

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

**Біохімічні маркери функціонального стану нирок в сироватці
крові щурів за дії диетилфталату**

Виконала:

**студентка 4 курсу, 400 А групи
спеціальності 091 Біологія**

Любов ПРОДАНЧУК

Науковий керівник:

к.б.н., доцент Кеца О.В

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

Чернівці – 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню впливу діетилфталату (ДЕФ) на функціональний стан нирок щурів. Метою дослідження було проаналізувати зміни рівнів традиційних біохімічних маркерів – креатиніну та сечовини – у зразках сироватки крові лабораторних тварин при впливі ДЕФ у різних концентраціях протягом 14 і 21 днів. У ході експерименту щури отримували ДЕФ перорально у дозах 2,5 та 5,4 міліграма на кілограм маси тіла, що відповідають середньому та максимальному рівню добового надходження речовини до організму людини. Біохімічні показники визначали за допомогою колориметричних методів. Отримані результати свідчать про статистично достовірне підвищення рівнів креатиніну та сечовини в дослідних групах, що є ознакою порушення клубочкової фільтрації та каналцевого транспорту. Виявлено виражену дозо- та часозалежну нефротоксичну дію ДЕФ. Отримані результати свідчать, що навіть короткотривалий вплив фталатів у низьких дозах призводить до функціональних порушень нирок, що реалізуються через механізми окислювального стресу та деструкції клітинного метаболізму.

Ключові слова: діетилфталат, фталати, нефротоксичність, креатинін, сечовина, біохімічні маркери, клубочкова фільтрація, сироватка крові, ниркова недостатність, щури.

ABSTRACT

The present bachelor's thesis investigates the effects of diethyl phthalate (DEP) on the functional state of rat kidneys. The aim of the study was to evaluate alterations in the levels of conventional biochemical markers — creatinine and urea — in blood serum samples of laboratory rats following exposure to DEP at different concentrations over 14 and 21 days. DEP was administered orally at doses of 2.5 and 5.4 mg/kg body weight, which correspond to the average and maximum estimated daily intake levels for humans. Biochemical parameters were assessed using standard colorimetric methods. The obtained data revealed a statistically significant increase in serum creatinine and urea levels in the experimental groups, indicating impaired glomerular filtration and tubular transport. A pronounced dose- and time-dependent nephrotoxic effect of DEP was observed. These findings suggest that even short-term exposure to low doses of phthalates may result in functional kidney impairment, mediated by mechanisms involving oxidative stress and disruption of cellular metabolism.

Keywords: diethyl phthalate, phthalates, nephrotoxicity, creatinine, urea, biochemical markers, glomerular filtration, blood serum, renal dysfunction, rats.

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

_____ **Л.Г.Проданчук**
(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1 Особливості функціонування нирок	7
1.2. Загальна характеристика маркерів функціонального стану нирок	10
1.2.1 Механізми утворення креатиніну	12
1.2.2 Сечовина як маркер порушення нирок	14
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
2.1 Об'єкти та методи досліджень	23
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	28
ВИСНОВКИ	33
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	34
ДОДАТКИ	37

ВСТУП

Діетилфталат (ДЕФ) є одним із представників фталатів – складних ефірів фталевої кислоти, які широко застосовуються у виробництві пластмас, косметичних засобів, фармацевтичних препаратів та інших споживчих товарів. Завдяки своїм пластифікуючим властивостям, ДЕФ використовується для покращення гнучкості, прозорості та міцності матеріалів. Проте, незважаючи на його широку промислову та побутову застосовність, дедалі більше досліджень вказують на потенційну токсичність фталатів для різних органів і систем організму, зокрема нирок. Нирки є критично важливим органом для підтримання гомеостазу організму, здійснення фільтрації крові, виведення продуктів метаболізму та детоксикації шкідливих речовин.

Основними біохімічними маркерами, які вказують на пошкодження нирок є креатинін - кінцевий продукт метаболізму креатину в м'язовій тканині та сечовина, яка утворюється в результаті білкового метаболізму. Обидва метаболіти виводяться нирками шляхом клубочкової фільтрації. Підвищені рівні даних показників у сироватці крові свідчать про погіршення роботи нирок, що робить їх важливими біохімічними маркерами для оцінки функціонального стану цього органу.

Мета роботи – оцінити маркери функціонального стану нирок щурів у зразках сироватки крові за умови введення різних концентрацій фталатів.

Для реалізації мети були визначені такі завдання:

1. Визначити рівень креатиніну в біологічному зразку крові щурів під час впливу діетилфталату.
2. Визначити концентрацію сечовини в сироватці крові щурів під впливом діетилфталату.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Особливості функціонування нирок

Нирки – це парні органи, які забезпечують виведення з організму продуктів обміну речовин та підтримання внутрішнього середовища. Основними функціями нирок є фільтрація крові, реабсорбція, секреція, регуляція кислотно-лужного балансу та синтез реніну, еритропоєтину, активації вітаміну D. Нирки підтримують гідроелектролітичний баланс організму, оскільки вони врівноважують вихідні та вхідні речовини. Вони виводять токсини, що утворюються в результаті клітинного або ксенобіотичного метаболізму, регулюють гомеостаз внутрішнього середовища та відіграють гормональну роль, виробляючи еритропоєтин, кальцитріол та ренін [11].

Підтримка гомеостазу організму (водного, іонного або кислотно-лужного балансу) вимагає послідовної дії плазмової фільтрації, а потім механізмів реабсорбції/секреції, які відбуваються в різних частинах функціональної одиниці нирки, відомій як нефрон. Початкова частина нефрона, клубочок, є місцем фільтрації, тоді як каналець, який збирає клубочковий фільтрат, є місцем реабсорбції/секреції, що призводить до формування кінцевої сечі. Будь-яке порушення цієї глобальної функції призводить до фізіологічних розладів різного ступеня тяжкості, які можуть впливати на функції всіх органів і тканин організму [21].

Нирковий клубочок – це дуже спеціалізована структура, яка функціонує як фільтратор крові та утримує необхідні білки плазми. Гломерулярний фільтр складається з трьох основних типів клітин, які виконують колективну функцію селективної ультрафільтрації плазми крові: фенестрованого ендотелію, проміжної клубочкової базальної мембрани та епітеліальних подоцитів. Ця тришарова структура сприяє потоку води в плазмі та малих розчинених речовин, водночас обмежуючи потік великих білків плазми, таких як альбумін.

Наявність високої кількості альбуміну в сечі свідчить про дефект одного або всіх шарів клубочкового фільтраційного бар'єру [1].

Середня людська нирка складається приблизно з 1 мільйона окремих функціонуючих нефронів, кожен з яких містить один клубочок або фільтрувальну одиницю. Об'єм клубочкової фільтрації визначається як швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ), а загальна ШКФ є сумою всіх ШКФ окремих нефронів. ШКФ для всього організму тоді є сумою індивідуальних швидкостей фільтрації приблизно 2 мільйонів клубочків у двох нирках. Можуть бути значні відмінності в розмірі та швидкостях фільтрації окремих клубочків у різних ділянках нирки. Розподіл внутрішньониркового кровотоку варіюється у фізіологічних та патологічних ситуаціях, і це також може впливати на загальну ШКФ для організму [22].

Кисотно-лужний гомеостаз та регуляція рН мають вирішальне значення як для нормальної фізіології, так і для метаболізму та функціонування клітин. Важливість цієї регуляції підтверджується різноманітними фізіологічними порушеннями, що виникають при високому або низькому рН плазми. Нирки відіграють переважну роль у регуляції системної концентрації бікарбонату, а отже, і метаболічного компонента кисотно-лужного балансу. Ця функція нирок має два компоненти: реабсорбцію практично всієї фільтрованої HCO_3^- та виробництво нового бікарбонату для заміни того, що споживається нормальними або патологічними кислотами. Це виробництво або генерація нової HCO_3^- здійснюється шляхом чистої екскреції кислоти. За нормальних умов приблизно від однієї третини до половини чистої екскреції кислоти нирками відбувається у формі титрової кислоти. Інша половина - це екскреція амонію. Здатність виводити амоній в умовах кислого навантаження кількісно набагато більша, ніж здатність збільшувати титрову кислоту. Існує кілька, часто надлишкових шляхів та процесів для регуляції цих функцій нирок. Однак порушення кисотно-лужного гомеостазу є поширеними в клінічній

медицині та часто можуть бути пов'язані з системами, що беруть участь у кислоотно-лужному транспорті в нирках [6].

Нирки також відповідають за регуляцію артеріального тиску через систему ренін-ангіотензин-альдостерон, а також продукують еритропоетин, який стимулює утворення еритроцитів, і активують вітамін D, що впливає на обмін кальцію та фосфору.

Доставка кисню до нирок залежить від концентрації гемоглобіну. Як тільки концентрація гемоглобіну знижується, перичити відчують гіпоксію та продукують еритропоетин. Еритропоетин – це незамінний глікопротеїновий гормон, який виробляється інтерстиціальними фібробластами нирок і контролює кровотворення шляхом сприяння виживанню, проліферації та диференціації еритроїдних клітин-попередників. Епо найбільш відомий завдяки своїм рекомбінантним білковим спорідненостям, які широко використовуються для лікування анемії у пацієнтів на діалізі. Отже, падіння рівня гемоглобіну та подальша тканинна гіпоксія є прототипним стимулом для експресії Епо. Оскільки Епо не накопичується та має відносно короткий період напіввиведення, рівні циркулюючого Епо тісно пов'язані з експресією Епо в інтерстиціальних фібробластах.

Ренін – це білок, який вивільняється клітинами нирок і опосередковано діє на артеріальний тиск. Ренін є ключовим регулятором ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, а рівень реніну в плазмі відображає загальну активність цієї системи. Циркулююча активна форма реніну розщеплює ангіотензиноген, утворюючи ангіотензин I. Оскільки ангіотензиноген є дуже поширеним (його концентрація в 1000 разів вища, ніж у ангіотензину I), саме активність реніну в плазмі визначає швидкість утворення ангіотензину I. Ренін, що циркулює, секретується юкстагломерулярними клітинами (також званими гранулярними клітинами або JGA-клітинами) – унікальними круглими клітинами епітеліоїдного вигляду, що містять міофіламенти та рясні пероксисоми. Хоча за фізіологічних умов юкстагломерулярні клітини розташовані лише на зовнішньому краю ниркового інтерстицію (у

юкстагломерулярному інтерстиції, на стінках аферентних артеріол безпосередньо біля входу в клубочки), додаткові клітини, що продукують ренін, залучаються екстрамурально в інтерстиції. Вивільнення реніну юкстагломерулярними клітинами регулюється такими гормонами, як передсердний натрійуретичний пептид та ангіотензин II, а також місцевими факторами, що сприяють сусіднім канальцевим епітеліальним клітинам, клітинам гладких м'язів судин та ендотеліальним клітинам з аферентних артеріол, а також симпатичними нервовими закінченнями. За фізіологічних умов секреція та активація прореніну юкстагломерулярними клітинами достатні для підтримки ШКФ [28].

1.2. Загальна характеристика маркерів функціонального стану нирок

Дослідження функції нирок корисні для виявлення наявності захворювання нирок, моніторингу реакції нирок на лікування та визначення прогресування захворювання нирок. За допомогою клінічних лабораторних маркерів можна дослідити та оцінити функцію нирок.

Біохімічні маркери - це сполуки, концентрація яких у сироватці крові або сечі змінюється залежно від ступеня ураження ниркової тканини. Вони поділяються на: традиційні маркери це креатинін, сечовина, розрахована швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) та сучасні маркери раннього ушкодження: NGAL (нейтрофільний желатиназозв'язувальний ліпокалін), KIM-1 (молекула ушкодження канальців нирки типу 1), цистатин С, β 2-мікроглобулін.

Найкращим загальним показником клубочкової функції є швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ). ШКФ – це швидкість у мілілітрах за хвилину, з якою речовини в плазмі фільтруються через клубочки; іншими словами, кліренс речовини з крові. Нормальна ШКФ для дорослої людини становить від

90 до 120 мл/хв. Однак це число значно варіюється залежно від віку. Деякі дослідження показують зниження на 7,5 мл/хв/1,73 м² після 30 років через процеси старіння. Таким чином, здорова 70-річна людина може мати ШКФ 60 мл/хв/1,73 м².

Характеристики ідеального маркера ШКФ такі: він повинен ендогенно з'являтися в плазмі з постійною швидкістю, вільно фільтруватися в клубочках, не повинен ні реабсорбуватися, ні секретуватися нирковими канальцями, не повинен піддаватися екстрауренальному виведенню.

Оскільки наразі такого ендогенного маркера не існує, використовуються екзогенні маркери ШКФ. Оцінка ШКФ за допомогою інуліну, полісахариду, вважається еталонним методом для оцінки ШКФ. Цей метод включає інфузію інуліну, а потім вимірювання рівня в крові через певний період для визначення швидкості кліренсу інуліну. Іншими екзогенними маркерами, що використовуються, є радіоізотопи, такі як хром-51 етилендіамінтетраоцтова кислота (51 Cr-ЕДТА) та мічена технецієм-99 діетилентриамінпентаоцтова кислота (99 Tc-DTPA). Незручності, пов'язані з використанням екзогенних маркерів, зокрема те, що тестування має проводитися у спеціалізованих центрах, які мають можливість аналізувати ці речовини, спонукали до використання ендогенних маркерів.

У сучасній літературі також активно вивчаються нові маркери, а саме NGAL, KIM-1, Цистатин С, які дозволяють виявляти ушкодження ще до розвитку клінічно значущих змін у традиційних показниках. Зокрема, NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) є дуже раннім маркером ушкодження канальців нирок. Його рівень у крові та сечі підвищується вже через кілька годин після токсичного або ішемічного ураження. KIM-1 (kidney injury molecule-1) – трансмембранний білок, який з'являється на поверхні ушкоджених проксимальних канальців, і має високу специфічність для токсичних уражень. Цистатин С – низькомолекулярний білок, який постійно виробляється клітинами організму, вільно фільтрується в клубочках, не реабсорбується й не секретується, тому є точним маркером ШКФ незалежно

від статі та м'язової маси. Ці нові маркери дають можливість значно раніше виявляти початкові зміни у функції нирок.

Однак, незважаючи на перспективність сучасних методів, у більшості практичних і наукових досліджень головними залишаються саме креатинін та сечовина, оскільки ці маркери мають усталену діагностичну значущість, доступні для вимірювання, а їх зміни корелюють із розвитком ниркової недостатності.

Найпоширенішим ендогенним маркером для оцінки клубочкової функції є креатинін, оскільки його рівень у крові прямо корелює зі зниженням клубочкової фільтрації. Сечовина є менш специфічним показником, однак також широко використовується для оцінки ниркової функції [27].

1.2.1 Механізми утворення креатиніну

Креатинін – це неферментативний продукт метаболізму креатину та фосфокреатину, який за нормальних умов виробляється з постійною швидкістю з тканини скелетних м'язів (близько 2% на день від загального пулу креатину). Він постійно виводиться з організму залежно від маси білка та м'язового метаболізму. Нирки очищають кров, фільтруючи її вміст, і він потрапляє в сечу. Креатинін – один із метаболітів, що виводяться з організму внаслідок функції нирок. Його рівень в організмі можна перевірити за допомогою аналізу крові, і високий рівень визначає порушення функції нирок. Білок і м'язова маса також є визначальними факторами вмісту креатиніну в організмі людини; отже, чоловіки мають відносно вищу м'язову масу і зазвичай містять вищий рівень креатиніну, ніж жінки та діти. Він не реабсорбується, а секретується проксимальними канальцями у змінному відсотку, який збільшується в міру прогресування ниркової недостатності, що визначає, що кліренс креатиніну завищує реальне значення ШКФ і що ця ситуація посилюється в міру прогресування ниркової недостатності. За нормальних умов екстраренальна екскреція креатиніну мінімальна. [9]

Креатин надходить з двох основних джерел: 50% екзогенний, з їжі, фосфат-креатин і 50% ендогенний, з яких лише 2% перетворюється на креатинін. Понад 80% креатиніну фільтрується та секретується в нирках. Решта 20% виводиться через кишкову мікробіоту. Основна роль креатину полягає у зв'язуванні з неорганічним фосфатом у клітині з утворенням фосфокреатину, і таким чином він служить високоенергетичним джерелом енергії на основі фосфатів для ресинтезу аденозинтрифосфату (АТФ), який розщеплюється до аденозиндифосфату (АДФ) + неорганічний фосфат, як джерела енергії для клітинного метаболізму. [10]

Перетворення креатину на креатинін залежить від рН та температури; цей процес відбувається з постійною швидкістю (1% креатину в організмі та 2,6% фосфокреатину на день перетворюється на креатинін). (рис.1.1)

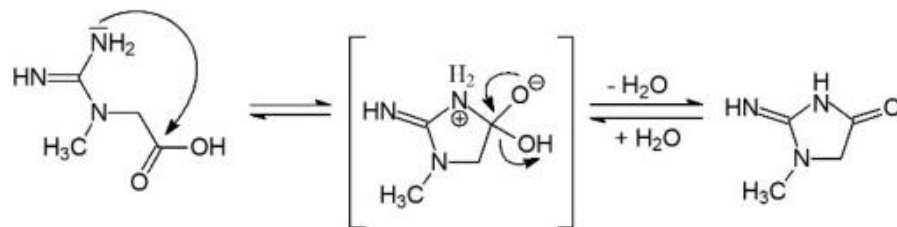


Рисунок 1.1. Перетворення креатину на креатинін

Деградація креатину може бути обмеженою або взагалі не відбуватися в середовищах з дуже низьким або дуже високим рН. рН вище 12,1 сприяє депротонуванню кислотної групи, що перешкоджає внутрішньомолекулярній циклізації з утворенням креатиніну. І навпаки, коли рН нижче 2,5, амідна функціональна група молекули креатину протонується, що також запобігає внутрішньомолекулярній циклізації. [23]

Використання креатиніну сироватки крові для розрахунку розрахункової швидкості клубочкової фільтрації (рШКФ) є життєво важливим інструментом у класифікації стадій хронічної хвороби нирок (ХХН) і вимагає правильного вимірювання. [3]

Через складний метаболізм креатиніну, вимірювання ШКФ має різні обмеження. Одним з основних обмежень є те, що зміни м'язової маси, такі як у пацієнтів із хронічними захворюваннями, недоїданням або похилим віком, призводять до завищення ШКФ. Також важливо зазначити, що всі формули для розрахунку ШКФ не враховують інші поширені фактори, такі як споживання вареного червоного м'яса та вплив деяких ліків.

Креатинін може зберігати свою корисність у звичайних клінічних сценаріях. Наприклад, у осіб зі стабільною функцією нирок та без супутніх факторів, таких як нещодавні зміни м'язової маси або втручання ліків, вимірювання креатиніну все ще може служити надійним маркером функції нирок. Отже, креатинін це важливий показник роботи нирок і стану обміну речовин в організмі.

1.2.2 Сечовина як маркер порушення нирок

Сечовина є основним кінцевим продуктом білкового метаболізму, який синтезується через орнітиновий цикл у печінці та виводиться переважно нирками.

Орнітиновий цикл (відомий також як цикл сечовини або цикл Кребса) забезпечує детоксикацію амоніаку – токсичного продукту, що утворюється внаслідок дезамінування амінокислот. Цей процес відбувається в печінці, де аміак (NH_3) трансформується у нетоксичну сполуку – сечовину.

Цикл включає два основні етапи: синтез аргініну та його подальший гідроліз із утворенням сечовини й орнітину. На першій стадії аміак, вуглекислий газ і неорганічний фосфат, за участі ферменту карбамоїлфосфатсинтетази, вступають у реакцію з утворенням карбамоїлфосфату. Далі карбамоїлфосфат взаємодіє з орнітином, утворюючи цитрулін і вивільнюючи неорганічний фосфат; цей етап каталізується орнітинкарбамоїлтрансферазою. Після цього цитрулін реагує з аспарагіною

кислотою з утворенням аргінінобурштинової кислоти – реакцію каталізує аргініносукцинатсинтетаза. Отриманий продукт під дією ферменту аргініносукцинатліази розщеплюється на аргінін і фумарат. Таким чином завершується перша фаза циклу. На другому етапі аргінін під дією ферменту аргінази гідролізується з утворенням сечовини та орнітину. (рис.1.2) [2].

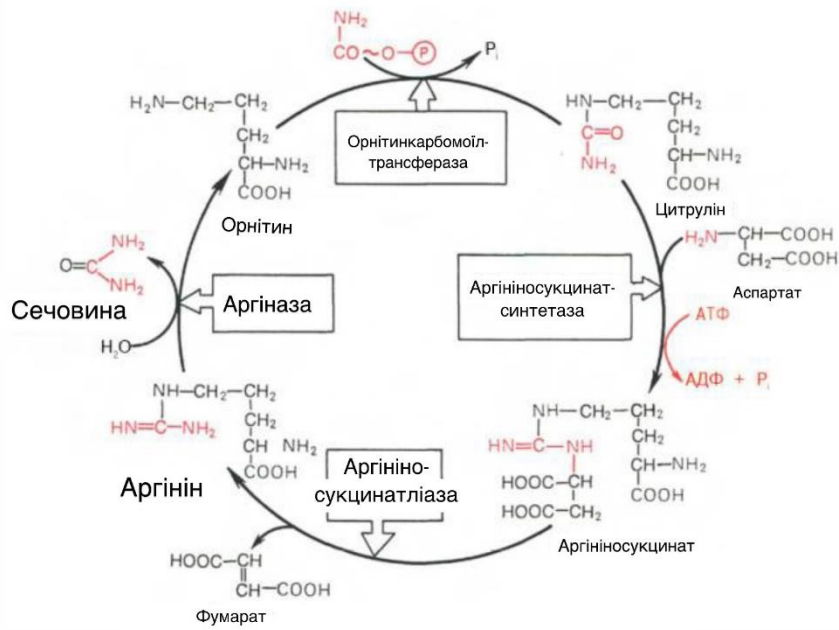


Рисунок 1.2. Схема орнітинового циклу

Концентрація сечовини в сироватці крові головним чином залежить від білка, споживаного організмом, гідrataції організму та функції печінки та нирок. Тому за концентрацією сечовини в сироватці крові можна прослідкувати функцію нирок. [19]

Підвищені концентрації сечовини сприяють виробленню активних форм кисню. Нещодавні експерименти *in vitro* підтвердили, що висока концентрація сечовини сама по собі може призвести до ендотеліальної дисфункції та активації проатеросклеротичного шляху. [20]

Пряма токсичність сечовини, ймовірно, проявляється через активацію прозапальних білків та підвищений оксидативний стрес, що призводить до збільшення експресії проапоптотичних генів, рівня вільних радикалів та старіння. З іншого боку, непряма токсичність сечовини проявляється через

процеси карбамілювання, тобто неферментативну, посттрансляційну модифікацію білків шляхом реакції з ціанатом (субпродуктом сечовини). Карбамілювання змінює структуру та функції білків і пов'язане з атеросклерозом, ліпідним обміном, дисфункцією імунної системи, нирковим фіброзом та іншими видами пошкоджень. [25]

Сечовина перетворюється на аміак уреазою, яка експресується низкою кишкових бактерій. Аміак частково перетворюється на гідроксид амонію, і обидві сполуки призводять до підвищення рН у просвіті кишечника, подразнення слизової оболонки та ентероколіту як додаткових і, можливо, більш важливих причин порушення кишкового епітеліального бар'єру, ніж сам вплив сечовини. (рис.1.3)

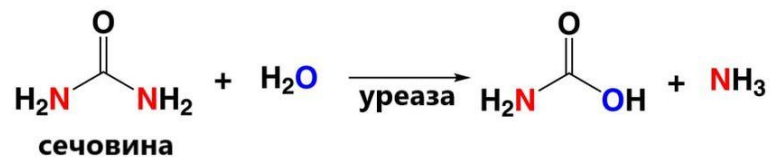


Рисунок 1.3. Перетворення сечовини на аміак

Дослідження *in vitro*, що оцінювали експресію білків щільного з'єднання кишкового епітелію, показали не тільки їх виснаження у присутності сечовини, але й подальше зниження при додаванні уреазу, що індукує утворення аміаку. [26]

Рівень сечовини в сироватці крові підвищується за станів, коли нирковий кліренс знижується, таких як гостра та хронічна ниркова недостатність або порушення функції. Рівень сечовини також може підвищуватися за інших станів, не пов'язаних із захворюваннями нирок, таких як кровотеча з верхніх відділів шлунково-кишкового тракту, зневоднення, катаболічні стани та дієти з високим вмістом білка. Рівень сечовини може знижуватися при голодуванні, дієті з низьким вмістом білка та тяжких захворюваннях печінки. Сироватковий креатинін є точнішою оцінкою функції нирок порівняно з сечовиною; однак, при захворюваннях нирок рівень сечовини підвищується раніше.

Коли рівень сечовини крові підвищений, співвідношення сечовини крові до креатиніну може бути корисним для диференціації преренальних та ниркових причин. При преренальному захворюванні це співвідношення близьке до 20:1, тоді як при внутрішньому захворюванні нирок воно ближче до 10:1. Кровотечі з верхніх відділів шлунково-кишкового тракту можуть супроводжуватися значним підвищенням співвідношення рівня сечовини до креатиніну в крові (інколи понад 30:1). Таким чином, дослідження біохімічних маркерів функціонального стану нирок є важливим інструментом як у клінічній діагностиці, так і в експериментальних токсикологічних дослідженнях [27].

1.3 Особливості нефротоксичної дії фталатів як екзогенних токсикантів

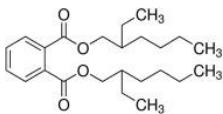
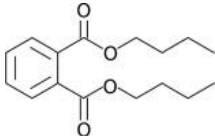
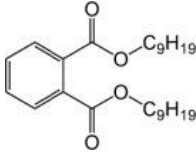
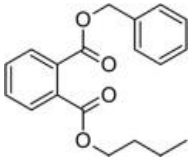
Фталати відносяться до нестійких хімічних речовин, які зазвичай використовуються як пластифікатори для надання гнучкополівінілхлорид. Зазвичай це безбарвні або злегка жовтуваті маслянисті рідини без запаху. Вони малорозчинні у водному середовищі, проте добре розчиняються в органічних розчинниках і характеризуються високою ліпофільністю [13].

Фталати – це складні ефіри 1,2-бензолдикарбонової кислоти, структура яких включає бензольне кільце, з'єднане з двома складноєфірними функціональними групами. Відповідно до молекулярної маси фталатні ефіри поділяються на дві групи: високомолекулярні фталати і низькомолекулярні фталати. [15]

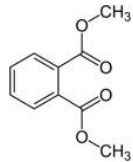
Фталати з високою молекулярною масою, це дізодецилфталат, дізононілфталат, ді2-пропілгептилфталат, дізоундецилфталат і дізотридецилфталат. Вони широко використовуються в промисловості як пластифікатори для покращення м'якості, подовження та довговічності жорстких полімерів і, зокрема, полівінілхлорид. Їх можна знайти в проводах і кабелях, підлогових покриттях, тентах для вантажівок, настінних покриттях,

самоклеючих плітках або етикетках, використовуються в будівництві, іграшках, поліетилентерефталатних пляшках і харчових упаковках, також компонентами штучної шкіри, водонепроникного одягу та різноманітних медичних пластикових пристроїв, наприклад пакети для зберігання крові та інструменти для гемодіалізу (табл. 1.1).

Низькомолекулярні фталати (дибутилфталат, діізобутилфталат, бутилбензилфталат і ді-2-етилгексилфталат) можна використовувати у виробках із ПВХ, а також у медичних пристроях, клеях, фарбах, чорнилі та таблетках з кишковорозчинною оболонкою. [17]

Ім'я	Структура	Використання
Ди (2-етилгексил)фталат (DEHP)		Будівельні вироби (шпалери, ізоляція проводів і кабелів), автотовари, одяг (взуття, плащі), харчова тара, дитячі товари (іграшки, бампери), медичні вироби.
Ди-н-бутилфталат (DBP)		ПВХ пластики, латексні клеї, косметика, засоби особистої гігієни, целюлозні пластики, розчинник для барвників.
Диетилфталат (DEP)		Засоби особистої гігієни, косметика.
Диізононілфталат (DiNP)		Садові шланги, вкладиші для басейнів, плитка для підлоги, брезенти, іграшки.
Дііздецилфталат (DiDP)		ПВХ пластики, покриття на дроти та кабелі, штучна шкіра, іграшки, килимова підкладка, лайнери для басейнів.
Бензилбутилфталат (BBP)		Дорожні конуси, харчові конвеєри, штучна шкіра.

Диметилфталат
(DMP)



Засоби від комах, безпечне скло та лакове покриття.

Таблиця 1.1 Перелік основних фталатів з хімічною структурою та їх загальне значення.

Диметилфталат і ДЕФ не класифікуються в цих групах, оскільки вони не є пластифікаторами і не пов'язані з ПВХ. Вони в основному використовуються в продуктах особистої гігієни, таких як косметика, парфуми та медичні пристрої.

Фталати хімічно не зв'язані з полімером, тому вони можуть легко вивільнитися в навколишнє середовище і потрапляти в організм людини з різних потенційних джерел. Щороку у світі використовується понад 18 мільярдів фунтів фталату, і люди щодня піддаються впливу через вдихання, проковтування та шкірне всмоктування. Повідомлялося, що вплив фталатів на людину коливається від 3 до 30 мкг/кг/день. [4]

Поглинання шкірою є одним із основних шляхів впливу фталатів з низькою молекулярною масою, таких як ДЕФ, це один із основних фталатів, що містяться в сечі людини, він присутній в косметиці та засобах особистої гігієни. [13]

Фталати можуть зв'язуватися з рецепторами ядерних гормонів і імітувати або впливати на дію фізіологічних гормонів, що вводяться в організм. Було показано, що ендокринні руйнівники переважно впливають на рецептори гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи, негативно впливаючи на належне вироблення статевих гормонів, таких як андрогени та прогестерон. Таким чином, вони можуть впливати на нормальні гормональні функції шляхом зв'язування з рецепторами стероїдних гормонів, активуючи відповідь клітини, що несуть рецептор. Хімічні речовини, що порушують роботу ендокринної системи, позитивно пов'язані з синдромом резистентності до інсуліну, про що свідчать гірші прогнози серед осіб із вищим рівнем впливу.

Вони також змінюють вироблення статевих гормонів, негативно впливаючи на статевий розвиток дітей і сексуальну поведінку дорослих. Фталати чинять негативний вплив на репродуктивну систему, зокрема на формування та функціонування статевих клітин. Одним із важливих аспектів цього впливу є порушення процесу розвитку фолікулів у яєчниках. [7]

Дія фталатів на еритроцити викликає підвищення рівня метгемоглобіну і активних форм кисню (АФК). Збільшення АФК сприяє змінам активності ферментів, апоптозу і некрозу. Це може спричинити активацію каналів транзиторного рецепторного потенціалу, які чутливі до окислювального стресу та призведуть до секреції пептиду, пов'язаного з геном кальцитоніну, що матиме сильний негативний вплив на запалення. Крім того, після впливу *in vivo* ксенобіотиків, таких як фталати, спостерігається підвищення активності каталази. [17]

Після перорального впливу фталати здебільшого локалізуються в нирках і печінці з наступним відкладенням у жировій тканині. ДЕФ швидко метаболізується в активний метаболіт моноетилфталат, який зрештою виводиться із сечею та служить біомаркером впливу. [8]

Природними шляхами розкладання фталатів є в основному гідроліз, фоторозпад і мікробна деградація. Процес гідролізу відбувається у водному середовищі і не може повністю мінералізувати їх. Фоторозпад відбувається дуже повільно, а період напіврозпаду коливається від кількох років до кількох сотень років. Сьогодні біодеградація вважається основним шляхом метаболічного розщеплення фталатів, оскільки вона може повністю мінералізувати його у навколишньому середовищі за короткий час. [12]

Метаболічний шлях діетилфталатів в організмі включає два етапи. На першому етапі метаболізуються до моноетилфталату і 2-етилгексанолу за допомогою естерази та ліпази в кишечнику або інших тканинах, а потім утворення фталевої кислоти. Подальший метаболізм дає численні продукти окислення, як наприклад аліфатичний бічний ланцюг МЕФ. МЕФ може додатково метаболізуватися шляхом окислення з утворенням більш полярних

похідних, які можуть бути краще розчинними у воді та, відповідно, легше виводитися з організму. Окиснення відбувається в печінці за участю ферментів цитохрому (рис.1.4) [14].

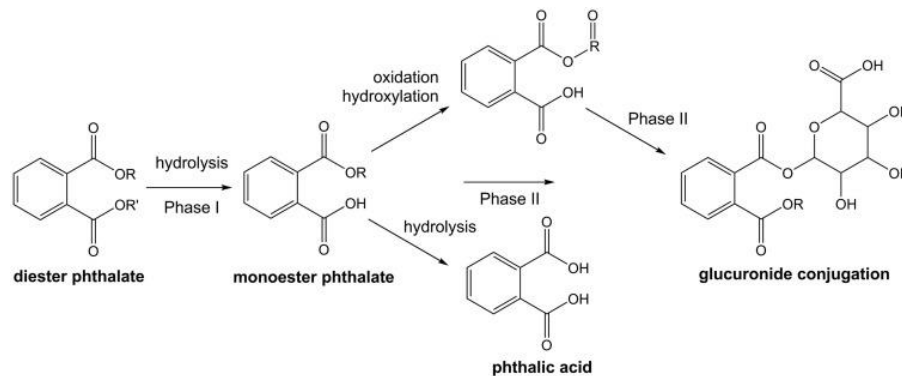


Рисунок 1.4 Перетворення диетилфталату до моноетилфталату

На другій фазі кон'югація каталізується ферментом уридин-5-дифосфат глюкуронілтрансферазою з утворенням гідрофільного глюкуронідного кон'югату, який потім легко виводиться з сечею [16]. Період напіврозпаду для деяких із сполук оцінюється менше 10 год [24]. Оскільки головним органом виведення цих метаболітів є нирки, то вони зумовлюють розвиток нефротоксичності.

Нефротоксичність це стан, що характеризується підвищеним виділенням альбуміну з сечею або зниженням швидкості клубочкової фільтрації, або обома факторами, є захворюванням, що характеризується хронічною хворобою нирок, існують дані, що вказують на роль факторів навколишнього середовища у формуванні цього патологічного стану. Погіршення функції нирок має складну та численну етіологію. Деякі токсини навколишнього середовища також виявилися значними факторами ризику пошкодження нирок, окрім віку, цукрового діабету та гіпертонії. Дорослі, які зазнають впливу певних нефротоксикантів, таких як фталати, мають вищий рівень показників порушення функції нирок. Запальні реакції, спричинені впливом цих токсикантів, здебільшого відповідають за пошкодження специфічних органів, включаючи пошкодження нирок, клубочкові аномалії, пошкодження епітелію ниркових каналців та фіброз. Ці нефротоксиканти

потрапляють у клітину через різні механізми, такі як ендоцитоз, і накопичуються в клітинах, викликаючи перекисне окислення ліпідів, мітохондріальну недостатність, пошкодження ДНК, підвищений рівень активних форм кисню (АФК), що спричиняє мутації, погіршення клітинної проліферації та зміни білків, що зрештою призводить до пошкодження нирок. Порушення функціонування антиоксидантної системи, зокрема зниження активності ферментів гемоксигенази-1 (НО-1), супероксиддисмутази (SOD) та каталази (САТ), відіграє значну роль у розвитку оксидативного стресу, що спричиняє пошкодження каналцевого епітелію нирок [5].

При зниженні активності SOD антиоксидантна система організму втрачає здатність ефективно нейтралізовувати надлишкові супероксидні радикали, що призводить до їхнього накопичення у тканинах. В умовах хронічного або гострого токсичного впливу на нирки, особливо при ураженні проксимальних каналців, це може викликати посилене перекисне окислення ліпідів, що вражає мембрани клітин і порушує їх проникність. У результаті цього розвивається пошкодження каналцевого епітелію, що супроводжується вивільненням прозапальних медіаторів, активацією сигнальних шляхів апоптозу та порушенням іонного транспорту [18].

Отже, фталати, а саме ДЕФ, є поширеним ксенобіотиком, який може надходити в організм різними шляхами та піддаються метаболізму з утворенням гідрофільних метаболітів. Вони чинять потенційний вплив на функціонування нирок під тривалою дією.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти та методи досліджень

У дослідженні застосовували білих щурів масою від 160 до 180 г, яких розподілили на три групи: I – контрольна, що складалась із інтактних тварин; II – щури, які щоденно отримували ДЕФ з дозою 2,5 міліграм на кілограм маси тварин, що відповідає середньому рівню впливу ксенобіотика на людину; III – щури, які отримували ДЕФ з дозою 5,4 міліграм на кілограм, що відображає максимальний рівень надходження цієї речовини до організму людини.

Тварини утримувалися в клітках з дерев'яними підстилками, з вільним доступом до води та стандартного корму (пелети для лабораторних тварин), без обмежень по освітленню (12 годин світла, 12 годин темряви). що забезпечує комфортне середовище, в стандартних умовах за температури 22-24 °C і з вологістю 40-60%.

Концетрований розчин діетилфталату був розведений водою з співвідношенням 1:50 відповідно. Введення ксенобіотика тваринам здійснювали щоденно протягом 21 днів шляхом орального дозування за допомогою зонда вранці, зазвичай в один і той самий час, щоб зменшити змінність експозиції.

Після закінчення експозиції діетилфталату (на 14-ту та 21-шу добу дослідів) тварини були піддані евтаназії. Для евтаназії використовувався стандартний метод за допомогою легкого хлороформу (за методикою, затвердженою науково-методичними рекомендаціями для роботи з лабораторними тваринами). Після цього здійснювали відбір крові з сонної артерії. Кров збирали в сухі стерильні пробірки без антикоагулянту. Для отримання сироватки кров залишали при температурі 4°C протягом 20–30 хвилин для згортання. Далі пробірки піддавали центрифугуванню при швидкості 3000 обертів за хвилину 15 хвилин у лабораторній центрифугі. Після центрифугування прозору надосадову рідину (сироватку) відбирали

мікропіпеткою та переносили в чисті сухі епандорфи, які зберігали при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до моменту біохімічного аналізу.

Для визначення рівня креатиніну та сечовини в сироватці крові використовували комерційні набірні реактиви від ТОВ «Філісіт-Діагностика». Процедура вимірювання проводилась згідно з інструкцією виробника.

Принцип методу **визначення концентрації креатиніну в сироватці крові** полягає у реакції пікринової кислоти в умовах лужного середовища з формуванням забарвленого комплексу, інтенсивність кольору якого прямо пропорційна концентрації креатиніну в зразку. Концентрацію креатиніну визначали колориметричним методом заснованого на реакції Яффе. Для зменшення похибки використовували калібровані автоматичні мікропіпетки. Реактиви перед використанням доводили до кімнатної температури.

Реактиви, які використовувались для досліджу:

1. Реагент - розчин пікринової кислоти
2. Розчин трихлороцтової кислоти
3. Гідроокис натрію
4. Ліофілізований креатинін для приготування калібрувального розчину.

У пробірку дослідної проби додавали по 0,5 мл біологічного матеріалу (сироватки крові щура), і стільки ж розчину трихлороцтової кислоти, та 1,0 мл дистильованої води. У пробірку холостої проби: 1,5 мл очищеної води і 0,5 розчину трихлороцтової кислоти. Пробірка калібрувальної проби складалась з 0,5 мл калібрувального розчину, 1,0 мл дистилляту та 0,5 розчину трихлороцтової кислоти.

Перемішали, центрифугували 5 хвилин при 3000 обертів на хвилину. Далі в усі ємності вносили 1,0 мл надосадової рідини, 0,5 мл розчину гідроокису натрію і 0,5 мл пікринової кислоти. Пробірки залишали при кімнатній температурі на 20 хвилин, щоб забезпечити повне протікання реакції утворення кольорового комплексу між креатиніном і пікриновою кислотою в лужному середовищі. Через цей час оптичну щільність зразків вимірювали за

допомогою фотоелектроколориметра при довжині хвилі 505 нм у стандартній кюветі товщиною шару 10 мм, порівнюючи з холостою пробєю.

Концентрацію креатиніну (в мкмоль/л) визначали за формулою, наведеною в інструкції виробника набору.

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал}}} \times 5,0(442,5)$$

, де

C – кількість креатиніну у зразку, виражена в мг% (мкмоль/л);

5,0 (442,5) – концентрація креатиніну в калібрувальному розчині, мг% (мкмоль/л);

E_{досл.} – значення оптичної щільності дослідного зразка, одиниці вимірювання оптичної щільності;

E_{кал.} – значення оптичної щільності калібрувального зразка, одиниці вимірювання оптичної щільності.

Визначення рівня сечовини в сироватковій частині крові проводили за набором реактивів шляхом діацетилмонооксимного методу.

Принцип методу полягає в утворенні комплексу червоного кольору, при взаємодії сечовини з діацетилмонооксимом у присутності іонів Fe⁺⁺⁺ і тіосемікарбазидом, по інтенсивності забарвлення якого визначають її концентрацію.

Для цього методу надано такі реактиви:

1. Реагент діацетилмонооксиму,
2. Реагент тіосемікарбазиду
3. Калібрувальний розчин сечовини
4. Розчин трихлороцтової кислоти
5. Концентрат розбавлювача

Для приготування робочого розчину діацетилмонооксиму вміст однієї ампули реагенту перенесли у мірну колбу об'ємом 100 мл, після чого доводили об'єм дистильованою водою до позначки і ретельно перемішували. Розчин розбавлювача готували в мірній колбі на 200 мл: спочатку наливають 60–80 мл дистильованої води, потім під час перемішування додають вміст

одного флакону (100 мл) або двох флаконів по 50 мл кожен із концентратом розбавлювача. Об'єм доводили до мітки дистильованою водою і знову ретельно перемішували. Для приготування розчину тіосемікарбазиду кількісно переносили вміст однієї ампули реагенту в мірну колбу на 100 мл, потім доводили об'єм охолодженим до кімнатної температури розчином розбавлювача до мітки і перемішували. Отриманий калібрувальний розчин сечовини був готовий до використання. Розчин трихлороцтової кислоти готували шляхом перенесення 50 % розчину трихлороцтової кислоти з ампули у мірну колбу на 50 мл, після чого, при постійному перемішуванні, доводили об'єм дистильованою водою до мітки.

Сироватку крові одержували однаковим методом як і для креатиніну.

Для проведення аналізу використовували макровизначення для трьох проб: дослідна, калібрувальна та холоста. В дослідні пробірки додаємо 0,02 мл сироватки крові, розчин тіосемікарбазидум – 2,00 мл, та розчин діацетилмонооксиму – 2,00 мл. Для калібрувального методу додаємо 0,02 мл калібрувального розчину, 2,00 мл – розчин тіосемікарбазидум, та 2,00 мл розчину діацетилмонооксиму. Для холостої пробірки додаємо 0,02 мл фізіологічного розчину, 2,00 мл розчину тіосемікарбазиду і 2,00 мл розчину діацетилмонооксиму.

Пробірки закупурювали ковпачками, ретельно перемішували і поміщали одночасно у водяну баню з інтенсивним кипінням на 10 хвилин. Після цього пробірки швидко охолоджували під проточною холодною водою. Вимірювали оптичну густину експериментального (Е_{досл}) та калібрувального зразків (Е_{кал}) відносно холостої проби. Забарвлення зберігало стабільність близько 15 хвилин.

Розрахунок концентрації сечовини проводять за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал}}} \times 10,0[4,67], \text{ ммоль/л} \quad \text{де}$$

C – рівень сечовини в зразку, ммоль/л;

10,0 [4,67]- калібрувальне значення сечовини, ммоль/л;

Едосл - оптична густина дослідного зразка;

Екал - оптична густина калібрувального зразка.

Отже, дані експериментальні умови, вибір тварин, застосовані дози ксенобіотика, а також використані біохімічні методики дослідження дозволяють об'єктивно оцінити функціональний стан нирок за дії ДЕФ на основі достовірних кількісних показників.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка функціонального стану нирок базується на визначенні низки біохімічних показників, серед яких ключовими є креатинін та сечовина в сироватці крові. Ці метаболіти – кінцеві продуктами азотистого обміну та виводяться з організму виключно через нирки, тому їх концентрація в крові – це чутливий індикатор нефротоксичних змін. Порушенню функцій нирок можуть сприяти ксенобіотики, одним з яких є ДЕФ. Однак незрозумілими є вплив тривалого надходження цього ксенобіотика в організм. Водночас відкритим залишається питання вивчення різних доз ДЕФ.

Результати визначення рівня креатиніну в сироватці крові показали, що в контрольній групі інтактних щурів показник становив 574,7 мкмоль/л, що відповідає фізіологічній нормі для тварин відповідного віку та породи [9].

На 14 добу в тварин, які отримували ДЕФ в кількості 2,5 міліграм на кілограм, рівень креатиніну в сироватці крові становив 610,7 мкмоль/л, що статистично не відрізнялось від показників контролю (рис.3.1). Це свідчить про те, що при цій дозі, яка відповідає рівню надходження ДЕФ в організм у звичних екологічних умовах, не відбулося суттєвого порушення функції нирок. Дана доза та термін можна вважати низькими, що підтверджує відсутність нефротоксичних ефектів на ранньому етапі експозиції.

Під впливом введеного ДЕФ у кількості 5,4 мг/кг маси тіла тварин відзначалося зростання рівня креатиніну в сироватці крові до показника 823,1 мкмоль/л, що майже у 1,4 раза перевищувало контрольний показник тварин (рис.3.1). По мірі підвищення терміну введення ксенобіотика виявлено збільшення концентрацій креатиніну в сироватці крові обох досліджуваних груп.

Так, на 21 добу у експериментальній групі, з дозою ДЕФ 2,5 мг/кг рівень креатиніну в сироватці крові підвищився майже у півтори рази, відносно контрольного значення, до показника 855,7 мкмоль/л.

В кількості 5,4 мг/кг маси тварин показник креатиніну підвищувався до значення 1082,3 мкмоль/л, що перевищує рівень контролю майже в 1,9 раза.

Ці показники вказують на прогресування нефротоксичного ефекту при тривалому впливі ДЕФ.

Підвищена концентрація креатиніну в крові щурів, імовірно, є результатом порушення процесу фільтрації в клубочках нефронів, оскільки креатинін у цьому випадку може не реабсорбуватися, а накопичуватися в крові, що відображає перевантаження або пошкодження нефронів. [9]

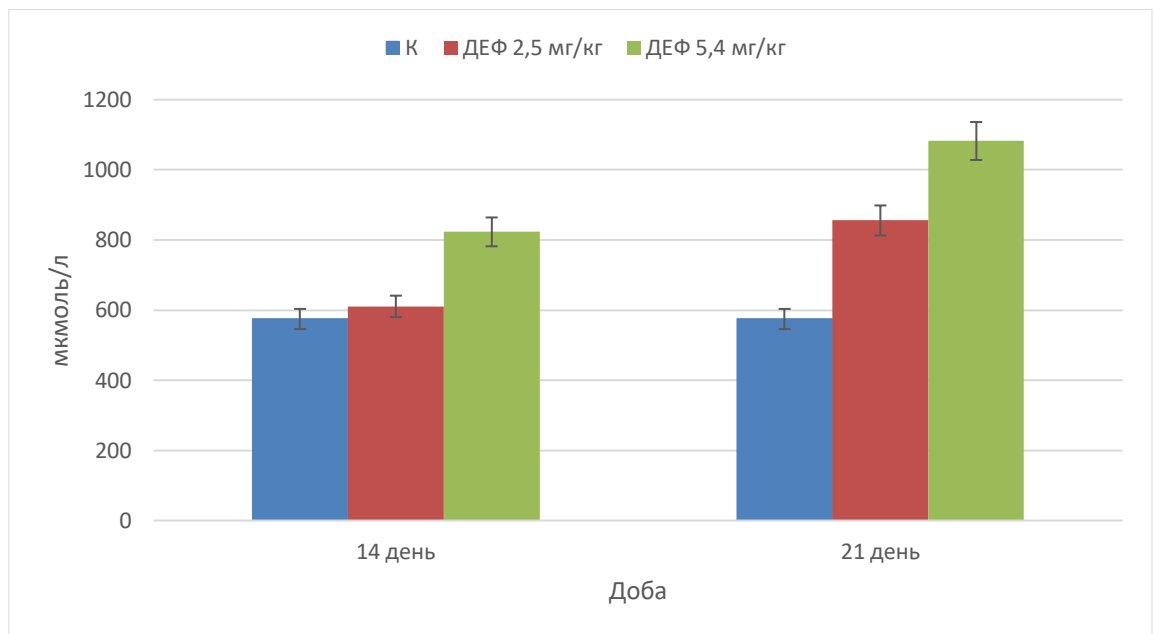


Рисунок. 3.1. Концентрація креатиніну в кров'яній сироватці щурів після введення диетилфталату

*Примітка (тут і надалі): К – контрольні показники щурів; ДЕФ 2,5 мг/кг маси тварин – щури, які отримували дозу диетилфталату 2,5 мг/кг маси тіла тварин; ДЕФ 5,4 мг/кг маси тварин – щури, які отримували дозу 5,4 мг/кг диетилфталату; * – статистично достовірна різниця порівняно з групою інтактних тварин, $P \leq 0,05$.*

Отже, підвищення рівня креатиніну в кров'яній сироватці внаслідок введення ДЕФ свідчить про порушення клубочкової фільтрації та прогресування нефротоксичного ефекту. Для повнішої оцінки

функціонального стану нирок доцільно проаналізувати ще один важливий біохімічний показник – сечовина в сироватковій частині крові.

Результати визначення показника сечовини у крові показали, що в контрольній групі тварин концентрація цього кінцевого метаболіту становила 4,9 ммоль/л, що відповідає фізіологічній нормі. На 14 добу в групі тварин, при надходженні ДЕФ з дозою 2,5 мг/кг рівень сечовини становив 5,1 ммоль/л сироватки крові та не відрізняється від показників контролю (рис. 3.2).

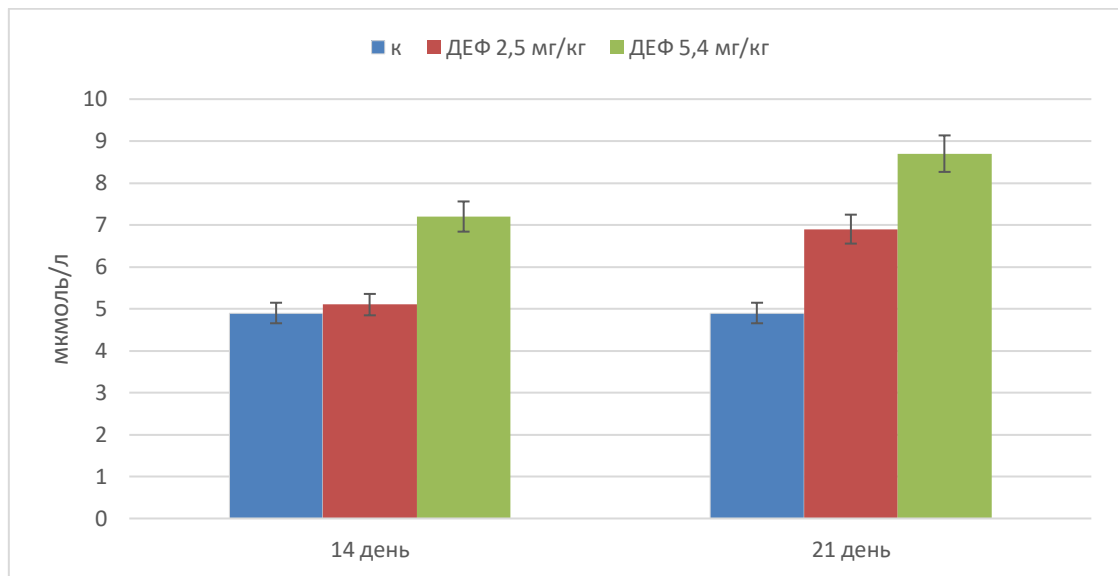


Рис. 3.2 Вміст сечовини в сироватці крові щурів за умов введення диетилфталату

Після двотижневого введення ДЕФ у кількості 5,4 мг/кг маси тіла тварин спостерігалось зростання концентрації сечовини в сироватці крові до показника 7,2 мкмоль/л, що у 1,5 раза перевищувало значення інтактних тварин (рис.3.2).

Така динаміка посилення змін з часом підтверджує прогресуючі порушення функціонального стану нирок. Це може вказувати на перевантаження екскреторної системи та порушення каналцевого транспорту, що знижує ефективність виведення азотистих метаболітів. Ці показники свідчать про незначне, але стабільне підвищення рівня сечовини за умов двотижневого введення ДЕФ з концентрацією 5,4 мг/кг маси тіла тварин

у порівнянні з контролем. Саме це може вказувати на розвиток нефротоксичного ефекту, який прогресує із підвищенням дози ксенобіотика.

Більш тривале введення ксенобіотика протягом 3 тижнів, показало підвищені показники сечовини в крові в обох досліджуваних групах. Причому збільшення концентрації ДЕФ призвело до більш вираженого підвищення досліджуваного показника. За підсумками дослідження, на 21 день експерименту в кров'яній сироватці щурів, які отримували ДЕФ у експозиції 2,5 мг/кг маси тіла, вміст сечовини становив 6,9 мкмоль/л, що в 1,4 рази перевищувало рівень контрольної групи тварин (рис.3.2). Водночас збільшення дози ксенобіотика до рівня 5,4 мг/кг маси тіла призводило до підвищення показника рівня сечовини до 8,7 мкмоль/л, що у 1,8 рази перевищувало показник контролю (рис.3.2).

Поступове підвищення рівня сечовини в сироватці крові з часом свідчить про можливу хронічну токсичну дію, яка може бути пов'язана з накопиченням продуктів розпаду ДЕФ у тканинах нирок або загальною реакцією організму на окислювальний стрес.

Виявлена нами динаміка змін біохімічних показників може свідчити про дозозалежний характер токсичної дії ДЕФ, що проявляється у зростанні концентрацій ниркових маркерів при збільшенні як дози, так і тривалості токсичного впливу. Зростання рівня креатиніну свідчить про порушення клубочкової фільтрації, а підвищення концентрації сечовини – про зниження функціональної здатності ниркових каналців до виведення азотистих метаболітів [27].

Ці результати підтверджують дані літератури, в яких теж описано, що фталати (до яких належить і ДЕФ) викликають пошкодження нирок. Можливість розвитку нефротоксичного ефекту за дії ДЕФ може відбуватися через механізми окислювального стресу, запальної реакції, порушення структурної цілісності клубочкового апарату та енергетичного метаболізму в нефроцитах. Відомо, що фталати активують сигнальні шляхи, які спричиняють апоптоз клітин, вивільнення цитохрому С з мітохондрій,

дисфункцію антиоксидантної системи (зниження активності каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази). За літературними джерелами, ДЕФ здатний індукувати активацію PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскаду, що призводить до рекрутування клітин до апоптозу, а також до ушкодження каналцевого епітелію [27] [24].

Отже, проведене дослідження показало нефротоксичність ДЕФ у щурів при його системному введенні. При цьому встановлено залежність біохімічних змін від дози і тривалості дії та доповнило наявні у науковій літературі дані щодо токсичності фталатів на ниркову систему. Виявлені факти мають важливе значення для подальшого вивчення впливу ксенобіотиків на організм, що обґрунтовує необхідність продовження досліджень у цьому напрямку.

ВИСНОВКИ

У результаті експериментального дослідження встановлено, що ДЕФ має вагомий вплив на основні біохімічні маркери функціонального стану нирок у сироватці крові щурів.

1. Найвищий показник рівня креатиніну у сироватці крові щурів спостерігався по завершенні 21 доби експерименту при концентрації ДЕФ 5,4 мг/кг маси тіла тварин, що свідчить про прогресування порушення клубочкової фільтрації нирок під впливом високих концентрацій ксенобіотика.

2. Рівень сечовини у сироватці крові щурів також підвищувався при умові тривалого введення диетилфталату, з найбільшими показниками при концентрації 5,4 мг/кг маси тіла на 21 день, що вказує на посилення нефротоксичного ефекту та зниження ефективності азотистого обміну.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Arif E., Nihalani D. Glomerular filtration barrier assembly: an insight. *Postdoc journal*. 2013.1(4). P.33-45.
2. Azad F., Barmore W., Stone Wl. WL. physiology, urea cycle. *In: statpearls. treasure island (FL): statpearls publishing*. 2023.
3. A., Mohan Rao, T. J., Babu Jayasekhar, P., Tirkey, Chanu, N. B., Lalchhandama, K., & Singh, Y. D. Conventional and nanotechnology based sensors for creatinine (A kidney biomarker) detection: A consolidated review. *Analytical biochemistry*. 2022. 645. P. 114430.
4. Amara, I., Salah, A., Timoumi, R., Annabi, E., Trovato, A. Scuto et al. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate on Nrf2-regulated glutathione homeostasis in mouse kidney. *Cell stress and chaperones*. 2020. 25(6). P. 865–878.
5. Yadav, R., Kumar, D., Singh, J., & Jangra, A. Environmental toxicants and nephrotoxicity: Implications on mechanisms and therapeutic strategies. *Toxicology*. 2024. 480. P. 153360.
6. Hamm L. L., Nakhoul N., Hering-Smith K. S. Acid-Base homeostasis. *Clinical journal of the american society of nephrology*. 2015.10(12). P. 2232–2242.
7. Hannon P. R., Flaws J. A. The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in endocrinology*. 2015. 6. P. 7.
8. Hazards of diethyl phthalate (DEP) exposure: a systematic review of animal toxicology studies / J. A. Weaver et al. *Environment international*. 2020. 145. P. 106107.
9. Huidobro E. J. P., Tagle R., Guzmán A. M. Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular. *Revista médica de Chile*. 2018. 146(12). P. 1498–1507.
10. Kreider R. B., Jäger R., Purpura M. Bioavailability, efficacy, safety, and regulatory status of creatine and related compounds: a critical review. *Nutrients*. 2022. 14(9). P. 1882.

11. Levassort H., Essig M. Le rein, son anatomie et ses grandes fonctions. *Soins g erontologie*. 2024. 29(172). P. 12–16.
12. Tao, Y., Li, H., Gu, J., Shi, H., Han, S., Jiao, Y., et al. Metabolism of diethyl phthalate (DEP) and identification of degradation intermediates by pseudomonas sp. DNE-S1. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2019. 170. P. 729–736.
13. Olkowska E., Gr zini c G. Skin models for dermal exposure assessment of phthalates. *Chemosphere*. 2022. 287. P. 132173.
14. Warner, G. R., Li, Z., Houde, M. L., Atkinson, C. E., Meling, D. D., Chiang, C., & Flaws, J. A. Ovarian metabolism of an environmentally relevant phthalate mixture. *Toxicological sciences*. 2019. 169(1). P. 246–259.
15. Lucaccioni, L., Trevisani, V., Passini, E., Righi, B., Plessi, C., Predieri, B., et al. Perinatal exposure to phthalates: from endocrine to neurodevelopment effects *International journal of molecular sciences*. 2021. 22(8). P. 4063.
16. Zhang, Y. J., Guo, J. L., Xue, J. C., Bai, C. L., Guo, Y. Phthalate metabolites: characterization, toxicities, global distribution, and exposure assessment. *Environmental pollution*. 2021. 285. P. 117402.
17. Piccione, G., Arrigo, F., Impellitteri, F., Faggio, C. Phthalates and their effects on human health: focus on erythrocytes and the reproductive system. *Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology & pharmacology*. 2023. 270. P. 109645.
18. Podkowińska A., Formanowicz D. Chronic kidney disease as oxidative stress- and inflammatory-mediated cardiovascular disease. *Antioxidants*. 2020. 9(8). P. 752.
19. Wang, K., Wu, S., Zhao, J., Zhou, M., Li, G., Wang, D., et al. Quantitative analysis of urea in serum by synchronous modulation and demodulation fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy*. 2022. 264. P. 120305.
20. Wu, L., Liu, Y., Liu, Z., Chen, H., Shen, S., Wei, Y., et al. Serum urea acid and urea nitrogen levels are risk factors for maternal and fetal outcomes of pregnancy: a retrospective cohort study. *Reproductive health*. 2022. 19. P. 192.

21. Tabibzadeh N., Crambert G. Mechanistic insights into the primary and secondary alterations of renal ion and water transport in the distal nephron. *Journal of internal medicine*. 2022. 292(4). P. 542–556.
22. Pollak, M. R., Quaggin, S. E., Hoenig, M. P., Dworkin, L. D. The glomerulus: the sphere of influence. *Clinical journal of the american society of nephrology*. 2014. 9(8). P. 1461–1469.
23. Paniagua, R., Ávila, M., Mora Sánchez, M. G., Bernal Amador, A. S. The metabolism of creatinine and its usefulness to evaluate kidney function and body composition in clinical practice. *Biomolecules*. 2025. 15(1). P. 41.
24. Husøy, T., Andreassen, M., Hjertholm, H., Carlsen, M. H., Norberg, N., Sprong, C., et al. The Norwegian biomonitoring study from the EU project EuroMix: levels of phenols and phthalates in 24-hour urine samples and exposure sources from food and personal care products. *Environment international*. 2019. 132. P. 105103.
25. Levassort, H., Boucquemont, J., Lambert, O., Liabeuf, S., Laville, S. M., Teillet, L., et al. Urea level and depression in patients with chronic kidney disease / H. Levassort et al. *Toxins*. 2024. 16(7). P. 326.
26. Vanholder R., Gryp T., Glorieux G. Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research). *Nephrology dialysis transplantation*. 2017. 32(2). P. 196–199.
27. V. Gounden, H. Bhatt, I. Jialal. Renal function tests. *StatPearls*. 2024.
28. Zeisberg M., Kalluri R. Physiology of the renal interstitium. *Clinical journal of the american society of nephrology*. 2015. 10(10). P. 1831–1840.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпеки у надзвичайних ситуаціях

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватися наступних заходів безпеки:

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

Правила роботи з реактивами

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

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

Правила роботи з нагрівальними приладами

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

- ✓ при опіках на обпечене місце портібно покласти вату, змочену розчином перманганату калію.

Правила роботи з лабораторним обладнанням

Центрифуги

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

Автоматичні піпетки

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