побічний продукт аеробного дихання (рис. 1.2) [13, 14].

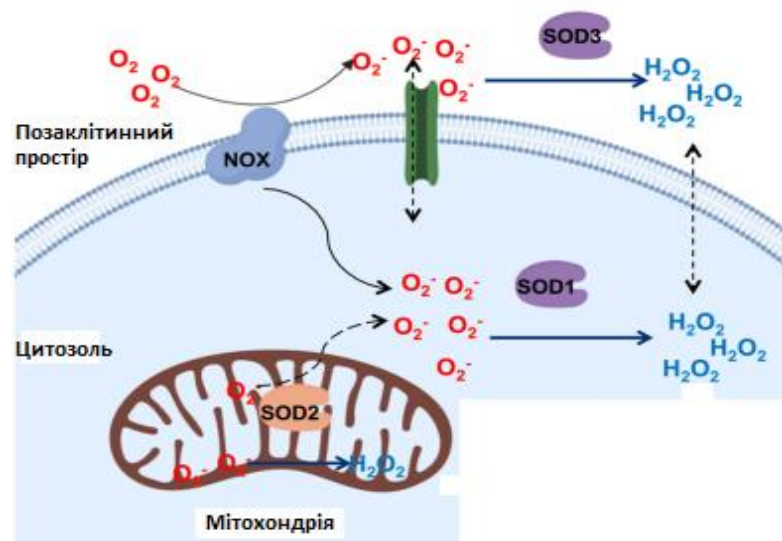


Рис 1.2. Реакції знешкодження супероксидного аніон-радикала, які каталізують різні ізоформи супероксиддисмутази (SOD) [15]

Дві молекули супероксидного аніон-радикала зв'язуються із активним центром ензиму, де містяться іони металів. Перша молекула супероксиду сполучається із $Cu(II+)$, який відновлюється до $Cu(I+)$, при цьому окислюється до молекулярного кисню (O_2). Така реакція порушує зв'язок між $Cu(I+)$ та гістидиновим містком (His 63), що призводить до додаткового протонування His 63. Друга молекула супероксидного аніон-радикала зв'язується із His 63, і в результаті чого, отримує додатковий протон та електрон ($1e^-$), який утворюється в процесі окиснення $Cu(I+)$ до $Cu(II+)$, що призводить до утворення пероксиду водню (H_2O_2). Тобто, супероксиддисмутаза здійснює дисмутацію супероксидного аніон-радикалу до O_2 та H_2O_2 , який також є токсичним для організму [7, 11].

1.2. Будова та функції каталази

Каталази (CAT, EC 1.11.1.6) – це родина ензимів, які присутні у пероксисомах та відіграють важливу роль у антиоксидантному захисті організму, оскільки, здійснюють знешкодження гідроген пероксиду (H_2O_2) [16].

Каталази класифікують на три групи, у залежності від їх структури та функцій:

1. Типові або монофункціональні каталази – найбільша група, яка є гомотетрамерними ензимами та містить чотири простетичні групи. В активному центрі каталази міститься Fe-протопорфірин IX, а саме це гем b, який має схожість із простетичною групою гемоглобіну людини. У деяких джерелах міститься інформація про те, що у деяких типових каталазах наявний гем d [17, 18].

У свою чергу, після філогенетичного аналізу, типові каталази також поділяються на такі три клади:

- Клад 1 – міститься в бактеріальній та рослинній клітинах, які містять малі субодиниці – 55-69 кДа та використовують гем b, як простетичну групу.

- Клад 2 – міститься у бактеріальній та грибовій клітинах, містять великі субодиниці – 75-84 кДа та флаводоксиподібний домен, використовують гем d, як простетичну групу.

- Клад 3 – є найбільшим та найпоширенішим кладом. Сюди відноситься каталаза ссавців та людини. Містять малі субодиниці – 43-75 кДа, гем b - простетична група та NADPH – кофактор [17, 18].

CAT людини включає чотири тотожні субодиниці, молекулярною масою – 62 кДа. Кожна субодиниця містить 4 різні домени та простетичну групу – гем b. Чотири домени містять:

- N – кінцеве плече, яке містить гістидин, який необхідний для каталізу;

- β –діжкоподібний домен, який включає у себе вісім β -діжок, які розташовуються непаралельно з шістьма α -спіральними вставками, які формують гідрофобне ядро протеїну, для створення тривимірної структури ензиму;
- домен зв'язку, який включає в себе залишок тирозину для того, щоб зв'язати гем;
- α -спіральні домени, які необхідні для зв'язування NADPH (рис. 1.3) [17].

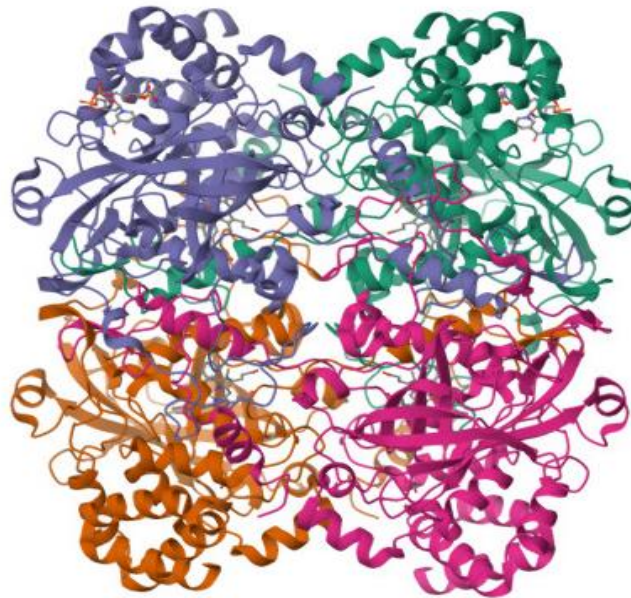


Рис. 1.3. Кристалічна структура типової каталази

2. Біфункціональні каталази – їх відносять у іншу групу, оскільки, такі САТ здійснюють як каталітичну, так і пероксидазну активність. Дана група була виявлена у грибах, бактеріях, на відміну від типових каталаз, є гомодимерами та містять більші субодиниці – 120-340 кДа. Деградація H_2O_2 не така ефективна, як у типових САТ, але ця група має вищу спорідненість із даним субстратом. Спільним є те, що містять гем b [17, 18].

3. Марганцеві каталази або псевдокаталази – містяться тільки у бактеріальних клітинах. Олігомери, в активному центрі наявні дві молекули

Mn, розміром від 170 до 210 кДа. Дана група не містить схожості із гем-каталазами [17, 19].

Останніми роками, дослідження показують, що стабільна активна частина кисню в пероксиді водню (H_2O_2) може функціонувати, як другий месенджер при передачі сигналу, який здатний регулювати деякі фізіологічні шляхи. Проте, вироблення та накопичення великої кількості H_2O_2 є шкідливим для клітини, оскільки, він здатний вступати у реакцію Фентона, де утворюється більш реакційноздатний – гідроксильний радикал (OH^\cdot) та із нітритом (NO_2^-), що призводить до утворення сильного окисника – пероксинітриту (ONOO^-). Тому, необхідно швидко та ефективно знешкоджувати H_2O_2 , щоб запобігти подальшому окисненню та руйнуванню клітин (рис. 1.4) [20, 21].

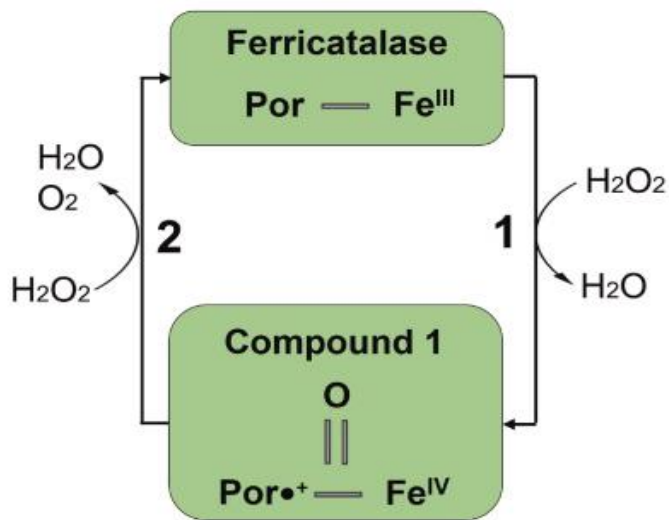


Рис. 1.4. Реакції детоксикації пероксиду водню, які каталізуються каталазою [22]

Ензимна реакція розпочинається з окиснення Fe(III) гемової групи, який розташований у центрі, однією молекулою пероксиду водню (H_2O_2), що призводить до утворення катіонного радикалу – оксоферилпорфірину (сполука I), яка містить Fe(IV) та вивільненню однієї молекули води (H_2O). На другому етапі, друга молекула H_2O_2 здійснює відновлення сполуки I і при цьому вивільняється H_2O та O_2 . (рис. 1.4) [22]

Отже, основна функція CAT у клітинах полягає у розщепленні H_2O_2 до H_2O та O_2 .

1.3. Загальна характеристика відновленого глутатіону

Відновлений глутатіон (GSH) – це важливий внутрішньоклітинний низькомолекулярний трипептид, який складається із цистеїну, L-глутамату та гліцину. Активний центр GSH містить залишок цистеїну – реакційноздатна тіольна група (-SH), яка і проявляє антиоксидантні властивості (рис.1.5) [23, 24].

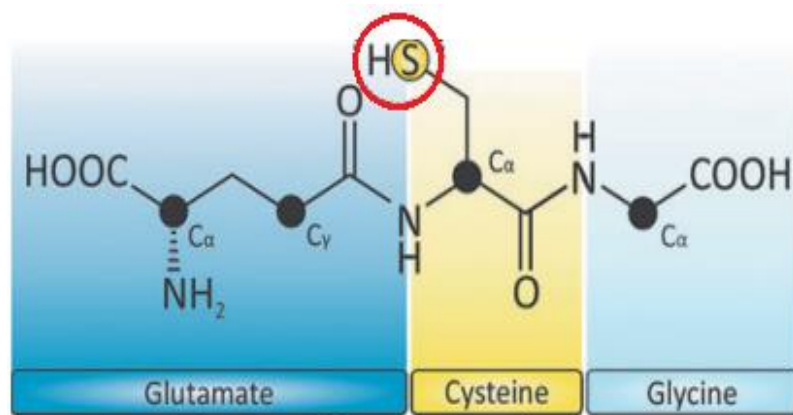


Рис. 1.5. Структурна формула глутатіону [25]

Найчастіше глутатіон зустрічається у відновленій формі (GSH), однак окисний стрес індукує утворення окисленого дисульфіду (GSSG) [26]. 90% глутатіонового пулу локалізується у цитозолі, 10% - у мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі, іноді, виявляється у ядрі [23].

Ензими, які необхідні для біосинтезу глутатіону локалізуються виключно в цитозолі. Синтез GSH включає дві ферментативні реакції, для яких характерно споживання АТФ. Перший етап каталізується ензимом глутаматцистеїнлігазою (GCL, EC 6.3.2.2), яка включає взаємодію глутамату з цистеїном з утворенням γ -глутамілцистеїну. Якщо, синтез глутатіону перешкоджається або повністю заблокований, то γ -глутамілцистеїну може частково замінювати молекулу GSH у реакціях детоксикації. Другий етап каталізується глутатіонсинтетазою (GS, EC 6.3.2.3), де γ -глутамілцистеїн

утворює пептидний зв'язок із гліцином з утворенням трипептиду відновленого глутатіону (рис. 1.6) [25, 27].

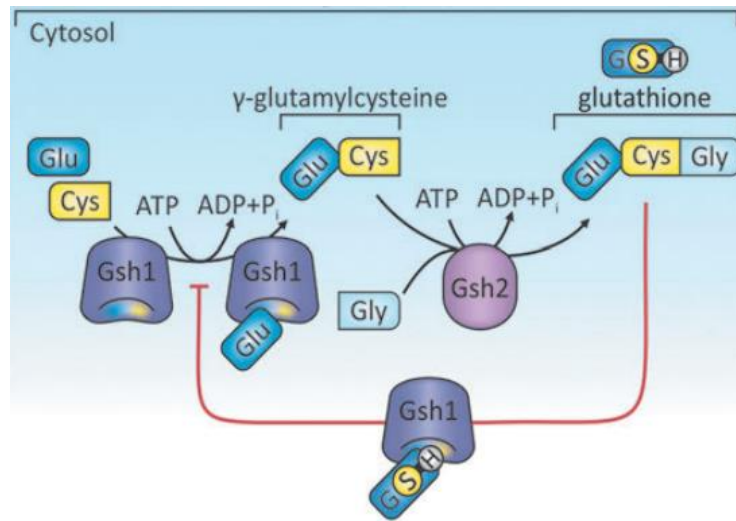


Рис. 1.6. Біосинтез відновленого глутатіону в цитозолі [25]

У свою чергу, мітохондрії самостійно не здатні синтезувати глутатіон, при відсутності ензиму – глутатіонсинтетази, але здатні поглинати його з цитозолу. Щоб досягти мітохондрій, GSH проходить через два шари мембран – зовнішню і внутрішню. Транспорт молекул глутатіону, які менші ~5 кДа забезпечують протеїни зовнішньої мембрани мітохондрій. Оскільки, між зовнішньою і внутрішньою мембраною міститься різний ліпідний склад, то молекули не здатні проникати в мітохондріальний матрикс. Так, як при фізіологічному рН, GSH існує в аніонній формі, то надходження глутатіону у мітохондріальний матрикс, здійснюється транспортерами, які здатні переносити молекули аніонів, що локалізуються на внутрішній мембрані мітохондрій – носій дикарбоксилату і переносник 2-оксоглутарату [28].

Метаболізм GSH. Унікальність структури GSH полягає у тому, що збирання глутамату та цистеїну утворюють не звичну α -карбоксільну групу, а γ -карбоксільну групу, яку більшість ензимів не здатні гідролізувати. Гамма-глутамілтрансфераза (GGT, EC 2.3.2.2) – єдиний ензим, який здатний гідролізувати дану групу, локалізований на поверхні клітини. Ензим відповідає за видалення глутамілового фрагмента з молекули GSH, яка

розпадається на L-глутамат, цистеїнілгліцин або цистингліцину, а потім вивільняється у вигляді глутамату, цистеїну, цистину та гліцину. Утворені амінокислоти або дипептиди поглинаються клітинами для завершення синтезу GSH [28].

Ще останніми роками активно вивчаються нові шляхи метаболізму GSH. Була відкрита родина ChacC, яка здатна розщеплювати молекулу глутатіону, яка локалізована в цитозолі. ChacC1 виявлена в бактеріальних протеїнах VtrG і протеїнах γ -GCT ссавців. ChacC1 здатний гідролізувати GSH, який знаходиться на низькому рівні з утворенням цистеїнілгліцину та 5-оксупроліну. Ще одним членом родини є ChacC2, який міститься в дріжджах, E.coli та людини і функціонування дуже подібне до ChacC1. Метаболізм глутатіону відіграє основну роль у підтримці гомеостазу GSH, переробці та відновленні поживних речовин і передачі сигналу (рис. 1.7) [28].

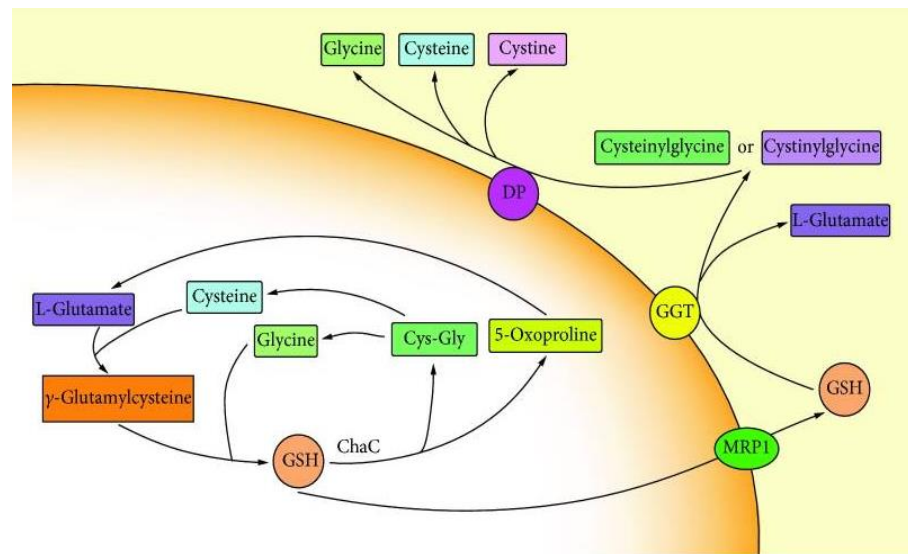
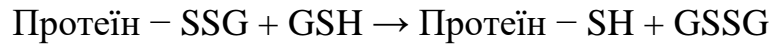


Рис. 1.7. Два шляхи метаболізму глутатіону [28]

У період окисного стресу між залишками цистеїну можуть виникати дисульфідні зв'язки (SSG) і глутатіон може оборотно зв'язуватися із цистеїновими залишками. Тому, запускається процес - S-глутатіонілування, тобто, це механізм, який захищає молекулу цистеїну від незворотного окиснення. Тоді, молекула GSH зв'язується із білковою молекулою, яка

міститься дисульфідний зв'язок, при цьому, відновлюючи -SH групу, але сама молекула GSH окиснюється: [27, 29]



GSH є важливим антиоксидантом у клітині, який використовується як субстрат ензимами глутатіонової системи, і бере участь у детоксикації різноманітних ксенобіотиків та їх продуктів через меркаптуровий шлях; утилізацію гідроген пероксиду (H_2O_2) [27].

Зберігання цистеїну є важливою функцією глутатіону, оскільки, цистеїн надзвичайно нестабільний позаклітинно і здатний швидко самоокислюватися до цистину, який генерує потенційно токсичні вільні радикали кисню [27].

GSH бере участь у модуляції загибелі клітин, а саме, у процесі апоптозу. Різні дослідження з цієї тематики показують, що окисно-відновний потенціал GSH/GSSG є важливим показником апоптозу ракових клітин. Зниження GSH порушує антиоксидантну систему та призводить до збільшення утворення різних активних форм кисню (АФК), що спричиняє пошкодження мітохондрій та індукує апоптоз [27, 28].

1.4. Будова та функції глутатіонпероксидази

Глутатіонпероксидази (GSH-Px, *EC 1.11.1.9*) – це внутрішньоклітинний антиоксидантний ензим, який захищає організм від окисного стресу, знешкоджуючи гідроген пероксид (H_2O_2), гідропероксили ліпідів і органічних гідропероксидів до води або відповідних спиртів, використовуючи, при цьому глутатіон як джерело відновних еквівалентів [30, 31].

Глутатіонпероксидаза - тетрамерний ензим, який складається з чотирьох тотожних сфероподібних субодиниць. Функціонування GSH-Px залежить від того, що у кожній субодиниці міститься по одному атому селену, тому дану групу ензимів відносять до селеноцистеїнових пероксидаз.

На кожному тетрамері розташовані два активних GSH – зв'язувальних центрів (рис. 1.8) [32, 33].

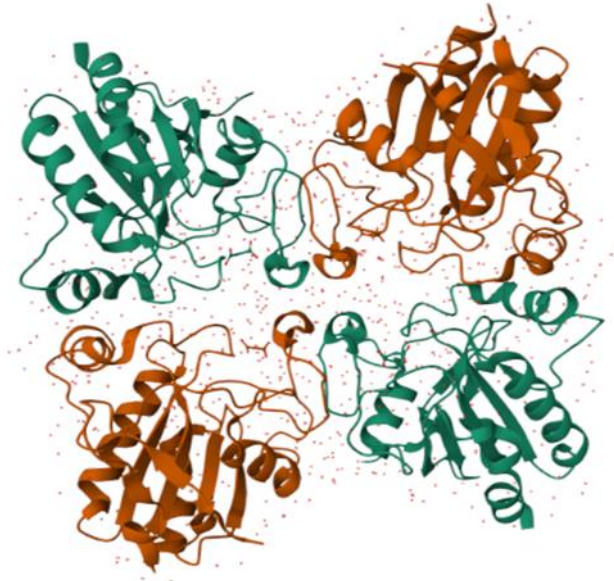


Рис. 1.8. Кристалічна структура глутатіонпероксидази-1

На сьогодні, ідентифіковано 8 ізоформ ензиму (GSH-Px1- GSH-Px8). І, тому, GSH-Px поділяють на 2 типи: селен - залежну та селен - незалежну [32, 34]. Серед усіх ізоформ, наявні 5 селен - залежних GSH-Px: GSH-Px1 – молекулярна маса очищеного GSH-Px1 ссавців становить від 83 до 95 кДа, тетрамер тотожних субодиниць від 22 – 23 кДа, локалізується майже у всіх клітинах організму; GSH-Px2 – локалізується у клітинах шлунково – кишкового тракту; GSH-Px3 – у клітинах нирок, легнях та в позаклітинній рідині; GSH-Px4 – має відмінність у своїй будові, є мономером, здатний нейтралізувати фосфоліпідні гідропероксиди; GSH-Px6 – експресується в нюховому епітелії людей і свиней [33, 34, 35].

Селен – незалежні ізоформи: GSH-Px5 – локалізується в клітинах придатка яєчника. Вважається, що дана ізоформа здійснює захист сперматозоїдів під час дозрівання від надмірної кількості H_2O_2 ; GSH-Px7 – нещодавно відкрита і локалізується в преадипоцитах; GSH-Px8 – мембранний протеїн, який локалізується в ендоплазматичному ретикулумі, присутній в

легенях. Як селен – залежні, так і селен – незалежні GSH-Px є ключовою ланкою в біологічному середовищі [34].

Ензимна детоксикація гідроген пероксиду (H_2O_2), гідропероксиду ліпідів і органічних гідропероксидів включає у себе утворення проміжних стабільних модифікацій активного центру селену, який необхідний для функціонування GSH-Px. Після реакції з різними пероксидними сполуками, селенол (GPx-SeH), який входить до активного центру селену утворює селенову кислоту (Se-OH) (реакція 1). Одна молекула GSH відновлює Se-OH, утворюючи при цьому, проміжний продукт глутатіолованого селенулу (Se-SG) (реакція 2). Друга молекула GSH відновлює зв'язок Se-SG, і призводить до відновлення активного центру ензиму з утворенням окисленого глутатіону (GSSG) та води (H_2O) (рис. 1.9) [35].

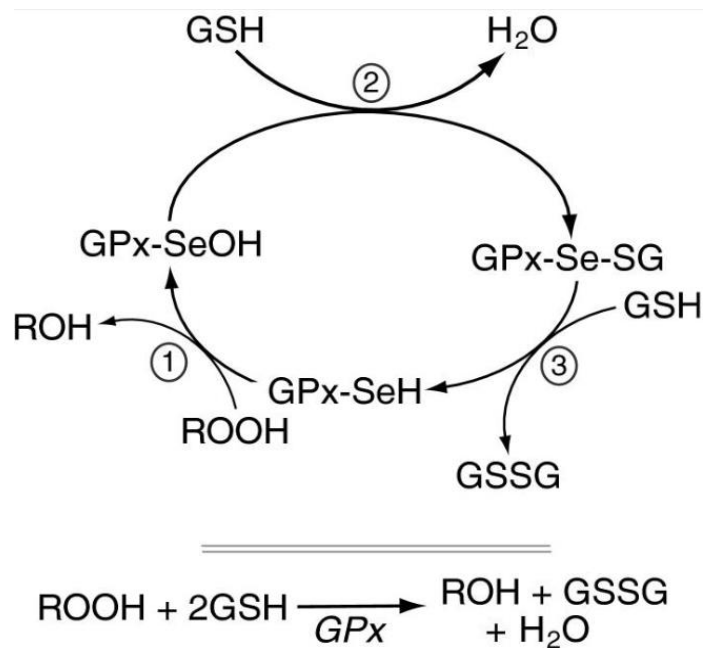


Рис. 1.9. Детоксикація різних пероксидів глутатіонпероксидазою-1 [35]

Отже, GSH-Px1 регулює окисний статус саме через знешкодження гідропероксидів через окиснення двох молекул GSH [35].

1.5. Будова та функції глутатіон-S-трансферази

Глутатіон-S-трансферази (GST, EC 2.5.1.18) – це важлива гетерогенна група ензимів, яка належить до II фази метаболізму ксенобіотиків, які каталізують кон'югацію між ендogenous глутатіоном та гідрофобними сполуками, які призводять до внутрішньоклітинного та позаклітинного пошкодження [36, 37].

Глутатіон-S-трансферази поділяються на три великі суперродини, у залежності від їх локалізації: цитозольні (cGST), мітохондріальні (κGST) та мікросомальні (мембранно-асоційовані протеїни, які задіяні у метаболізмі ейкозаноїдів і глутатіону, і носять назву – MAPEG). Найбільша група – цитозольна, і за амінокислотним складом поділяється на 7 підтипів: α, μ, π, θ, ζ, ω, σ. Мітохондріальні GST носять назву каппа (GSTK), розчинні та мають певну схожість із cGST. MAPEG ніякої ідентичності із cGST та κGST не мають [38, 39].

Цитозольні GST – переважно, димерні ензими, які складаються з ідентичних ланцюгів, але інколи зустрічаються гетеродимери, які містять два різних ланцюга, але з одного класу. Кожен мономер має розмір приблизно 22-25 кДа, і містить два окремих домени: N-кінцевий тіоредоксиноподібний домен та C-кінцевий α-спіральный домен. N-кінцевий домен є висококонсервативним, у якому розташований сайт зв'язування - G-сайт, який відповідає за зв'язування з GSH. У цьому місці знаходяться специфічні амінокислотні залишки, які активують бічний ланцюг тіол - цистеїнілу GSH, зазвичай, за допомогою водневих зв'язків. У різних ізоферментів GST, каталітичні залишки відрізняються: деякі містяться – тирозин, інші – серин або цистеїн. C-кінцевий домен і петля з N-кінцевого домену разом здатні формувати сайт зв'язування - H-сайт, який в основному, складається із неполярних бічних ланцюгів, які здатні зв'язуватися із гідрофобними та електрофільними субстратами (рис. 1.10) [37, 39, 40].

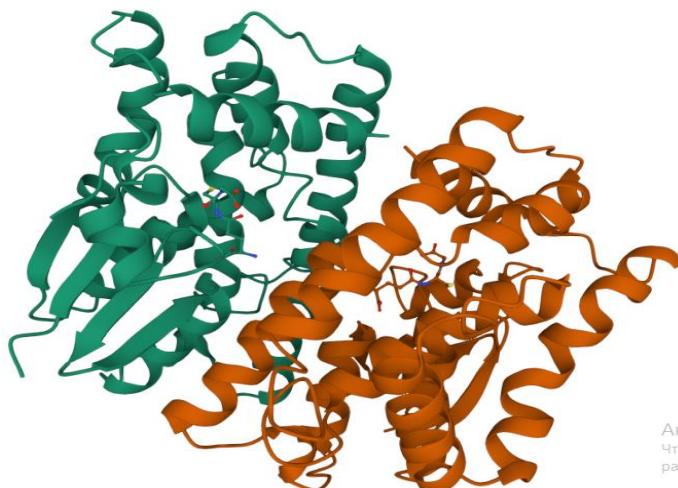


Рис. 1.10. Кристалічна структура глутатіон-S-трансферази

Біотрансформація ксенобіотиків функціонує за рахунок трьох фаз: різні шкідливі молекули здатні проникати через плазматичну мембрану, де і стають головною ціллю для ензимів першої фази (фаза 1) – родини цитохрому Р450, які каталізують реакції окиснення та відновлення. У подальшому метаболізмі 2-ї фази основну роль відіграють ензими - глутатіон-S-трансферази, які каталізують реакцію кон'югації з модифікованими речовинами із 1 фази, з ендogenousним глутатіоном. Утворений кон'югат активно виводиться з клітини за рахунок різноманітних трансмембранних насосів (фаза 3). Інколи, деякі сполуки здатні потрапляти безпосередньо до 2 фази біотрансформації ксенобіотиків (рис. 1.11) [39].

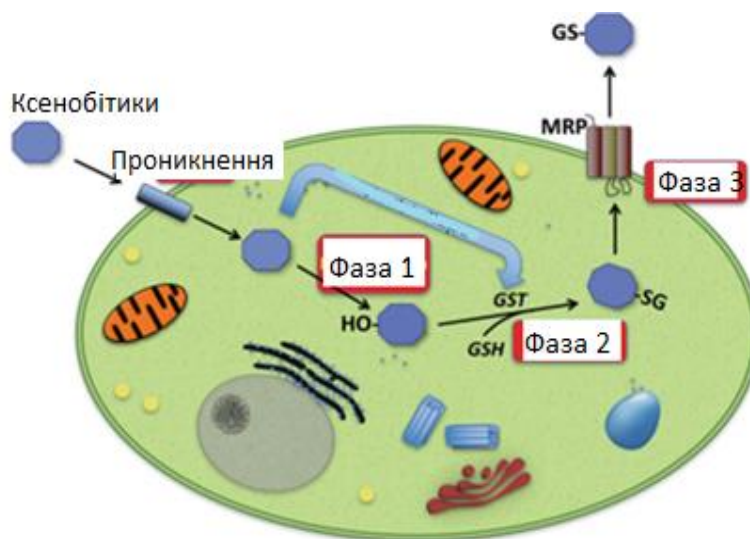


Рис. 1.11. Біотрансформація ксенобіотиків [39]

Глутатіон-S-трансфераза здатна метаболізувати продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за рахунок їх відновлення, приєднуючи до субстрату – відновленого глутатіону, утворюючи при цьому, окислений дисульфід, відповідний спирт та воду: [32]



Кон'югаційна здатність GST відіграє важливу роль у клітинному метаболізмі ксенобіотиків, а також проти окисного стресу [39].

1.6. Загальна характеристика диетилфталату

Синтетичні хімічні речовини - фталати – це складні ефіри фталевої кислоти, які використовуються у промисловості, як розчинники та пластифікатори у виробництві полівінілхлоридів (ПВХ) або інших різноманітних засобів широкого вжитку. Завдяки розширеному споживанню фталати здатні легко мігрувати та накопичуватися в різних біологічних системах: ґрунт, вода, повітря [41]. Оскільки, фталати здатні токсично впливати на живі організми, тому їх поділяють на дві групи в залежності від кількості карбонових атомів в алкільній групі: фталати з вмістом карбону ≤ 6 атомів відносяться до низькомолекулярних та утворюють групу 1; фталати з вмістом карбону > 6 атомів, формують групу 2 - високомолекулярні фталати. Низькомолекулярні фталати із 1-ї групи є більш стабільні та токсичні, ніж фталати із 2-ї групи [2].

Серед фталатів найбільший вплив на людський організм здійснює диетилфталат (ДЕФ), який належить до низькомолекулярної групи фталатів, і відповідно, містить 2 і 4 атоми вуглецю в короткому алкільному ланцюзі (рис.1.12) [42, 43].

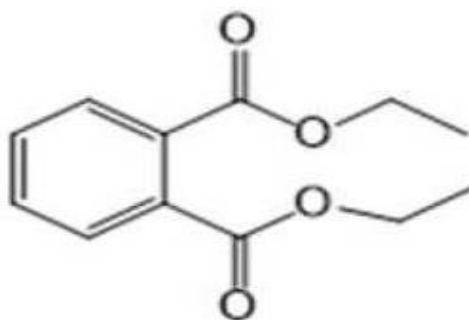


Рис. 1.12. Структурна форма диетилфталату (ДЕФ) [41]

ДЕФ безбарвна масляниста речовина, яка не містить запаху, добре розчинна у воді та здатна забезпечувати пружність, міцність, гнучкість та прозорість, тому додається до безліч різних засобів: продукти особистої гігієни, косметика, парфумерія, промислові матеріали, а особливо, використовується у фармацевтичній та медичній промисловості як допоміжні речовини у покривних оболонках пероральних капсул, до різних трубок та катетерів, зондів, шприців, пакетів для крові та ентерального харчування [2, 44].

ДЕФ здатний нековалентно зв'язуватися із продуктами, і тому легко вивільняється та накопичується в навколишньому середовищі. І найбільший вплив на організми здійснюється перорально, тобто через вдихання, шкірний контакт, а також при споживанні [44].

Після прийому диетилфталату всередину здійснюється його метаболізм у печінці, кишечнику, нирках, крові за рахунок функціонування ензимів - ліпаз та естераз. Оскільки, фталати, у загальному мають короткий період напіврозпаду в людському організмі то приблизно 60% вихідної концентрації виводиться з сечею у вигляді моноєфірних метаболітів – моноетилфталату (МЕФ) (рис. 1.13) протягом 24-х годин. Після метаболізму МЕФ здатний кон'югуватися із глюкуронідом або сульфатом, і у такому вигляді виводиться із сечею [2, 41].

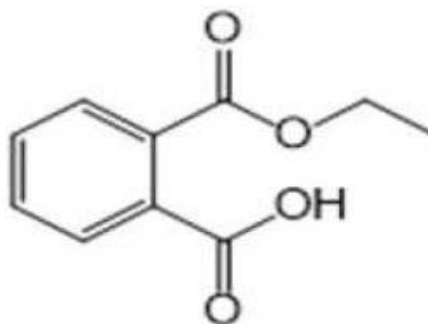


Рис. 1.13. Структурна форма моноетилфталату [41]

Утворений метаболіт МЕФ є біологічно активним, тому і визначає біотоксичні властивості вихідних фталатів, і слугує чутливим біомаркером у сечі, який використовується для оцінки експозиції диетилфталату у людей [2, 45].

Виходячи із різних джерел, фталати, зокрема, диетилфталат володіють токсичними властивостями для організмів, що спричиняють розвиток захворювання репродуктивної, серцево-судинної, бронхолегенової системи, кишково-шлункового тракту, негативно регулюють функцію щитоподібної залози, а також фталати здатні індукувати велику кількість активних форм кисню (АФК) [2, 41].

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи досліджень

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 130-150 г та віком 2,5-3 місяці. Утримання та всі маніпуляції здійснювали згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та VII Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2019 р.).

На початку експерименту тварин розділили на три групи по 18 щурів у кожній групі:

I група – контрольна, до якої увійшли інтактні тварини;

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

III група - щури, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин;

ДЕФ вводили перорально щоденно протягом 21 доби.

Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом на 14 та 21 доби після початку введення ДЕФ. Тварин відважували та в охолоджених умовах відбирали печінку, яку використовували для наступних аналізів.

Виділення мікросомної та цитозольної фракції: печінку відважуємо та гомогенізуємо у буфері 0,25 М сахарози. Отриманий гомогенат профільтруємо через чотири шари марлі. Далі здійснюємо центрифугування при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин – осідають ядра та уламки клітин. Надосадову рідину відбираємо та знову центрифугуємо при 10 500 обертів на хвилину протягом 15 хвилин – осідають мітохондрії. До отриманого супернатанту додаємо по 2,5 мл 80 мМ розчину CaCl_2 та 160 мМ розчину MgCl_2 у 10 мМ трис-НСІ-буфері, рН=7,4. Дані проби перемішуємо протягом 10 хвилин на холоді, і центрифугуємо при 9000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин. Надосадову рідину відбираємо

та використовуємо як цитозольну фракцію, а осад промиваємо 150 мМ трис-НСІ-буфером, рН=8,0 – як мікросомну фракцію [46].

Визначення супероксиддисмутазної активності (SOD, EC 1.15.1.1): принцип методу базується на здатності супероксиддисмутази інгібувати аутоокислення адреналіну.

Для цього у дослідну пробірку додаємо 2,5 мл 0,2 М карбонатного буфера, рН=10,65, 0,01 мл цитозольної фракції та 0,1 мл 0,1% розчину адреналіну. Ретельно перемішували та виміряли величину абсорбції при довжині хвилі 347 нм, кожні 60 секунд протягом 3-х хвилин від початку додавання адреналіну.

Контролем слугував 0,2 М карбонатний буфер, рН=10,65.

Ензиматичну активність SOD виражали в умовних одиницях на 1 хвилину та мг протеїну [46].

Визначення каталазної активності (CAT, EC 1.11.1.6): принцип методу базується на здатності гідроген пероксиду (H_2O_2) з молібдатом амонію утворювати стійкий забарвлений комплекс.

У дослідну пробірку додаємо 200 мкл цитозольної фракції, а у контрольну – 200 мкл 0,1 мл дистильованої води (H_2O). Реакцію розпочинаємо з додаванням по 2 мл 0,03% розчину H_2O_2 у дослідну та контрольну пробірку. Реакцію зупиняємо через 10 хвилин з додаванням 1 мл 4% молібдату амонію.

Контролем слугував 0,05 М трис-НСІ-буфер, рН=7,8.

Утворення забарвленого комплексу оцінюємо спектрофотметрично при довжині хвилі 410 нм.

Ензиматичну активність каталази виражали у мкмоль за хвилину на мг протеїну [47].

Визначення глутатіонпероксидазної активності (GSH-Px, EC 1.11.1.9): принцип методу полягає у визначенні активності GSH-Px за накопиченням окисленого глутатіону.

До складу реакційної суміші входило: 2 мл цитозольної фракції, 3 мл 0,3 М натрій-фосфатного буфера, рН=7,4 та 1 мл 2,5 ммоль/л GSH. Запускала реакцію з додаванням 1 мл 1,8 ммоль/л H_2O_2 . Через дві хвилини реакцію зупиняла з додаванням 1 мл 10% розчину ТХО. Контролем слугував – 0,3 М натрій-фосфатний буфер, рН=7,4. Проби центрифугуємо при 3000 обертів на хвилину протягом 15 хвилин.

Абсорбцію поглинання окисленого глутатіону виміряли при 260 нм.

Коефіцієнт молярної екстинкції для розрахунків використовували - $1144 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ та виражали у ммоль на 1 хвилину та мг протеїну [46].

Визначення глутатіон-S-трансферазної активності (GST, EC 2.5.1.18): принцип методу базується, на тому що, відновлений глутатіон (GSH) здатний взаємодіяти з субстратом 1-хлоро-2,4-динітробензолом (ХДНБ) і визначенні швидкості утворення даних кон'югатів – GSH-ХДНБ.

До складу реакційної суміші входило: 100 мкл супернатанту (мікросомна та цитозольна фракція), 2 мл 0,1 М натрій-фосфатного буфера, рН=6,5.

Запускали реакцію з додаванням 500 мкл 150 ммоль/л розчину ХДНБ та 500 мкл 1 ммоль/л GSH, відразу здійснювали оптичне вимірювання при 340 нм через 0,5; 1,5; 2,5 та 3,5 хвилин.

Для утвореного кон'югату коефіцієнт молярної екстинкції становив - 9,6 для 1 ммоль/л розчину. Ензиматичну активність виражали у ммоль на 1 хвилину та мг протеїну [48].

Визначення вмісту відновленого глутатіону: принцип методу полягає на взаємодії SH-групи GSH з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною

кислотою (реактив Елмана) з утворенням продукту жовтого кольору - тіонітрофенільного аніона.

До складу реакційної суміші входило: 500 мкл цитозольної фракції, 1,8 мл дистильованої H_2O , 1 мл 20% ТХО. Ретельно перемішуємо та залишаємо в холодильнику на 15-20 хвилин, здійснюємо центрифугування при 3000 обертів на хвилину протягом 15 хвилин. Після цього у окремі пробірки відбираємо по 0,5 мл надосадової рідини, 2,5 мл 0,3 М натрій-фосфатного буферу, рН=7,4, 250 мкл реактиву Елмана. У контрольну пробірку вносила по 2,5 мл 0,3 М натрій-фосфатного буферу та 250 мкл метанолу. Ретельно перемішуємо проби.

Оптичне поглинання вимірювали при 412 нм. Використовували коефіцієнт молярної екстинкції для розрахунків використовували - $13,6 \cdot 10^3$ моль⁻¹*см⁻¹. Вміст відновленого GSH в мкмоль на мг протеїну [49].

Визначення вмісту загального протеїну здійснювали за допомогою методу Лоурі [50].

Статистична обробка даних здійснювалася на особистому комп'ютері з допомогою програми Microsoft Excel 2013. Достовірними вважались результати - $P \leq 0,05$, тому використовували t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ініціація окисного стресу – є одним із основних клітинних механізмів на токсичні дії ксенобіотиків, що зрештою, призводить до різних патологічних станів та зсуву дисбалансу в антиоксидантно - прооксидантній системах. Функціонування клітинної системи антиоксидантного захисту регулює концентрацію антиоксидантів, які запобігають токсичному впливу активних форм кисню (АФК) на організм [51]. Одним з таких антиоксидантів є ензим – супероксиддисмутаза (SOD), що формує першу лінію захисту від АФК та каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\bullet-}$) [46].

Результати проведених досліджень показали, що у цитозольній фракції печінки щурів за дії ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин, який вводили протягом 14 діб підвищувалася ензимна активність супероксиддисмутази у 1,3 рази порівняно із показником інтактних тварин (рис. 3.1). Водночас, у тварин, яким ДЕФ вводили у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин протягом 14 діб активність SOD у цитозольній фракції печінки щурів підвищувалася у 1,8 рази порівняно з показниками контролю ($p \leq 0,05$) (рис. 3.1).

Введення ДЕФ, імовірно, призвело до вироблення $O_2^{\bullet-}$, що викликало активацію SOD та дисбаланс прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у клітинах печінки. SOD каталізує дисмутацію супероксидного аніон-радикалу до O_2 та H_2O_2 (шляхом реакцій окиснення та відновлення) [52].

З іншого боку, SOD виступає як фактор транскрипції, що здійснює ініціацію різних важливих антиоксидантних шляхів, які необхідні для захисту клітин від токсичного впливу ДЕФ [52].

Введення ДЕФ, протягом 21-ї доби показало, що у тварин, яким вводили дозу 2,5 мг/кг маси тіла тварин супероксиддисмутазна активність у цитозольній фракції продовжувала підтримуватися на високому рівні та у 1,4 рази переважала показник контрольної групи тварин (рис. 3.1). При введенні

ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин спостерігалось зниження ензиматичної активності SOD у 1,3 рази порівняно з показником інтактних тварин (рис. 3.1).

Зниження ензиматичної активності SOD зумовлено, імовірно, накопиченню великої кількості пероксиду водню (H_2O_2), який вивільняється в ході дисмутації супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\bullet-}$), і є інгібітором, що призводить до інактивації даного ензиму [46, 53].

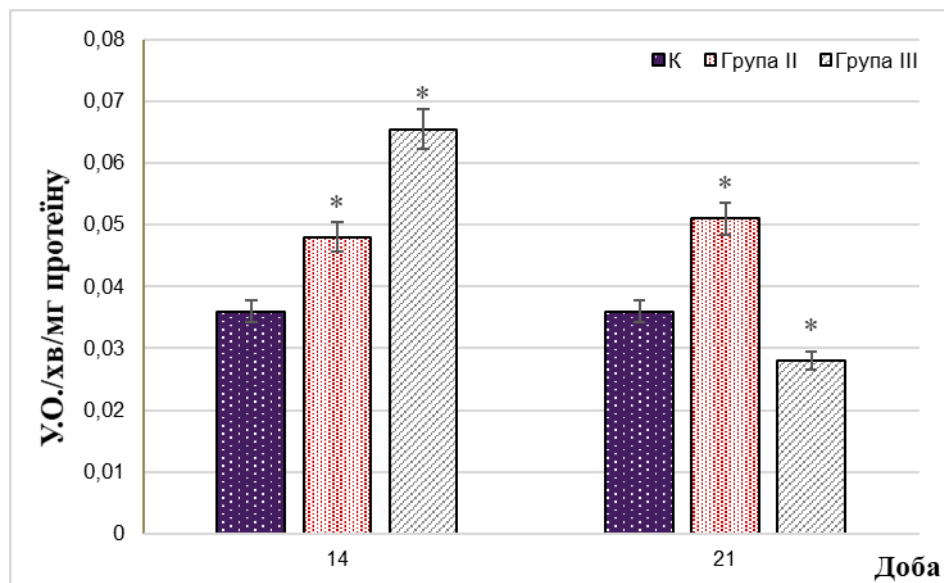


Рис. 3.1. Супероксиддисмутазна активність у цитозольній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

*Примітка (тут і надалі): К – інтактні тварини (контроль); Група II – щурі, яким вводили диетилфталат у дозі 2,5 мг на кг маси тіла тварин; Група III – щурі, яким вводили диетилфталат у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками групи контролю, $p \leq 0,05$.*

На наступному етапі H_2O_2 утилізується каталазами – родина ензимів, які належать до класу оксидоредуктаз та каталізують реакцію знешкодження H_2O_2 з утворенням H_2O та O_2 [4].

Аналіз результатів дослідження показав, що при введенні ДЕФ протягом 14 діб у дозі 2,5 мг/кг та 5,4 мг/кг маси тіла тварин спостерігалось підвищення каталазної активності у цитозольній фракції печінки щурів у 1,3

рази та 1,7 разів відповідно порівняно з показниками інтактних тварин (рис. 3.2).

У результаті чотирнадцятиденного введення, впливає, що ДЕФ сприяє активації САТ – ензиму, який активно функціонує в одному з декількох етапів антиоксидантного захисту організму. Введення ДЕФ, імовірно, призводить до підвищення генерації H_2O_2 в клітинах печінки, що свідчить про активацію даного ензиму. Активна відповідь САТ супроводжується активацією різних компенсаторних механізмів, які необхідні для захисту організму від впливу окисного стресу [4, 54].

Введення ДЕФ протягом 21-ї доби у дозі 2,5 мг/кг маси тіла призводить до того, що ензиматична активність САТ у цитозольній фракції печінки щурів також залишалася на високому рівні та у 1,6 разів перевищувала показник інтактних тварин (рис. 3.2). Водночас, у цитозольній фракції печінки щурів, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин, активність САТ знижувалася у 1,2 рази порівняно з контролем (рис.3.2).

Зниження ензиматичної активності САТ, імовірно, супроводжується зменшеною активністю SOD. Це пояснюється тим, що дані ензими діють синергічно в антиоксидантному захисті організму. З іншої сторони, можлива, інактивація САТ, яка здійснюється власне вільними радикалами, а саме, $O_2^{\bullet-}$. Крім того, зниження ензимної активності САТ може бути викликане дією надмірної кількості H_2O_2 у гепатоцитах, що в свою чергу, також призводить до інактивації ензиму [55].

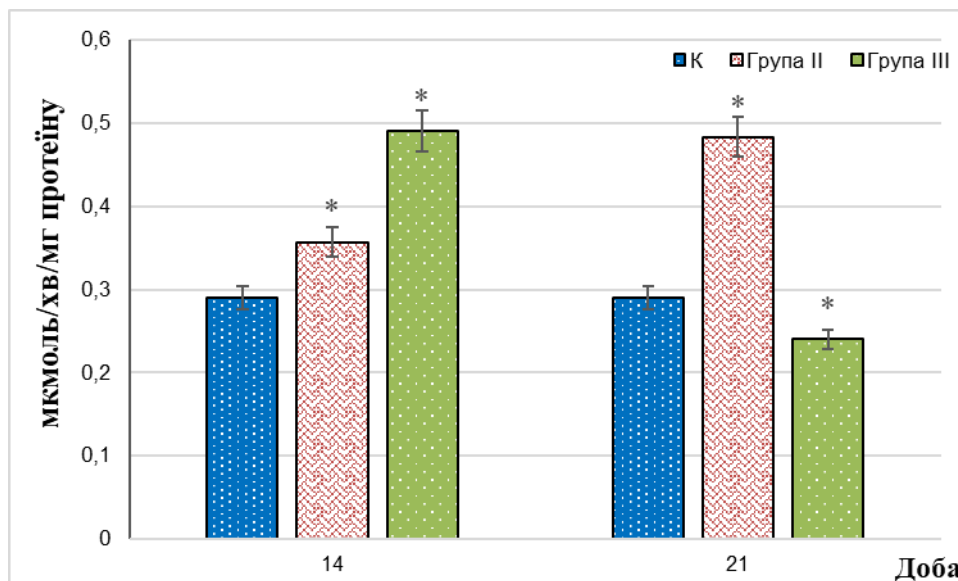


Рис. 3.2. Каталазна активність у цитозольній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Окрім, супероксиддисмутази та каталази антиоксидантними властивостями володіє ензим – глутатіонпероксидаза (GSH-Px), яка бере участь у знешкодженні пероксиду водню, гідропероксидів ліпідів та органічних гідропероксидів до H_2O та спирту. У процесі свого функціонування GSH-Px використовує GSH як кофактор у реакціях детоксикації [30].

Результати проведених досліджень показали, що у цитозольній фракції печінки щурів за дії ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин, який вводили протягом 14 діб підвищувалася ензимна активність глутатіонпероксидази у 1,3 рази порівняно із показником інтактних тварин (рис. 3.3). Водночас, у тварин, яким ДЕФ вводили у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин протягом 14 діб активність GSH-Px у цитозольній фракції печінки щурів підвищувалася у 2,3 рази порівняно з показниками контролю ($p \leq 0,05$) (рис. 3.3).

Підвищення активності глутатіонпероксидази, ймовірно, пов'язане зі збільшенням продукції H_2O_2 в гепатоцитах за умов введення ДЕФ, де H_2O_2 , в основному, метаболізується в цьому органі. Утворений пероксид водню, зі свого боку, активує процеси пероксидації, які призводять до формування

різноманітних гідропероксидів, що трактує підвищення глутатіонпероксидазної активності з подальшою інактивацією H_2O_2 та гідропероксидів ліпідів [46].

Більш тривале введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг не сприяло зниженню ензиматичної активності GSH-Px у цитозольній фракції печінки щурів, оскільки досліджуваний показник у 1,4 разів перевищував показник групи контролю на 21-у добу експерименту (рис. 3.3). Водночас, у цитозольній фракції печінки щурів, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин, активність глутатіонпероксидази знижувалася у 1,3 рази порівняно з показником контрольної групи (рис.3.3).

Зниження глутатіонпероксидазної активності, очевидно, слугує клітинною реакцією на введення ДЕФ, який може посилювати процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що призводить до дисбалансу окисно-відновного стану в клітинах організму [56].

Окрім того, активність GSH-Px прямо пропорційна внутрішньоклітинному вмісту GSH до якого GSH-Px має високу спорідненість [56].

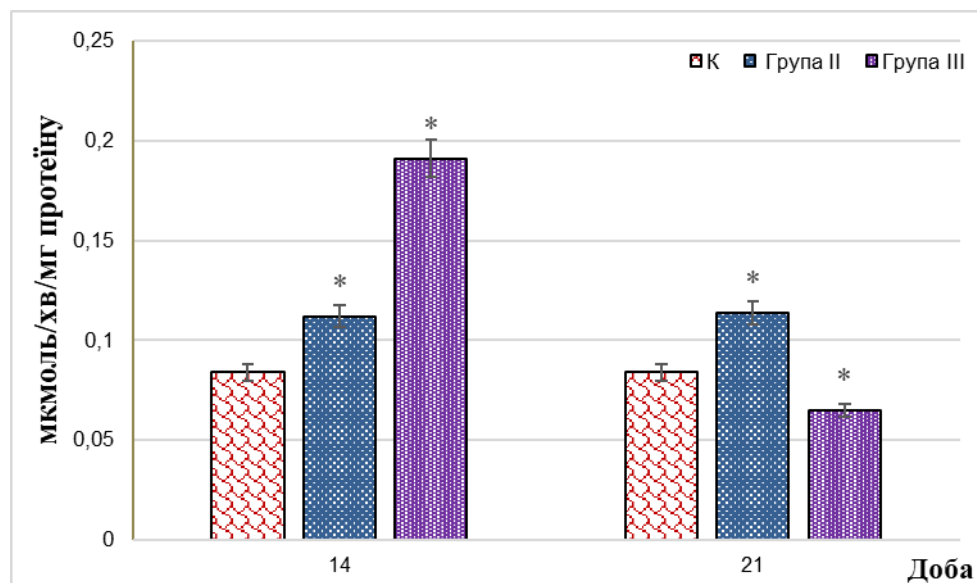


Рис. 3.3. Глутатіонпероксидазна активність у цитозольній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Для перевірки даного припущення за досліджуваних умов нами визначено рівень GSH у цитозольній фракції печінки щурів.

Відновлений глутатіон є важливим внутрішньоклітинним антиоксидантом, який задіяний у багатьох реакціях детоксикації [49].

Аналіз результатів показав, що чотирнадцятиденне введення ДЕФ у дозі 2,5 та 5,4 мг/кг призводило до підвищення концентрації GSH у цитозольній фракції печінки щурів у 1,5 рази та у 1,8 рази порівняно із показником інтактних тварин відповідно (рис.3.4).

Підвищення вмісту GSH є цілком закономірним, оскільки його синтез здійснюється саме в печінці, де він виступає субстратом в реакціях кон'югації із введеним ксенобіотиком, а також для знешкодження H_2O_2 та різних побічних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [49].

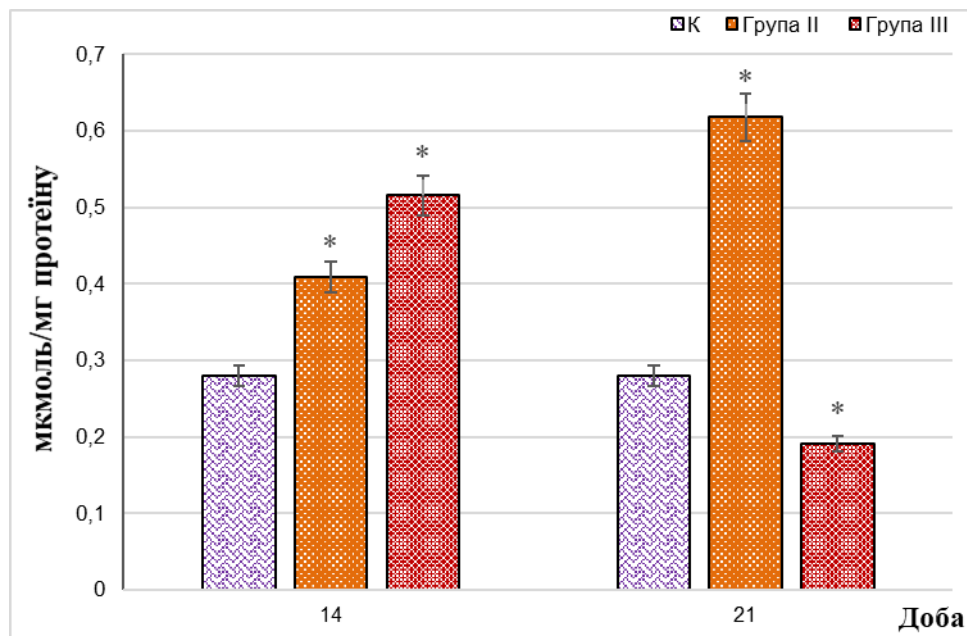


Рис. 3.4. Вміст відновленого глутатіону в цитозольній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Після тритижневого введення ДЕФ вміст GSH у 2,2 рази перевищував показник контролю у цитозольній фракції печінки щурів, яким ДЕФ вводили у дозі 2,5 мг/кг (рис.3.4). При цьому, у цитозольній фракції печінки щурів,

яким ДЕФ вводили у дозі 5,4 мг/кг вміст GSH знижувався у 1,5 рази порівняно з контролем (рис.3.4).

Встановлений факт вказує на те, що тривале надходження ДЕФ в організм виснажує пул GSH у гепатоцитах [49].

Іншою причиною зниження внутрішньоклітинного вмісту GSH може бути інактивуючий вплив ДЕФ на ензими, які беруть участь у реакціях, які підтримують вміст GSH у гепатоцитах [49].

Отже, зниження концентрації GSH у гепатоцитах може бути пов'язане з його використанням у реакціях кон'югації на другому етапі метаболізму ксенобіотиків під дією цитозольних і мікросомних GST [38].

Глутатіон-S-трансфераза є важливим ферментом, який задіяний у II фазі метаболізму токсичних ендогенних та екзогенних речовин. У процесі свого функціонування GST використовує GSH як кофактор у реакціях детоксикації [38].

Результати проведених досліджень показали, що у мікросомній фракції печінки щурів за дії ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин, який вводили протягом 14 діб підвищувалася ферментна активність GST у 1,3 рази порівняно із показником інтактних тварин (рис.3.5). У мікросомній фракції печінки щурів, яким ДЕФ вводили протягом 14 діб у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин активність GST підвищувалася у 1,4 рази порівняно з контролем (рис. 3.5).

Підвищення активності глутатіон-S-трансферази, ймовірно, вважається відповіддю на введення чужорідної для організму речовини, яка є субстратом для кон'югації з глутатіоном, оскільки активується захисний механізм, де фермент функціонує у II фазі метаболізму ксенобіотиків [48].

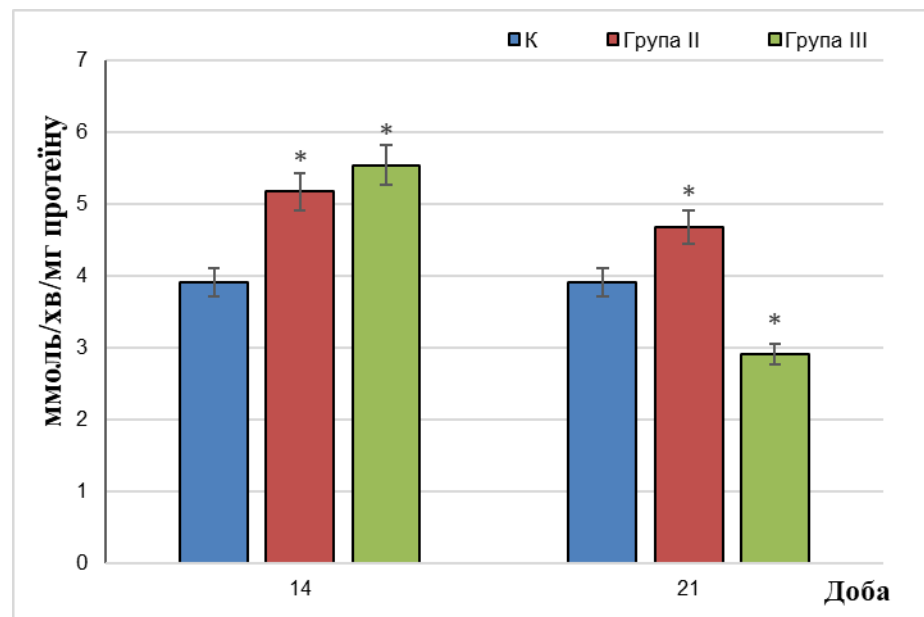


Рис. 3.5. Глутатіонтрансферазна активність у мікросомній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Введення ДЕФ протягом 21-ї доби показало, що у тварин, яким застосовували дозу 2,5 мг/кг маси тіла тварин глутатіонтрансферазна активність у мікросомній фракції залишалася на високому рівні та у 1,2 рази перевищувала показник інтактних тварин (рис. 3.18). За введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин ензимна активність GST знижувалася у 1,3 рази порівняно з показниками контролю (рис. 3.18).

Оскільки, GST та GSH-Px є основними ензимами глутатіонової системи, то їхня дія прямо пропорційна вмісту GSH у клітині, який слугує субстратом для нейтралізації токсичних сполук [57].

Оскільки, GST локалізується і в цитозолі клітин печінки, то нами визначено активність даного ензиму в цитозольній фракції. Результати проведених досліджень показали, що у цитозольній фракції печінки за чотирнадцятиденного введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин глутатіонтрансферазна активність підвищувалася у 1,3 рази порівняно із показником інтактних тварин (рис. 3.6). Подібна тенденція спостерігалася і за введення дози 5,4 мг/кг маси тіла тварин, коли ензимна активність GST у 1,4 рази перевищувала показники контрольної групи щурів (рис. 3.6).

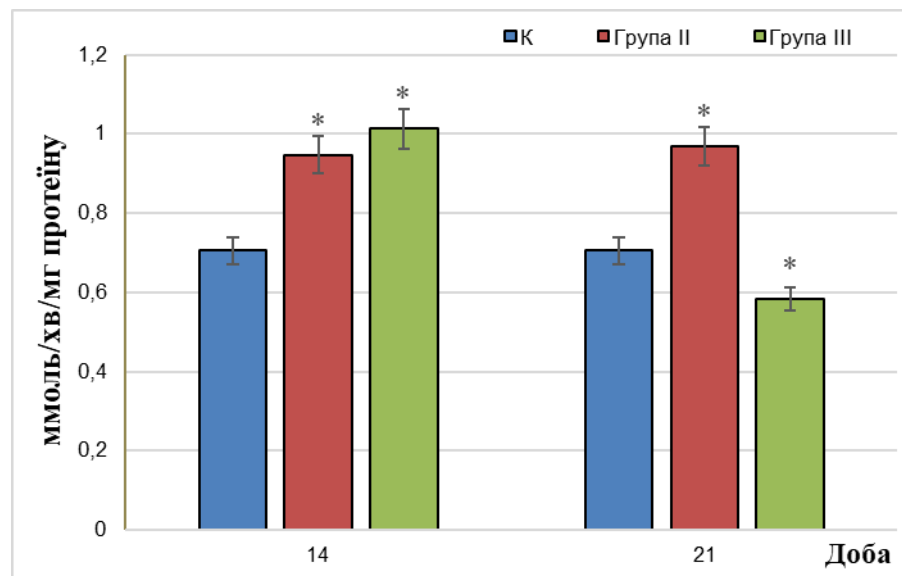


Рис. 3.6. Глутатіонтрансферазна активність у цитозольній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

На 21-шу добу після початку введення ДЕФ виявлена протилежна тенденція щодо ензимної активності GST за дії різних доз ксенобіотика. Так, за умов впливу ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин ензимна активність GST підвищувалася у 1,4 рази, тоді як за дії ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг – знижувалася у 1,2 рази в порівняно з показниками контролю (рис. 3.6).

Отже, як у мікросомній, так і в цитозольній фракціях печінки щурів спостерігали однакову тенденцію зміни активності глутатіон-S-трансфери: за умови 14-денного введення ДЕФ активність ензиму зростала під впливом обох досліджуваних доз; 21-денне введення призводило до зниження ензимної активності GST при вищих дозах ДЕФ. Таке зниження може бути зумовлене, з одного боку, зменшенням пулу ендogenous GSH, а з іншого – може бути у результаті вільнорадикального окиснення GST [48, 57]

ВИСНОВКИ

1. Виявлено підвищення ензимних активностей SOD та CAT при введенні різних доз ДЕФ протягом 14-и діб. На подальших етапах експерименту за умов введення дози 2,5 мг/кг супероксиддисмутаза й каталазна активності залишаються вищими за показники контролю, а за умов введення дози 5,4 мг/кг досліджувані показники знижуються порівняно з показниками інтактних тварин.
2. Чотирнадцятиденне введення різних доз ДЕФ призводить до підвищення глутатіонпероксидазної активності порівняно з показником інтактних тварин. Водночас, введення високих доз ДЕФ протягом 21-ї доби супроводжується зменшенням ензимної активності GSH-Px в порівнянні із показниками контрольної групи.
3. Підвищення рівня відновленого глутатіону спостерігається на 14-у добу введення ДЕФ незалежно від дози введення. На 21-шу добу експерименту виявлено зниження вмісту відновленого глутатіону порівняно з контролем лише у групи тварин, яким вводили високі дози досліджуваного ксенобіотика.
4. При введенні різних доз ДЕФ протягом 14 діб спостерігається підвищення ензимної активності мікросомної та цитозольної GST, з наступним зниженням активності цього ензиму на 21-шу добу експерименту в групі тварин, яким вводили ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг.