

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

**БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ
ГЕПАТОБІЛІАРНОЇ СИСТЕМИ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА
УМОВ ВПЛИВУ БЕНЗОАТУ НАТРІЮ Й АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ**

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:
студентка VI курсу, групи 600М
спеціальності 091 – Біологія
(біохімія та лабораторна діагностика)
(шифр і назва спеціальності)

Макарчук С.С.

Керівник: к.б.н., доцент Кеца О. В.

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від „____” _____ 2022 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню впливу бензоату натрію (NaB) й аскорбінової кислоти (АК) на функціональний стан печінки щурів. NaB тваринам вводили *per os* щоденно у дозі 750 мг на кг маси тварин. АК вводили в дозі 30 мг на кг маси тварин. Введення харчових добавок здійснювали протягом 21-ї доби. Функціональний стан гепатобіліарної системи оцінювали за ензимними активностями аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ), рівнем загального і прямого білірубіну, показником тимолової проби.

Показано, що тритижневе введення в організм NaB призводить до підвищення ензимних активностей АЛТ, АСТ, ГГТ у сироватці крові, що вказує на гепатотоксичний вплив досліджуваного ксенобіотика. Поряд із цим знижується білок-синтетична функція печінки, про що свідчить підвищення показника тимолової проби.

Введення NaB разом з АК посилює деструктивний вплив NaB на органи гепатобіліарної системи, оскільки поряд із гіперферментемією АЛТ, АСТ і ГГТ в сироватці крові підвищуються рівні загального та прямого білірубіну.

Ключові слова: аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, γ -глутамілтрансфераза, білірубін, бензоат натрію, аскорбінова кислота, печінка.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Механізм впливу бензоату натрію на живі системи	7
1.2. Біологічна роль трансаміназ в організмі	10
1.2.1. Аланінамінотрансферази як маркери функціонального стану печінки	10
1.2.2. Аспартатамінотрансфераза як біохімічний маркер діагностики стану печінки	12
1.3. Структурно-функціональна характеристика γ-глутамілтрансферази	15
1.4. Білірубін як маркер стану гепатобіліарної системи	18
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	21
2.1. Об'єкт і методи досліджень	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	29
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40
ДОДАТКИ	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ

NaB – бензоат натрію

AK – аскорбінова кислота

ALT – аланінамінотрансфераза

AST – аспартатамінотрансфераза

GGT – γ -глутамілтрансфераза

ПФ – піридоксальфосфат

ВСТУП

Одним із найважливіших факторів способу життя, що впливає на здоров'я людини, є харчування, яке вважається критично важливим фактором нормального функціонування усіх органів організму [1]. Протягом останніх двох десятиліть харчові добавки викликають все більше занепокоєння. Незважаючи на те, що багато харчових добавок використовуються під позначенням «Загальноновизнано безпечними» (GRAS), існують значні прогалини в знаннях щодо потенційного впливу цих добавок на здоров'я людини [2].

Збільшення використання штучних консервантів у продуктах харчування викликає необхідність вивчення механізмів дії цих ксенобіотиків на органи і тканини, зокрема печінку [2].

Однією з найпоширеніших хімічних речовин з антимікробними властивостями, яку часто використовують у харчовій промисловості, є бензойна кислота та її похідні, особливо бензоат натрію (NaB) [4]. NaB – сіль бензойної кислоти, яку застосовують як консервант не лише у харчових продуктах, але й під час виробництва ліків, косметичних сумішей та шампуней [5]. Відповідно до офіційної публікації Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) [6] застосування NaB в харчовій промисловості обмежено до 0,1%, а допустима добова норма споживання NaB становить 5 мг на кг маси тіла/добу. Тим не менш, він використовується у вищих концентраціях в багатьох харчових продуктах [7].

Показано, що цей консервант нетоксичний у своїй органічній формі, проте його синтетична форма в хронічній дозі токсична для живих організмів. Небезпечним вважається взаємодія NaB з іншими речовинами, що містяться в продуктах харчування, зокрема з аскорбіновою кислотою (АК) [8].

В організмі метаболізм NaB відбувається переважно в клітинах печінки, проте механізми його впливу в хронічній дозі з АК на функціональний стан гепатобіліарної системи залишаються відкритими.

Будь-які зміни, які відбуватимуться в печінці можуть призвести до її дисфункціонування і, як наслідок, до порушення біотрансформації ксенобіотиків, в тому числі лікарських препаратів. Дисбаланс в роботі детоксикуючої системи печінки призведе до інтоксикація організму [9]. Розуміння наряду метаболічних змін у печінці, за умов введення консервантів, допоможе попередити не лише захворювання органів гепатобіліарної системи, але й знизить токсичність лікарських препаратів, які застосовують під час лікування різних патологій.

Мета роботи – оцінити функціональний стан гепатобіліарної системи у тварин за умов поєднаного введення в організм бензоату натрію й аскорбінової кислоти.

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

1. Визначити ензиматичні активності амінотрансфераз – аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ) та коефіцієнт де Рітиса в сироватці крові щурів за дії NaB і АК.
2. Дослідити показник ензимної активності γ -глутамілтрансферази (ГГТ) та рівні загального і прямого білірубину в сироватці крові щурів за дії NaB і АК.
3. Оцінити білково-синтетичну функцію печінки щурів за виначенням тимолової проби в сироватці крові щурів за умов комплексного введення NaB і АК.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізм впливу бензоату натрію на живі системи

NaB (бензоат натрію) – метаболіт бензойної кислоти, який широко використовується як консервант харчових продуктів і напоїв, класифікований як GRAS (загалом визнаний безпечним) FDA (Управління з контролю за продуктами й ліками) [10]. Харчові добавки – речовини, які додають для збереження смаку або покращення смаку їжі і зовнішнього вигляду під час будь-якого з наступних етапів: виробництво, пакування, транспортування та/або зберігання [11]. Прикладами поширених добавок є моонатрій глутамат (MSG), білий цукор, бензойна кислота (та її солі, такі як бензоат калію та натрію), аскорбінова кислота (вітамін С), силікат алюмінію, бутильований гідрокситолуол тощо [12].

Бензоат натрію зазвичай використовується як антимікробний засіб у соліннях, соусах, фруктових соках, фармацевтичних препаратах, та терапевтичних схемах. Його також використовують як консервант в їжі. Допустимий добовий ліміт споживання бензойної кислоти та її солей становить 0-5 мг/кг маси тіла [13].

Окрім того, NaB також використовується для лікування розладів циклу сечовини та гіперамоніємії через його здатність зв'язувати та видаляти залишки азоту та знижувати надлишковий рівень аміаку [14]. Оскільки це один із найпоширеніших консервантів у світі, біологічні ефекти NaB вивчалися на різних моделях *in vitro* та *in vivo* [7].

Деякими роботами показано, що NaB підтримує та посилює роботу регуляторних Т-клітин [5], індукує продукцію ІЛ-4 периферичними кістковими мононуклеарами, а також пригнічує імунні відповіді типу Th1 [7]. Деякі дослідження показують, що NaB пригнічує вивільнення лептину в моделі мишачого адипоцита *in vitro*, що свідчить про роль цієї добавки в розвитку ожиріння [7]. Також були виявлені мієліногенні властивості NaB і його здатність покращувати пам'ять при розсіяному склерозі та хворобі Альцгеймера [10].

Токсичність, викликана NaB, також вивчалася на різних рівнях. NaB проявляє мутагенну дію, цитотоксичну активність у лімфоцитах і спленоцитах у концентраціях 2,0 мг/мл і 2500 г/мл, відповідно. На деяких організмах показана індукована NaB нейротоксичність, нефротоксичність і летальність при концентрації 2000 мг/мл [15]. У сукупності ці дані дослідження частково виявляють різні біологічні ефекти та модуляцію цитотоксичності NaB. Сьогодні розглядається вплив NaB на статус проліферації та апоптотичну передачу сигналів при раку. В останні роки зв'язок між харчовими факторами та різними видами раку був значною мірою досліджений [10]. Так, показано, що одним із ключових модуляторів запалення та імунної функції при раку є NFB – транскрипційний фактор, який бере участь у патогенезі як гематологічного, так і солідного раку [10]. Було показано, що харчові добавки та консерванти модулюють активність NFB і відіграють певну роль у профілактиці або прогресуванні раку. Повідомлялося, що NaB може впливати на активність NFB у мікрогліальних клітинах при його нецитотоксичних та токсичних концентраціях і змінювати експресію гена NFB [10].

Метаболізм NaB здійснюється в мітохондріях. У мітохондріальному матриксі NaB перетворюється в гіпурат в результаті проходження двох етапів: 1. Бензоат натрію потрапляє в мітохондрії та перетворюється на бензоїл-КоА (реакція 1) за допомогою АТФ-залежної КоА-лігази у результаті чого утворюється бензоїл КоА. 2. Потім бензоїл КоА перетворюється на гіпурат (реакція 2) за дії ензиму гліцин-N-ацилтрансферази. Утворений гіпурат виводиться з мітохондрій (рис.1.1) [17].

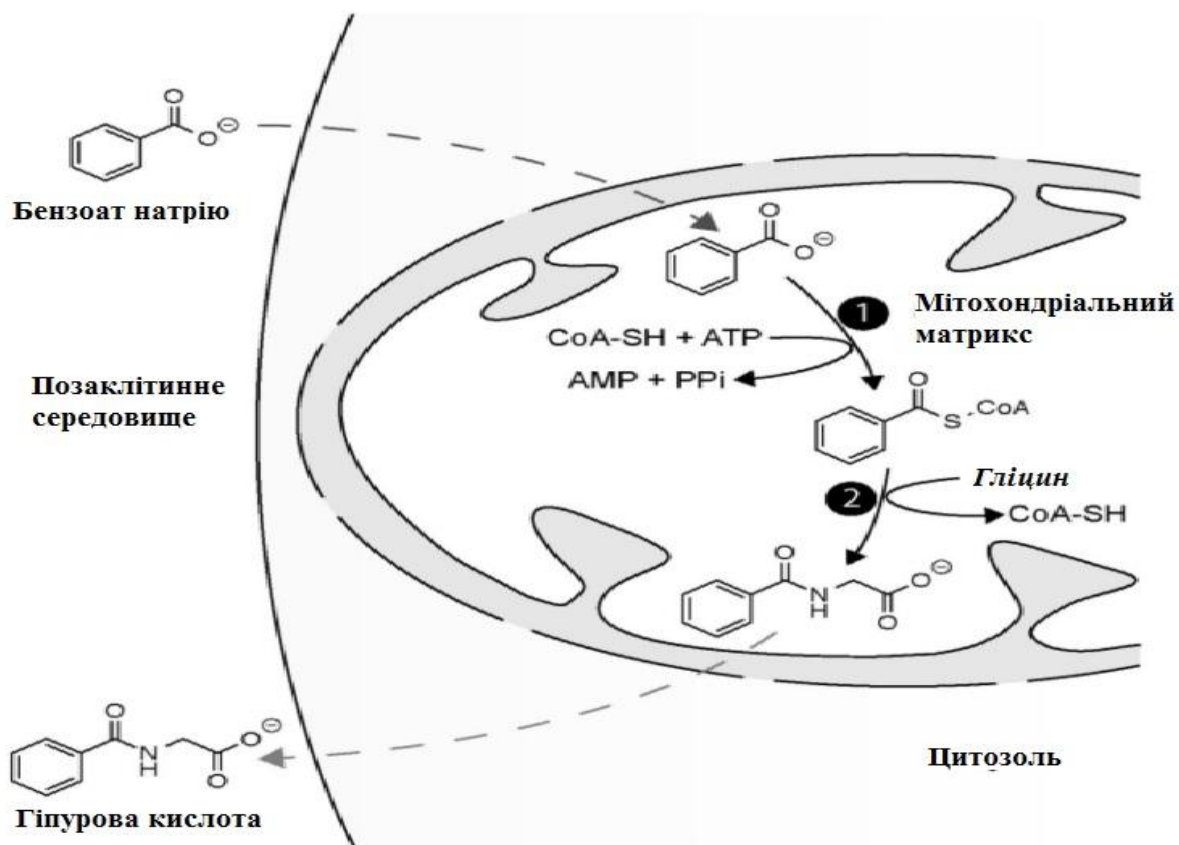


Рис.1.1. Метаболізм бензоату натрію в мітохондріях

Деякі дослідження вказують на взаємодію між харчовими добавками. Так, при надходженні в організм бензоат натрію може взаємодіяти з аскорбіновою кислотою. У цій реакції утворюється бензол, який в організмі проявляє властивості сильного канцерогену [8]. Реакція представлена на рис.1.2.

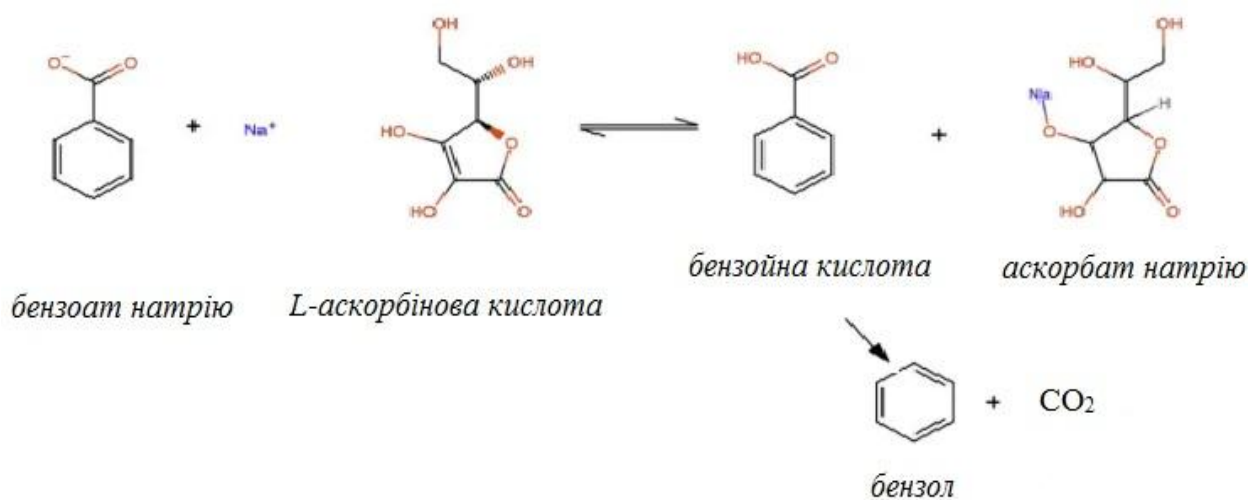


Рис.1.2. Схема взаємодії бензоату натрію з аскорбіновою кислотою

Хоча аскорбінова кислота є важливим антиоксидантом з кількома клітинними функціями, то за умов її спільного вживання з NaB нівелюється її антиоксидантна дія.

Отже, NaB є сполукою з широким профілем біологічної дії, яка є небезпечною при високих концентраціях, оскільки проявляє дозозалежні ефекти. Багато досліджень також показують, що NaB має терапевтичний потенціал, особливо для нейродегенеративних захворювань. Однак при високих дозах проявляє токсичність на організм, зокрема може проявляти і гепатотоксичність. Тому, через те, що загальний вміст NaB в їжі неможливо повністю контролювати, тому механізми впливу високих концентрацій NaB та їх побічних ефектів на організм, зокрема печінку залишіється відкритими. Незрозумілими залишаються питання поєднаного введення бензоату натрію і аскорбінової кислоти на функціональний стан печінки.

1.2. Біологічна роль трансаміназ в організмі

1.2.1. Аланінамінотрансферази як маркери функціонального стану печінки

Печінка відноситься до життєво важливих органів, розташованих у верхній правій частині черевної порожнини. Вона бере участь у здійсненні багатьох важливих функцій організму – у переробці поживних речовин, біотрансформації ксенобіотиків, виробництві жовчі, синтезі білків, таких як фактори системи згортання крові, а також знешкоджує потенційно токсичні сполуки ендогенного і екзогенного походження до безпечних речовин [18].

Цілий ряд факторів – неправильне харчування, надмірне вживання лікарських препаратів, токсичні речовини та інші призводять до пошкодження клітин печінки, що сприяє підвищенню активності трансаміназ, зокрема аланінамінотрансферази (АЛТ) і аспартатамінотрансферази (АСТ) [19].

АЛТ (КФ 2.6.1.2) – ендogenousний ензим з класу трансфераз, по родини аманотрансфераз (трансаминаз), який широко використовується в медичній практиці для лабораторної діагностики пошкоджень печінки [20].

Цей ензим в основному локалізується в цитозолі гепатоцита. АЛТ складається з 496 амінокислот, має період напіврозпаду 47 ± 10 годин, і кодується геном *ALT*, який знаходиться на довгому плечі хромосоми 8. АЛТ каталізує перенесення аміногруп від L-аланіну до α -кетоглутарату, а продуктами реакції є L-глутамат і піруват (рис.1.3) [21].

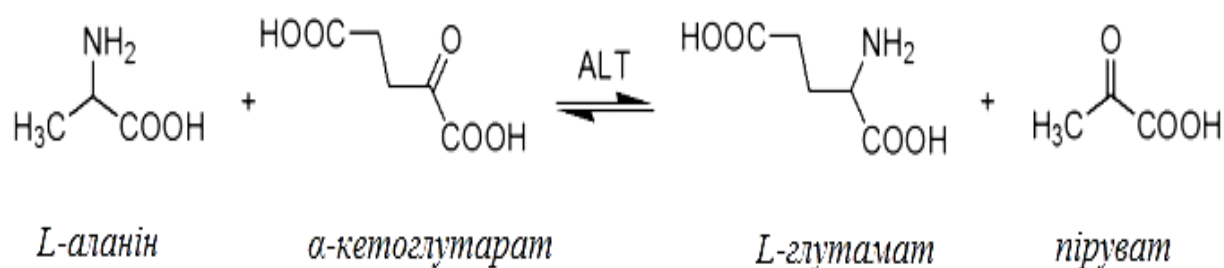


Рис.1.3. Реакція трансамінування, яка каталізується аланінамінотрансферазою

Для проходження цього процесу необхідний кофермент піридоксальфосфат [20].

АЛТ – це внутрішньоклітинний ензим, який в основному міститься в цитозолі гепатоцита, тому активність АЛТ у клітинах печінки приблизно в 3000 разів перевищує активність АЛТ у сироватці крові. Коли відбувається пошкодження печінки, АЛТ вивільняється з пошкоджених клітин печінки та викликає значне підвищення сироваткової активності АЛТ. АЛТ також міститься в м'язах, жировій тканині, кишечнику, товстій кишці, простаті та мозку; однак концентрація АЛТ у цих органах значно нижча, ніж у печінці [22].

Сироваткова АЛТ є легкодоступним, недорогим і рутинним біохімічним маркером, що використовується в клінічній практиці для оцінки функціонального стану печінки. Спочатку багато було висловлювань та

занепокоєнт щодо клінічної значущості активності АЛТ при вірусних і токсичних гепатитах, м'язовій дистрофії та інших м'язових захворювань, що може спричинити значне підвищення рівня АЛТ у сироватці крові [23].

Сьогодні показано, що все більше метаболічних розладів, таких як ожиріння, гіперліпідемія та цукровий діабет асоціюється з легким або помірним підвищенням АЛТ [23, 24].

В даний час вимірювання АЛТ широко використовується не тільки під час виявлення захворюваності, розвитку та прогнозу захворювання печінки з явними клінічними симптомами, але також біохімічний аналіз на АЛТ призначають під час перевірки загального стану здоров'я [20]. Деякі демографічні фактори, такі як стать і вік, також може вплинути на рівень АЛТ [24].

Отже, АЛТ міститься в основному в печінці, тому про функціональний стан печінки судять за вимірюванням кількості АЛТ у крові. Коли клітини печінки пошкоджені, вони вивільняють АЛТ у кров. Високий рівень АЛТ у крові може бути ознакою пошкодження або захворювання печінки. Деякі типи захворювань печінки спричиняють високий рівень АЛТ ще до появи симптомів захворювання. Тому, аналіз крові на АЛТ може допомогти вчасно встановити функціональний стан печінки.

1.2.2. Аспартатамінотрансфераза як біохімічний маркер діагностики стану печінки

Аспартатамінотрансфераза (АСТ) – ензим, який належить до класу трансфераз (КФ 2.6.1.1) підродини амінотрансфераз (трансаміназ). Тобто, є членом родини піридоксальфосфатзалежних амінотрансфераз класу I [24]. Він кодується геном GOT1. Це гомодимер, який має довжину 413 амінокислот і відіграє вирішальну роль у метаболізмі амінокислот і вуглеводів, в уреогенезі та перенесенні відновних еквівалентів у мітохондрії

та хлоропласти [25]. В тваринних клітинах цей ензим знаходиться в цитозолі і мітохондріях.

В організмі людини він виробляється в мозку, скелетних м'язах, печінці, підшлунковій залозі, еритроцитах і нирках. Широкий спектр тканин, у яких він виробляється, відокремлює його від аналогічного ензиму АЛТ, який міститься переважно в печінці [21]. Рівень АСТ в організмі може бути використаний як маркер захворювання або пошкодження тканин. Крім того, можна порівняти рівні АСТ і АЛТ, щоб точно визначити, чи є пошкодження тканин в основному в печінці [26].

Молекула АСТ являє собою гомодимер, який містить 16 α -спіралей і β -листів і утворений із 7 паралельних і антипаралельних ниток (альфа-спіралі, бета-ланцюги, петлі, витки). Асиметрична одиниця АСТ з виділеними малим і великим доменом і кофактором піридоксальфосфатом (ПФ) (1b4x). Кожна субодиниця містить еквівалентний активний центр [27]. Субодиниці з'єднуються у двох місцях: між своїми великими доменами та між N-кінцевими залишками та великим доменом на іншій субодиниці [28]. Ця структура АСТ незначно відрізняється серед різних видів організмів, починаючи від *E. coli* і закінчуючи людьми [25]. Крім того, структура активного центру є висококонсервативною з гомологією послідовності 25% [29].

Кожна субодиниця гомодимера далі поділяється на малий і великий домен. Малий домен складається з амінокислот від N-кінця до залишку Pro 48 і від Met 326 до C-кінця. Решта амінокислот складають великий домен, і два домени з'єднані довгою α -спіраллю, що складається з 32 амінокислот [30]. Великий домен – це місце, де знаходиться активний центр АСТ, що містить багато α/β супервторинних структур. Це контрастує з малою субодиницею, яка утворена з двох α -спіралей і двох β -ланцюгів. У багатоклітинних організмах є згин на 325-му залишку, який діє як шарнір для малого домену, що дає змогу відбуватися конформаційним змінам після зв'язування інгібіторів із ферментом [31].

Як зазначено вище, активний центр АСТ розташований на великому домені субодиниці. В середині активного центру знаходиться амінозалишок Lys 258, також відомий як внутрішній альдімін, який зв'язується з кофактором ПФ, утворюючи так звану основу Шиффа. Після додавання амінокислотного субстрату нова основа Шиффа утворюється між ПФ і амінокислотою [31].

АСТ каталізує оборотне трансамінування α -аміногрупи з L-аспартату в α -кетоглутарат, утворюючи оксалоацетат і глутамат (рис.1.4) [32].

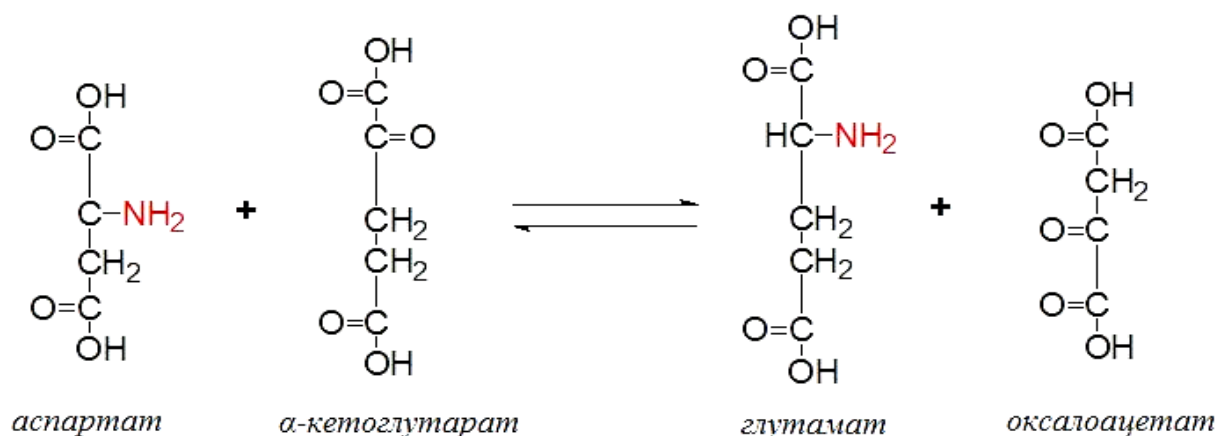


Рис.1.4. Реакція трансамінування, яка каталізується аланінамінотрансферазою

У результаті проходження реакції після введення амінокислотного субстрату нова основа Шиффа утворюється між ним і кофактором. Це призводить до того, що амінокислота втрачає водень і утворює хіноїдний проміжний продукт, і відбувається репротанування, що призводить до утворення кетіміну. Потім структура гідролізується з утворенням α -кетокислоти та ПФ [31]. 2-метиласпартат діє як інгібітор АСТ, коли він утворює основу Шиффа з кофактором ПФ, а не аспартат. Це призводить до того, що процес зупиняється на етапі, що передуює елімінації альфа-білка[31].

Ця реакція, яку каталізує АСТ, необхідна для підтримки гомеостазу в організмі. Чотири різні молекули, які можуть утворюватися в результаті цієї трансамінації (оксалоацетат, α -кетоглутарат, аспартат, L-глутамат), мають

вирішальне значення для ряду метаболічних процесів. Оксалоацетат і α -кетоглутарат відіграють важливу роль у циклі Кребса, різні форми аспартату є важливими молекулами в циклі сечовини та беруть участь у гліюконеогенезі, а глутамат є важливою молекулою в метаболічних шляхах, пов'язаних із пам'яттю [33].

Рівні активності АСТ в організмі вказують на пошкодження тканин і захворювання. Зазвичай АСТ міститься в крові в мінімальних кількостях, однак, коли згадані вище органи пошкоджені, АСТ вивільняється в кров. Кількість виходу АСТ пропорційна рівню завданої шкоди. Було показано, що рівні АСТ істотно зростають протягом 6 годин після початкової деградації тканин і можуть залишатися підвищеними протягом 4 днів [34]. Рівні активності АСТ можуть використовувати у порівнянні з рівнями інших ензимів, для визначення пошкоджень, що відбуваються в різних органах організму [35].

Отже, дослідження АЛТ і АСТ в сироватці крові виявляються особливо корисними для виявлення пошкоджень печінки за різних умов. АСТ та АЛТ вважаються двома найбільш важливими показниками ушкоджень печінки, хоча АЛТ більш специфічний, ніж АСТ. У деяких випадках АСТ безпосередньо зіставляється з АЛТ та обчислюється їх співвідношення (АСТ/АЛТ) – коефіцієнт де Рітиса, який може використовуватися для виявлення причин ушкодження печінки.

1.3. Структурно-функціональна характеристика γ -глутамілтрансферази

γ -Глутамілтрансфераза (ГГТ; гамма-глутамілтранспептидаза, ГГТП, КФ 2.3.2.2.) – ензим, що бере участь в обміні амінокислот. Каталізує перенесення гамма-глутамілового залишку з гамма-глутамілового пептиду на амінокислоту або інший пептид [36].

Ензим в основному локалізується в нирках (рівень ГГТ у 7000 разів вище, ніж у сироватці крові), печінці (у 200-500 разів вище ніж у сироватці крові) та підшлунковій залозі. У клітинах локалізується у мембрані, лізосомах та цитоплазмі [37].

У низці публікацій повідомляється, що виділення й очищення ГГТ, а також дослідження його активності найкраще охарактеризованого для ізоформ нирок щурів. Під час обробки бромелаїном вивільняється активна форма ензиму з молекулярною масою 68 кДа, яку можна розділити на два неідентичні глікопептиди з молекулярною масою 46 кДа і 22 кДа; останній містить ділянку зв'язування гамма-глутамілу [38].

ГГТ безпосередньо бере участь у синтезі та метаболізмі глутатіону через гамма-глутаміловий цикл. Існують переконливі докази того, що це відіграє певну роль у всмоктуванні амінокислот із клубочкового фільтрату та з просвіту кишечника через механізм транслокації. Багато досліджень показують, що вміст ГГТ в печінці підвищується під дією препаратів, що індукують ензими, і що це підвищення відображається на підвищенні активності ензиму в сироватці крові. Аналіз сироватки має потенціал для моніторингу дотримання лікарських засобів [37].

Підвищена активність ГГТ у сироватці крові, що спостерігається у хронічних алкоголіків, частково зумовлена індукцією мікросомальної ізоформи ензиму. Користь аналізу для виявлення алкоголізму є суперечливою, але це корисний показник дотримання терапії. Різке підвищення активності спостерігається в багатьох хімічно індукованих пухлинах тварин, і його можна розпізнати в передракових клітинах задовго до того, як стають очевидними будь-які морфологічні зміни. Він використовувався як тест на метастази в печінці, але його прогностична цінність показала широкий діапазон [38].

Найбільш універсальне застосування визначення ГГТ в сироватці крові – діагностика захворювань печінки та жовчних шляхів. Широко поширена

думка, що вищі показники спостерігаються при обструкції жовчних шляхів, ніж при захворюваннях паренхіми [39].

Для цього ензиму описано три різні реакції [40]: 1) гідроліз; 2) внутрішня транспептидація; 3) зовнішня транспептидація (рис.1.5).

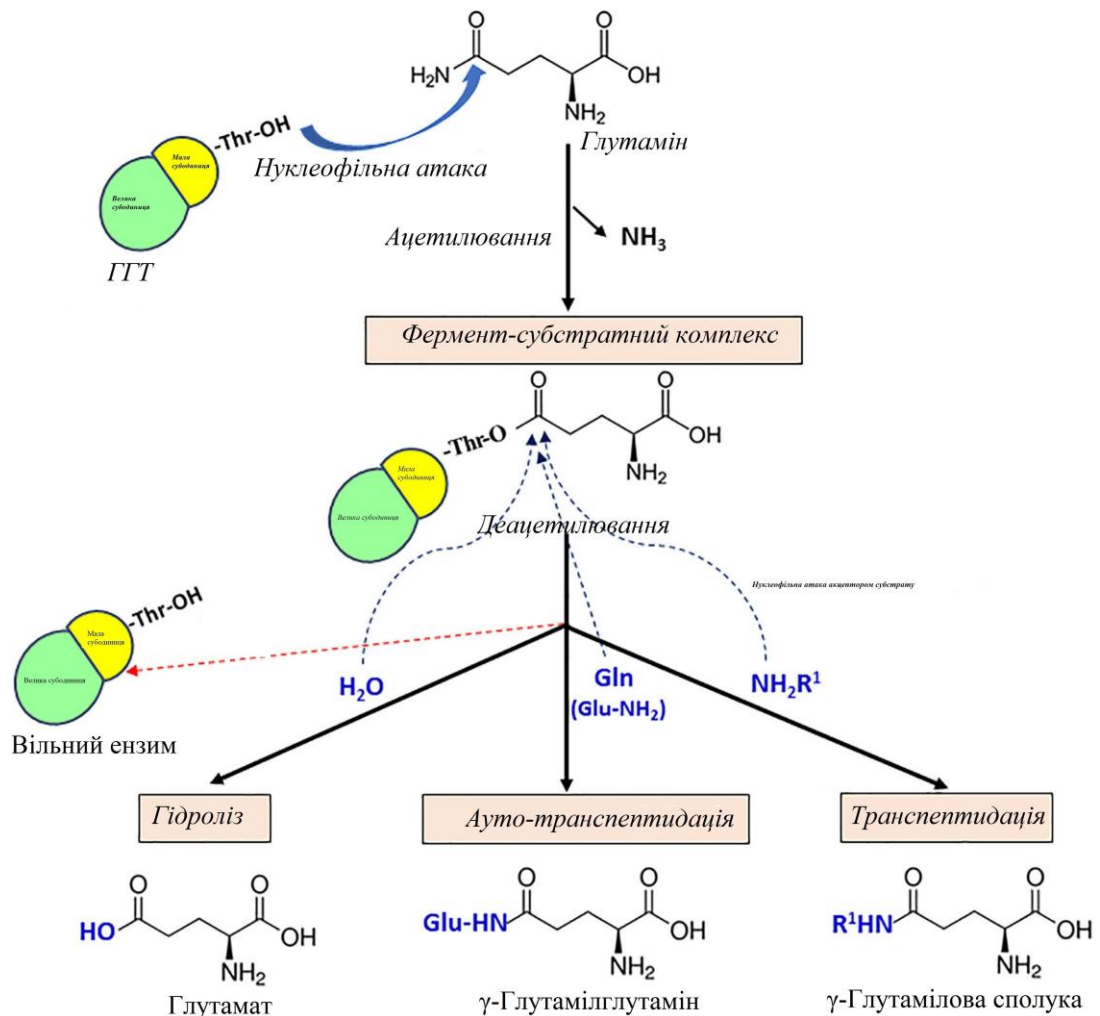


Рис.1.5. Механізм каталітичної дії γ-глутамілтрансфери

Глутатіон є звичайним субстратом цього ензиму в організмі. Цей ензим бере участь у транспортуванні амінокислот шляхом перенесення γ-глутамілової частини глутатіону до інших амінокислот, що дозволяє їм легше перетинати клітинні мембрани [39].

Як зазначалося раніше великий відсоток ензиму присутній в гепатоцитах. ГГТ міститься в епітеліальних клітинах жовчних проток,

переважно в міжчасточкових жовчних протоках. Це є причиною того, що він сприйнятливий до пошкодження жовчних шляхів. Хоча нирки мають максимальну кількість ГГТ, проте печінка вважається основним джерелом сироваткової активності цього ензиму [38]. Окрім того, ГГТ присутній у підшлунковій залозі, селезінці, серці, кишечнику, мозку та передміхуровій залозі. Мінімальна кількість виявляється в ендотелії капілярів. На клітинному рівні ГГТ локалізується в мікосоммах цитоплазми і в клітинній мембрані [36].

Отже, ГГТ бере участь у перенесенні амінокислот і пептидів через клітинну мембрану, а його підвищення активності цього ензиму в сироватці крові свідчить про пошкодження плазмолем. ГГТ є чутливим показником захворювання печінки, особливо гепатобіліарної обструкції. ГГТ не підвищується при кістковій, м'язовій і гемолітичній анемії.

1.4. Білірубін як маркер стану гепатобіліарної системи

Білірубін – жовтий пігмент, який є компонентом жовчі та утворюється у селезінці та кістковому мозку при розпаді еритроцитів. У нормі еритроцити руйнуються через 110-120 днів після виходу із кісткового мозку. При цьому із загиблих клітин вивільняється металопротеїн гемоглобін, що складається із залізовмісної частини – гема та білкового компонента – глобіну. Від гему відщеплюється залізо, яке повторно використовується як необхідний компонент ензимів та інших білкових структур, а гемові білки перетворюються на білірубін [22].

Непрямий (некон'югований) білірубін за допомогою альбумінів доставляється кров'ю в печінку, де завдяки ензиму глюкуронілтрансферазі з'єднується з глюкуроною кислотою та утворює прямий (кон'югований) білірубін. Процес перетворення водонерозчинного білірубину на водорозчинний називається кон'югацією [23]. Зв'язана фракція пігменту практично не надходить у кров і в нормі екскретується з жовчю. Білірубін у

просвіті кишечника під дією бактерій кишечника метаболізується та виводиться з калом, надаючи йому темного забарвлення.

Прямий білірубін названий так у зв'язку з методикою лабораторного дослідження. Цей водорозчинний пігмент безпосередньо взаємодіє з реактивами (діазореактивом Ерліха), доданими в пробу крові. Некон'югований (непрямий, вільний) білірубін нерозчинний у воді і для його визначення необхідні додаткові реактиви [36].

У нормі за добу в організмі людини виробляється 250-350 мг білірубіну. Вироблення понад 30-35 мкмоль/л проявляється жовтячністю шкірних покривів та склер. За механізмом розвитку жовтяниці та переважанням фракцій білірубіну в крові виділяють надпечінкову (гемолітичну), печінкову (паренхіматозну) або підпечінкову (механічну, обтураційну) жовтяницю [35].

При підвищеному руйнуванні еритроцитів (гемолізі) або порушеному захопленні печінкою жовчного пігменту збільшується вміст білірубіну за рахунок некон'югованої фракції без підвищення рівня зв'язаного пігменту (надпечінкова жовтяниця). Дана клінічна ситуація спостерігається при деяких вроджених станах, пов'язаних із порушенням кон'югації білірубіну, наприклад, при синдромі Жильбера [41].

За наявності перешкоди на шляху виходу жовчі у дванадцятипалу кишку чи порушеннях жовчовиділення у крові підвищується прямий білірубін, що нерідко є ознакою обтураційної (механічної) жовтяниці. При обструкції жовчовивідних шляхів прямий білірубін потрапляє в кров, а потім і в сечу. Він є єдиною фракцією білірубіну, здатної виділятися нирками та забарвлювати сечу у темний колір [33].

Збільшення білірубіну за рахунок прямої та непрямой фракції вказує на захворювання печінки з порушенням захоплення та виділення жовчних пігментів. Підвищення непрямого білірубіну нерідко спостерігається у новонароджених у перші 3 дні життя. Фізіологічна жовтяниця пов'язана з

підвищеним розпадом еритроцитів із фетальним гемоглобіном та недостатньою зрілістю ензимних систем печінки.

Некон'югований білірубін має токсичну дію на клітини нервової системи і може призвести до пошкодження головного мозку [34].

Отже, за визначенням рівня прямого або непрямого білірубіну можна проаналізувати стан органів гепатобіліарної системи – печінки та жовчного міхура, що є важливим при надходженні ксенобіотиків у організм з харчовими продуктами. З іншого боку, порушення функціонального стану печінки знизить детоксикаційні процеси в організмі.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт і методи досліджень

Експериментальні дослідження проводились на білих безпородних щурах масою 130-150 г. Усіх дослідних тварин утримували на стандартному раціоні віварію, збалансованому за всіма необхідними мікро- та макроелементами. Тваринам не обмежували доступ до води.

Утримання щурів та всі маніпуляції з ними проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та згідно положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

В експерименті використано 48 тварин, які були поділені на 4 групи по 12 тварин у кожній групі:

- I група – інтактні тварини (контрольна);
- II група – щурі, яким щоденно вводили АК;
- III група – щурі, яким щоденно вводили NaB;
- IV – щурі, яким щоденно вводили NaB за 30 хв до введення АК.

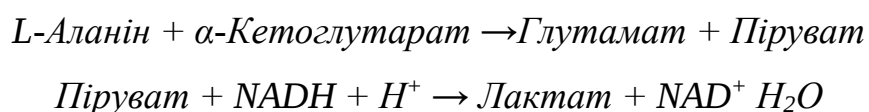
NaB тваринам вводили *per os* щоденно у дозі 750 мг на кг маси тварин. АК вводили в дозі 30 мг на кг маси тварин. Введення харчових добавок здійснювали протягом 21-ї доби.

Евтаназію тварин проводили під ефірним наркозом на 21-шу добу після початку застосування харчових добавок. Забір крові здійснювали у скляні центрифужні пробірки з сонної артерії щурів. Для виділення сироватки крові проби піддавали центрифугуванню при 1500 об / хв протягом 10 хв. У виділеній сироватці крові визначали маркери функціонального стану гепатобіліарної системи – ензимні активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ), рівень загального і прямого білірубіну, тимолову пробу.

Визначення біохімічних показників здійснювали на автоматичному біохімічному аналізаторі HTI BioChem FC-120.

Визначення аланінамінотрансферазної активності проводили за швидкістю зниження концентрації NADH.

Принцип методу: АЛТ каталізує перенесення аміногрупи з аланіну на α -кетоглутарат з утворенням глутамату і пірувату. Утворений піруват відновлюється до лактату за дії ензиму лактатдегідрогенази при цьому окислюється NADH до NAD^+ , відбувається за наступними реакціями:



Швидкість зниження концентрації NADH вимірюють фотометрично, що прямо пропорційно активності АЛТ, яка визначається у зразку [42].

Реагенти:

R1 – буфер: трис (100 ммоль/л, pH=7,5), Лактатдегідрогеназа (1200 Од/л), L-Аланін (500 ммоль/л);

R2 – субстрат: NADH (0,18 ммоль/л), α -Кетоглутарат (15 ммоль/л).

Процедура визначення

1. Приготувати робочий реагент АЛТ відповідно до інструкції.
2. Внести по 1 мл робочого розчину в пробірки з написом «контроль», «дослід».
3. Пробірки інкубувати при 37° С протягом не менше 5 хвилин.
4. Вставити бланк по дистильованій воді при 340 нм.
5. Додати 100 мкл виворотки крові у відповідну пробірку, перемішати і поставити в термостат.
6. Зчитати і записати поглинання через 1 хвилину. Продовжити інкубувати при 37° С і знову виміряти поглинання через 2 і 3 хвилини. Швидкість повинна бути постійною.
7. Визначити середню оптичну щільність в хвилину ($\Delta A / \text{хв}$), помножити на коефіцієнт 1768.

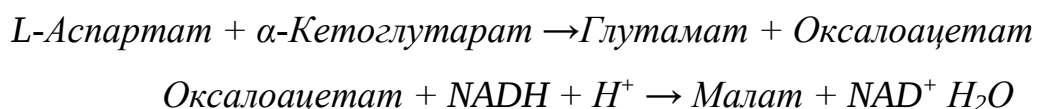
Розрахунок

$$\Delta A / \text{хв.} \times 1768 = \text{Од} / \text{л для АЛТ}$$

Одиниці: одна міжнародна одиниця (МО) кількість ензиму, який перетворює 1 мкмоль субстрату в хвилину в стандартних умовах. Концентрація виражається в одиницях на літр зразка (Од / л).

Визначення аспартатамінотрансферазної активності проводили за швидкістю зниження концентрації NADH.

Принцип методу: АСТ каталізує перенесення аміногрупи з аспартату на α -кетоглутарат з утворенням глутамату і оксалоацетату. Утворений оксалоацетат відновлюється до малату за дії ензиму малатдегідрогенази при цьому окислюється NADH до NAD^+ , відбувається за наступними реакціями:



Швидкість зниження концентрації NADH вимірюють фотометрично, що прямо пропорційно активності АЛТ, яка визначається у зразку [42].

Реагенти:

R1 – буфер: трис (80 ммоль/л, pH=7,8), Лактатдегідрогеназа (800 Од/л), Малатдегідрогеназа (600 Од/л), L-Аспартат (200 ммоль/л);

R2 – субстрат: NADH (0,18 ммоль/л), α -Кетоглутарат (12 ммоль/л).

Процедура визначення

1. Приготувати робочий реагент відповідно до інструкції.
2. Внести по 1 мл робочого розчину в пробірки з написом «контроль», «дослід». Пробірки проінкубувати при 37° С протягом 1 хвилини.
4. Через 1 хв знітайте і запишіть поглинання при 340 нм проти бланка по дистильованій воді. Вимірюйте поглинання кожну хвилину протягом наступних 2 хвилин.
5. Визначте середню оптичну щільність в хвилину ($\Delta A / \text{хв}$).

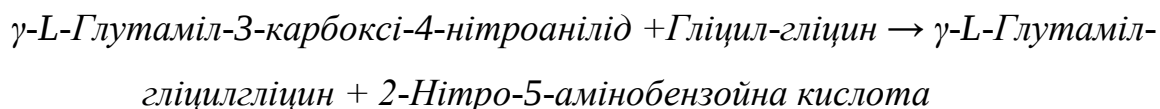
6. Помножте результат на коефіцієнт 1768 (фактор) для отримання результату в Од/л.

Розрахунок

$$\Delta A / \text{хв.} \times 1768 = \text{Од} / \text{л для АСТ}$$

Визначення ензимної активності γ -глутамілтрансферази.

Принцип методу: ГГТ пришвидшує перенесення γ -глутамілу від γ -глутаміл-п-нітроаніліда до гліцин-гліцину відповідно до рівнянь реакцій:



Швидкість утворення 2-нітро-5-амінобензойної кислоти вимірюють фотометрично, що прямо пропорційно активності ГГТ, яка визначається у зразку [43].

Реагенти:

R1 – буфер: трис (100 ммоль/л, рН=8,6), Гліцил-гліцин (100 ммоль/л);

R2 – субстрат: -L-Глутаміл-3-карбокси-4-нітроанілід (3 ммоль/л).

Процедура визначення

1. Приготувати робочий реагент ГГТ відповідно до інструкції.
2. Вставити бланк по дистильованій при 405 нм.
3. Внести по 1 мл робочого розчину в пробірки з написом «контроль», «дослід». Пробірки проінкубувати при 37° С протягом 3 хвилин.
4. Додати 100 мкл сироватки у відповідну пробірку, перемішати, вставити у термостат.
5. Зчитати і записати поглинання через 1 хвилину. Продовжити інкубацію при 37° С і знову виміряти поглинання через 2 і 3 хвилини. Швидкість повинна бути постійною.
6. Визначити середню оптичну щільність в хвилину ($\Delta A / \text{хв}$)

Через 1 хв знімайте і запишіть поглинання при 340 нм проти бланка по дистильованій воді. Вимірюйте поглинання кожну хвилину протягом

наступних 2 хвилин. Помножити результат на коефіцієнт 1158 (фактор) для отримання результату в Од/л

Якщо кювета не термостатується, інкубуйте зразки між вимірами при 37° С.

Розрахунок

$$\Delta A / \text{хв.} \times 1158 = \text{Од} / \text{л для ГГТ.}$$

Визначення загального білірубіну в сироватці крові

Принцип методу: Білірубін реагує з діазотованою сульфаніловою кислотою з утворенням азобілірубіна, що дає максимум поглинання при 560 нм в розчині диметилсульфоксиду (ДМСО). Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації загального білірубіну, присутнього у зразку [44].

Реагенти:

R1 – реагент загального білірубіну: сульфанілова кислота (32 ммоль/л, соляна кислота (165 ммоль/л), ДМСО (7 моль);

R2 – нітритний реагент білірубіну: нітрит натрію (60 ммоль/л);

R3 – калібратор білірубіну: сіль N-1-нафтилетилендіамін дигідрохлорид 5 мг/дл (85,5 мкмоль/л).

Процедура визначення

1. Промаркувати пробірки: «холоста», «стандарт», «контроль», «дослід». Кожна пробірка потребує холостої проби за зразком.
2. Внести 1 мл реагенту загального білірубіну в усі холості проби.
3. Приготувати робочий реагент згідно інструкції.
4. Внести 1 мл робочого реагенту в марковані пробірки, але не в холості проби.
5. Внести 0,1 мл кожного стандарту, контролю і зразка у відповідну пробірку. Добре перемішати.
6. Інкубувати усі пробірки протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.

7. Налаштувати вимірювальний прилад на довжину хвилі 560 нм. Встановити нуль по холостій пробі реагенту (діапазон довжин хвиль: 540-560 нм). Виміряти і зафіксувати поглинання у всіх пробірках.

Примітка щодо виконання процедури вимірювання.

1. Забарвлення, що з'явилося по закінченню реакції, стабільне протягом 60 хв.

2. Якщо для точності вимірювань спектрофотометра потрібні проби з кінцевим об'ємом, що перевищує 1 мл, то можна використовувати 3 мл реагенту і 0,2 мл зразка.

Застереження: 1. Гемоліз впливає на результат аналізу, тобто гемолізовані зразки не слід використовувати для вимірювань, так як можна отримати зниженні значення; 2. Всі зразки для аналізу повинні бути ретельно захищені від світла; 3. Білірубін в сироватці стабільний протягом 4-7 днів при зберіганні в темряві при 2-8 °С.

Розрахунок

Abs = поглинання

Загальний білірубін (мг / дл): (мкмоль / л):

$$(Abs \text{ зразка} - Abs \text{ хол. проби}) / (Abs \text{ калібратора} - Abs \text{ хол. проби калібратора}) \times \text{Конц. калібратора.}$$

Визначення прямого білірубіну в сироватці крові.

Принцип методу: Білірубін реагує з діазотованою сульфаніловою кислотою з утворенням азобілірубіна, що дає максимум поглинання при 560 нм у водному розчині. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації прямого білірубіну, присутнього у зразку [44].

Реагенти:

R1 – реагент основний: сульфанілова кислота (32 ммоль/л, соляна кислота (165 ммоль/л);

R2 –реагент нітриту білірубіну: нітрит натрію (60 ммоль/л);

R3 – калібратор білірубін: сіль N-1-нафтилетилендіамін дигідрохлорид 5 мг/дл (85,5 мкмоль/л).

Процедура визначення

1. Промаркувати пробірки: «холоста», «стандарт», «контроль», «дослід». Кожна пробірка потребує холостої проби за зразком. Тобто для кожної пробірки готується 2 пробірки з нітритом і без нього.

2. Внести 1 мл реагенту прямого білірубін у усі холості проби.

3. Приготувати робочий реагент згідно інструкції.

4. Внести 1 мл робочого реагенту в марковані тест пробірки.

5. Внести 0,1 мл кожного стандарту, контролю і зразка у відповідну пробірку. Добре перемішати та інкубувати усі пробірки протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.

6. Налаштувати вимірювальний прилад на довжину хвилі 560 нм. Встановити нуль по холостій пробі реагенту (діапазон хвиль: 540-560 нм).

7. Виміряти і зафіксувати поглинання у всіх пробірках.

Примітка щодо виконання процедури вимірювання.

Розрахунок

Abs = поглинання

Загальний білірубін (мг / дл): (мкмоль / л):

$$\frac{(Abs \text{ зразка} - Abs \text{ хол. проби})}{(Abs \text{ калібратора} - Abs \text{ хол. проби калібратора})} \times \text{Конц. Калібратора} = \text{Концентрація прямого білірубін у зразку (мг/дл) (мкмоль/л)}$$

Методика визначення тимолової проби.

Тимоловая проба – це аналіз, що належить до групи осадових проб. Він ґрунтується на визначенні білків крові, які з'являються в аномально високій концентрації при пошкодженні печінки. Суть методики полягає у додаванні до однієї одиниці сироватки крові до 60 одиниць пересиченого тимолу.

Принцип методу: Сироваткові β-глобуліни, γ-глобуліни і ліпопротеїни осаджуються тимолом в трис-малеатному буфері при рН 7,55. Інтенсивність

помутніння, яка залежить від кількості та взаємного співвідношення окремих білкових фракцій, вимірюється турбодиметрично при довжині хвилі 650 (630-690) нм. Результати вимірювань виражаються в одиницях помутніння по Shank-Noagland (од. S-H). Калібрування здійснюється за суспензією сульфату барію [45].

Реагенти:

R1 – концентрат розчину тимолу, 11 мл С3 флакона;

R2 – розчин сірчаної кислоти (2,5 моль/л), 10 мл 1 флакон;

R2 – розчин хлориду барію (48 ммоль/л), 5 мл 1 флакон.

Процедура визначення

1. У пробірку внести 3 мл тимолового реактиву і додати 0,05 мл сироватки (плазми) крові.

2. Ретельно перемішати та інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (+18-25° С).

3. Безпосередньо перед вимірюванням вміст пробірки ще раз перемішати і виміряти величину оптичної щільності проби при довжині хвилі 650 (630-690) нм в кюветі з товщиною поглинаючого світлового шару 10 або 5 мм проти холостої проби (тимолового реактиву).

4. Величину інтенсивності помутніння визначити за калібрувальним графіком. Для побудови калібрувального графіка внести в пробірки розчин сірчаної кислоти та суспензію калібрування сульфату барію у відповідних кількостях.

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів, які отримані під час дослідження проводили на персональному комп'ютері. Під час підрахунку використовували пакет аналізу табличного редактора “Excel 2000 for Windows”. При обробці результатів застосовували t-критерій Стьюдента. Статистично достовірними вважали результати, коли $p \leq 0,05$ [46].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Масове збільшення використання штучних консервантів у продуктах харчування та бажання споживати оброблені харчові продукти викликає необхідність постійно вивчати можливий вплив консервантів на живі клітини [6].

Після поглинання клітинами NaB може впливати на анаеробні шляхи генерації енергії та пригнічувати проліферацію клітин. Саме ця властивість робить NaB бактеріостатичним і фунгістатичним засобом, який у кислих середовищах пригнічує розвиток мікроорганізмів, що псують харчові продукти [47]. Відкритими залишаються механізми впливу NaB на клітини печінки, як основного гомеостатичного органу організму.

Функції печінки спрямовані на підтримання гомеостазу в організмі, оскільки цей орган виконує знешкоджувальні, захисні, ензимні та видільні функції. Печінка бере участь не тільки у процесах травлення, а й у процесах кровотворення. У печінці здійснюються основні етапи білкового, вуглеводного, жирового, мінерального обмінів і обміну вітамінів [11].

Роль печінки в обміні білків полягає у метаболізмі амінокислот, синтезі білків і утворенні сечовини. Процес дезамінування амінокислот відбувається тільки в печінці, у процесі чого утворюються кетокислоти, які зазнають подальших перетворень. Основний шлях знешкодження аміаку – синтез сечовини у клітинах печінки. Печінка відіграє важливу роль у синтезі білків плазми крові [32].

У печінці відбувається розщеплення жирів з утворенням кетонових тіл, синтезується холестерол, який служить попередником стероїдних гормонів. У печінці депонується багато вітамінів (D, E, K), а також активуються деякі вітаміни (B₁, B₂ і B₆). Жиророзчинні вітаміни всмоктуються в кишечнику тільки за наявності жовчних кислот. У печінці депонується залізо, мідь, цинк. Печінка бере також участь в обміні деяких мікроелементів [18].

Функціональний стан печінки оцінювали за активністю амінотрансфераз у сироватці крові – АЛТ та АСТ.

Результати проведених досліджень показали, що тритижневе введення NaB у дозі 700 мг на кг маси тварин призводить до підвищення активностей досліджуваних амінотрансфераз у сироватці крові. Так, ензимна активність АЛТ у 1,9 рази перевищувала значення контрольної групи тварин ($p \leq 0,05$) (рис.3.1). Підвищення рівня АЛТ у сироватці крові є прямим наслідком вивільнення з гепатоцитів, оскільки вивільнена АЛТ переміщується до внутрішньодолькових просторів, а потім в кров [48]. Потрапляння АЛТ у сироватку крові може бути наслідком загибелі гепатоцитів. Оскільки ензим локалізується в мітохондріях, то гіперферментемія також може бути результатом пошкодження мітохондрій з або без подальшої загибелі гепатоцитів.

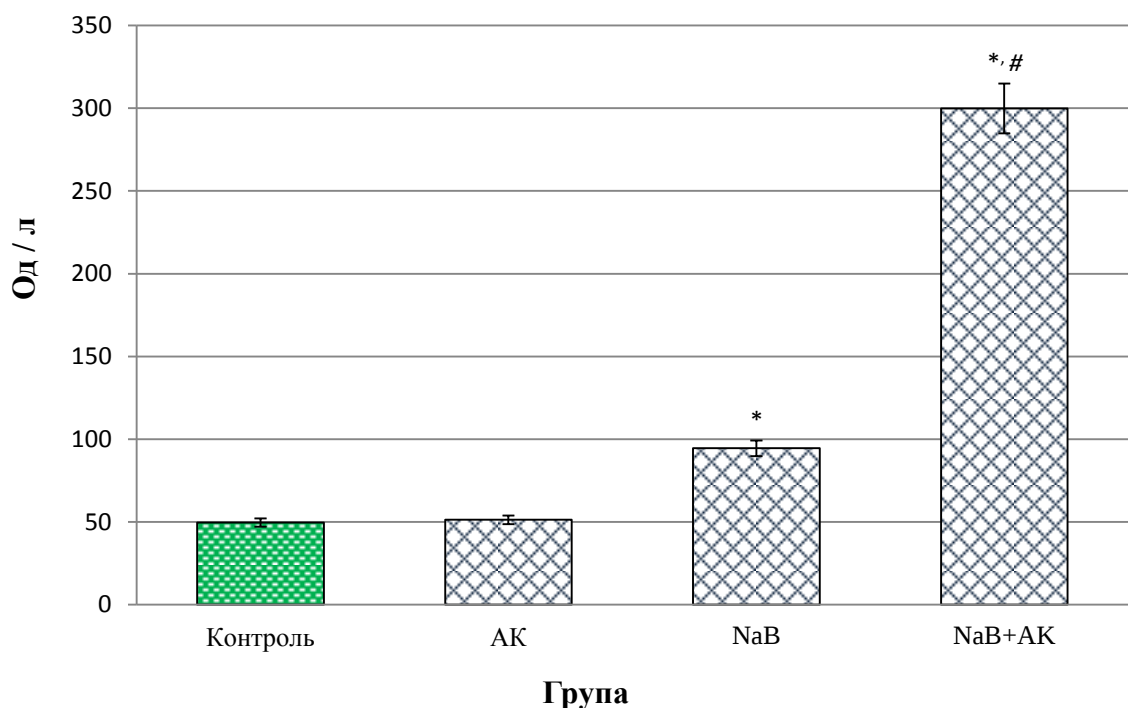


Рис.3.1. Аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

*Примітка (тут і надалі): АК – щурі, яким вводили аскорбінову кислоту; NaB – щурі, яким вводили бензоат натрію; NaB+АК – щурі, яким вводили бензоат натрію та аскорбінову кислоту щоденно з інтервалом 30 хв; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками інтактних тварин; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками щурів, яким вводили бензоат натрію ($p \leq 0,05$).*

Щодо аспартатамінотрансферазної активності, то активність цього ензиму підвищувалася у 1,3 рази в умовах введення в організм бензоату натрію порівняно з контролем ($p \leq 0,05$) (рис.3.2).

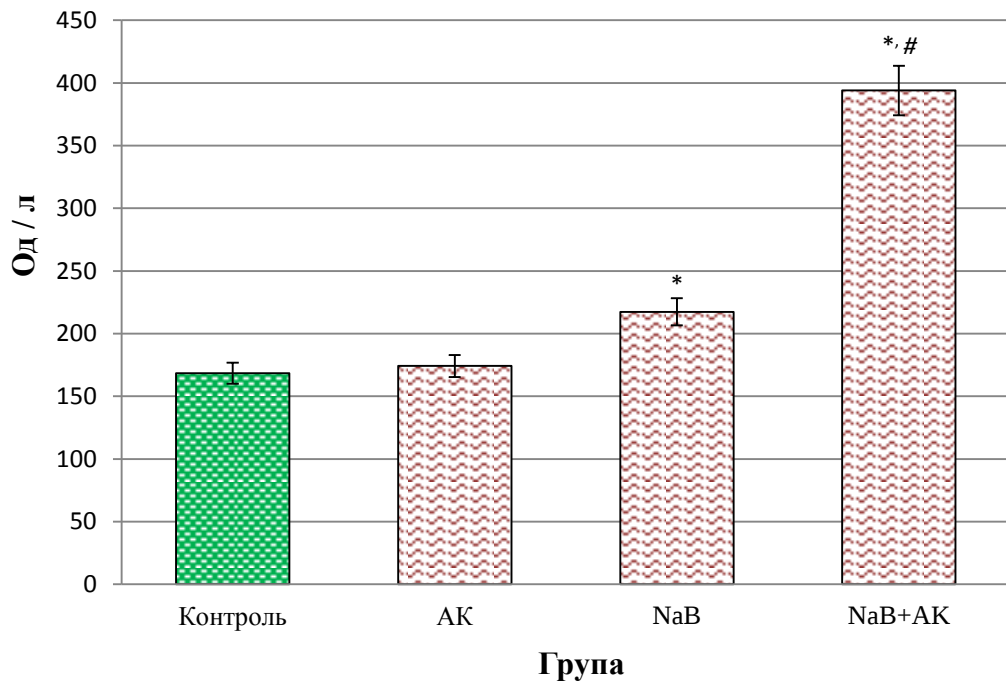


Рис.3.2. Аспартатамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Вивільнення АСТ у сироватку крові за дії NaB може бути результатом двох окремих процесів – пасивне вивільнення як результат загибелі клітин печінки та вивільнення через порушення плазмолемі гепатоцитів.

Оскільки АСТ також є маркером пошкодження кардіоміоцитів, то щоб перевірити причину гіперферментемії цього ензиму нами визначено коефіцієнт де Рітиса – співвідношення активностей АСТ до АЛТ, яке часто використовують у диференційній діагностиці уражень печінки чи серця, оскільки його зростання характерне для ушкодження міокарду, а зниження вказує на ушкодження печінки.

Результати проведених досліджень показали, що у тварин яким вводили NaB різко знижується співвідношення АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітиса) порівняно із відповідним показником контрольної групи щурів

(рис.3.3). Так, коефіцієнт де Рітиса знижений у 1,9 рази порівняно з показником інтактних тварин ($p \leq 0,05$) (рис.3.3). Зменшення коефіцієнта де Рітиса вказує на порушення функціональної активності печінки, оскільки гіперферментемія АЛТ перевищує гіперферментемію АСТ.

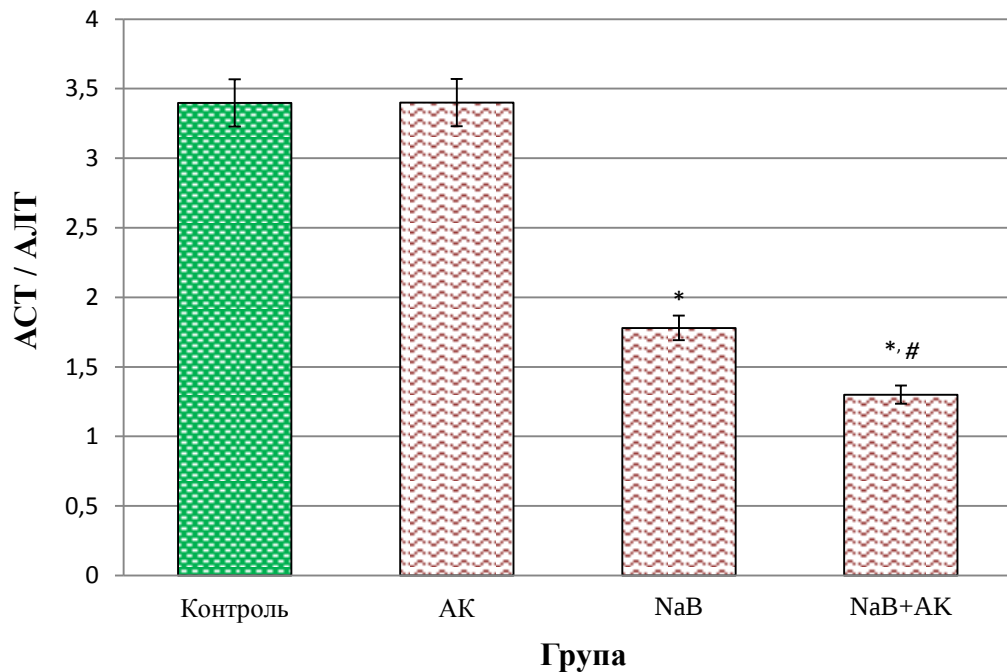


Рис.3.3. Співвідношення АСТ/АЛТ у тварин, яким вводили бензоат натрію й аскорбінову кислоту

Отже, виявлена гіперферментемія трансаміназ вказує на пошкодження клітин печінки, а свідчення цитолізу – надходження ензимів у кров, що результується збільшенням їх активності [49]. Дисфункціонування печінки, ймовірно, викликано утвореними продуктами метаболізму NaB, оскільки досліджуваний консервант метаболізується в організмі до продуктів, які здатні викликати пошкодження мітохондріальної ДНК [50].

Більш деструктивні процеси в печінці спостерігалися за умов комплексного введення NaB й аскорбінової кислоти. Аналіз результатів показав посилення гіперферментемії амінотрансфераз після тритижневого введення комплексу цих консервантів (рис.3.1, рис.3.2). Так, рівень активності АЛТ у сироватці крові у 6 разів перевищував показник інтактних

тварин (рис.3.1). Водночас, суттєвіше підвищення спостерігалось і для АСТ, оскільки аспартатамінотрансферазна активність в сироватці крові тварин у 2,3 рази перевищувала показник контролю (рис.3.2). При цьому коефіцієнт де Рітиса знижувався у 2,6 рази порівняно з показником групи контролю (рис.3.3).

Імовірно, токсичність комбінованого впливу NaB й аскорбінової кислоти зумовлена їхньою взаємодією в організмі, у результаті чого утворюється канцерогенна речовина – бензол, який проявляє токсичну дію на печінку [51]. При цьому аскорбінова кислота втрачає свої антиоксидантні властивості. У печінці за дії комбінації цих консервантів можуть виникати запальні процеси за рахунок значного збільшення маркерів прозапальних цитокінів (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β та IL-6) [52].

Отже, за умов комплексного введення NaB й аскорбінової кислоти посилюється шкідливий вплив ксенобіотичної сполуки NaB на печінку.

Оскільки до гепатобіліарної системи входить і жовчний міхур, то порушення роботи печінки може вплинути на функціональний стан роботи жовчного міхура, маркерами чого є концентрація фракцій білірубину у сироватці крові. Окрім того концентрацію білірубину в сироватці крові можна використовувати як маркер скринінгу стану печінки [53].

Загальний білірубін – це сума проміжних продуктів метаболізму гемоглобіну, що містяться у сироватці крові: непрямого та прямого білірубину. Білірубін – жовтий гемохромний пігмент, що утворюється внаслідок розпаду гемоглобіну, міоглобіну та цитохромів у ретикулоендотеліальній системі селезінки та печінки. Білірубін – один із основних компонентів жовчі, що міститься у сироватці у вигляді двох фракцій: прямого (зв'язаного або кон'югованого) та непрямого (вільного або незв'язаного) білірубину [41].

Результати досліджень показали, що за умов введення в організм NaB у сироватці крові щурів у 2,2 рази підвищувався рівень загального білірубину порівняно з показниками контролю (рис.3.4).

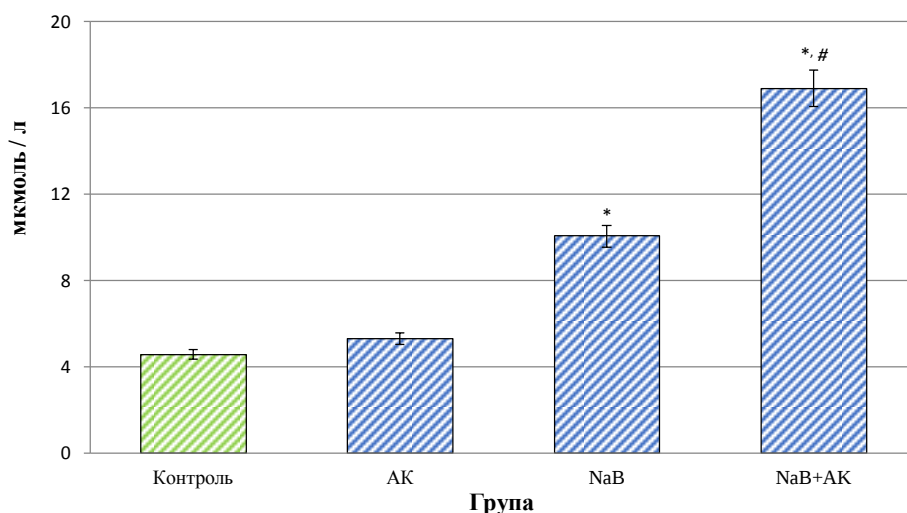


Рис.3.4. Рівень загального білірубіну в сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

При розпаді гемоглобіну спочатку утворюється вільний білірубін. Він практично нерозчинний у воді, ліпофільний і тому легко розчиняється в ліпідах мембран, проникаючи в мембрани мітохондрій та порушуючи метаболічні процеси у клітинах, високотоксичний. Білірубін транспортується з селезінки до печінки в комплексі з альбуміном. У печінці вільний білірубін зв'язується з глюкуроновою кислотою. В результаті цього утворюється кон'югований (прямий), водорозчинний, менш токсичний білірубін, що активно проти градієнта концентрації екскретується в жовчні протоки [41].

Аналіз рівня прямого білірубіну показав його підвищення у 1,4 рази порівняно з показниками групи інтактних тварин ($p \leq 0,05$) (рис.3.5a), а непрямого у 2,4 рази (рис.3.5б).

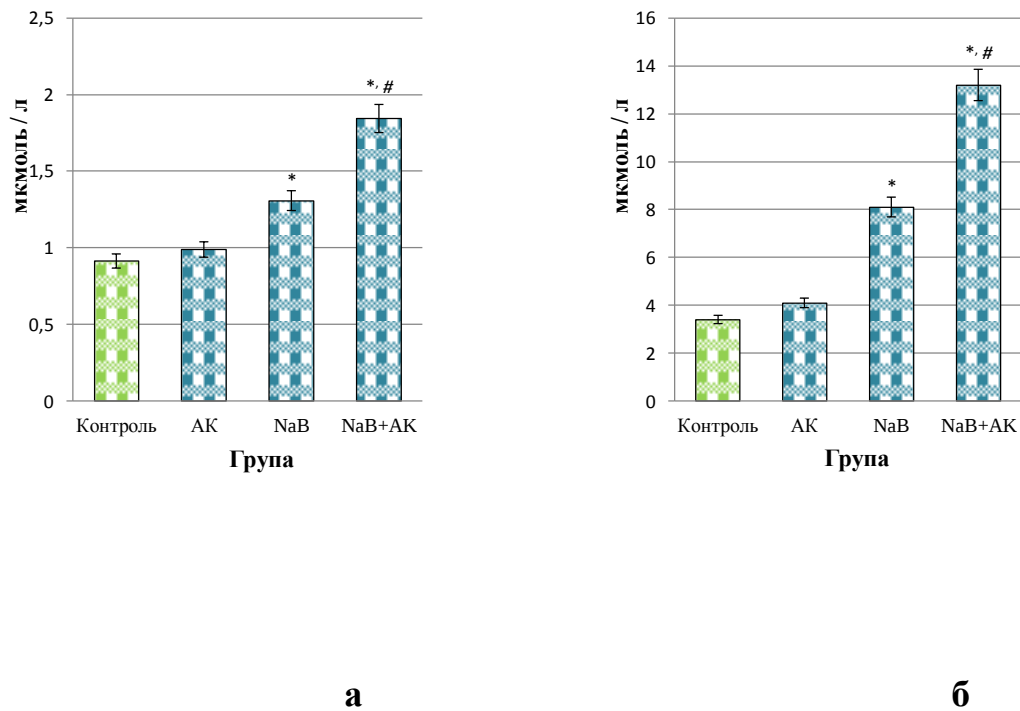


Рис.3.5. Рівень прямого (а) і непрямого (б) білірубіну в сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Підвищення рівня загального, прямого і непрямого білірубіну вказує на порушення функцій органів гепатобіліарної системи за умов введення NaB. Встановлені зміни можуть відбуватися в результаті розвитку внутрішньопечінкового холестазу, а також у результаті зниження печінкового кліренсу білірубіну. Окрім того, вільний білірубін відноситься до токсичних ліпофільних речовин, тому може проникати через мембрани органел і порушувати метаболічні процеси в клітинах [53].

За умов комплексне введення NaB й аскорбінової кислоти виявлено більш суттєве підвищення рівня загального, прямого і непрямого білірубіну в сироватці крові. Так, концентрація загального білірубіну підвищувалася у 3,7 рази (рис.3.4), прямого – у 2,4 рази (рис.3.5а), а непрямого – у 4 рази порівняно з показниками інтактних тварин ($p \leq 0,05$) (рис.3.5б). Як видно з результатів, рівень загального білірубіну підвищувався більшою мірою ніж прямого білірубіну, що, імовірно, вказує на те, що загальний білірубін підвищується за рахунок фракції саме непрямого білірубіну [54].

Встановлений факт може свідчити про порушення процесів глюкуронування у печінці за дії NaB й аскорбінової кислоти, а підвищення концентрації прямого білірубину в сироватці крові свідчить про порушення відтоку жовчі у жовчовивідних шляхах. Рівні сироваткового білірубину зростають тоді, коли його продукція перевищує його метаболізм та виведення з організму.

Отже, за умов як моноведення NaB, як і його введення з аскорбіновою кислотою в печінці відбувається порушення метаболізму білірубину, а гіпербілірубінемія розвивається за рахунок підвищення обох фракцій. Концентрація вільного білірубину в крові, імовірно, зростає у зв'язку з функціональною недостатністю гепатоцитів і/або зниженням їх кількості. В той же час, рівень зв'язаного білірубину зростає за рахунок збільшення проникності мембран клітин печінки і/або через порушення секреції з жовчю. Все це вказує на ураження паренхіми печінки [53].

Іншим маркером стану гепатобіліарної системи є гіперферментемія ГГТ. Результати проведених досліджень показали підвищення ензимної активності ГГТ у плазмі крові як за умов моноведення NaB (у 1,7 рази), так і під час введення NaB з АК (у 2,8 рази) порівняно з інтактними тваринами ($p \leq 0,05$) (рис.3.6).

Підвищення γ -глутамілтрансферазної активності в сироватці крові вказує на пошкодження клітин печінки [49], оскільки ГГТ у великій кількості локалізована на плазмолемі клітин печінки. Як видно з результатів більш виражену мембранодеструктивну дію NaB проявляє за умов його одночасного введення в організм з аскорбіновою кислотою.

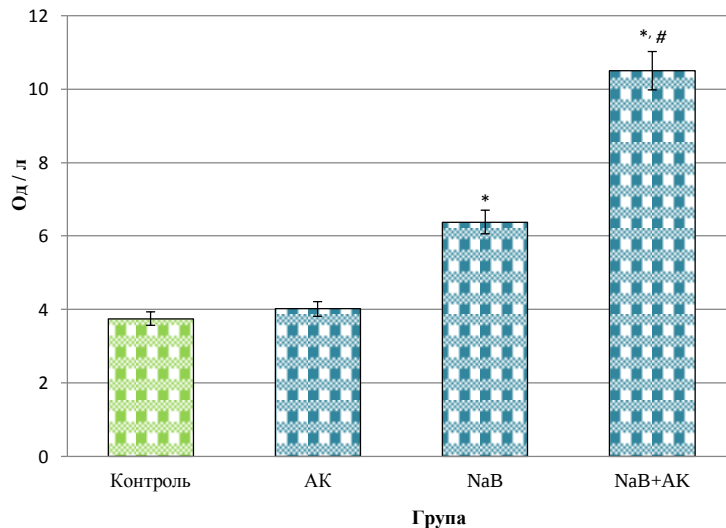


Рис.3.6. Ензимна активність γ -глутамілтрансферази в сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Виявлена нами гіперферментемія АЛТ, АСТ і ГГТ, а також підвищенні рівні фракцій білірубину в сироватці крові вказують на порушення функціонального стану органів гепатобіліарної системи, зокрема печінки. Щоб перевірити це припущення, для оцінки білок-синтетичної функції печінки визначено показник тимолової проби.

Результати проведених досліджень показали, що хронічне введення високих концентрацій NaB призводило до підвищення показника тимолової проби у 2,4 рази на 21-й день експерименту ($p \leq 0,05$) (рис.3.7). Порушення білок-синтетичної функції печінки щурів посилюється за умов введення NaB й аскорбінової кислоти, оскільки показник тимолової проби у 3,2 рази перевищував відповідний показник контролю ($p \leq 0,05$) (рис.3.7).

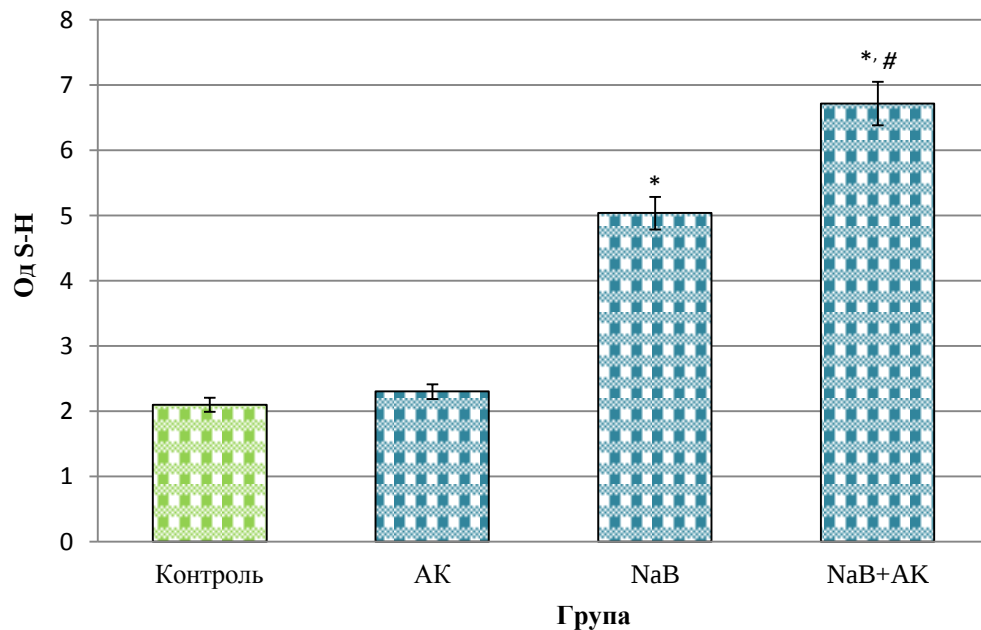


Рис.3.7. Рівень тимолової проби у крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Імовірно, за поєднаного введення в організм NaB й аскорбінової кислоти утворюється продукт їхньої взаємодії – бензол, у результаті чого відбувається зміна балансу синтезу протеїнів, при цьому в крові зменшується кількість альбуміну. Це призводить до швидшого осадження інших фракцій, а саме β - і γ -глобулінів, при взаємодії з тимолом [49, 54].

Отже, хронічне введення в організм NaB й аскорбінової кислоти призводить до порушення функціонального стану органів гепатобіліарної системи. Це в організмі відображається відповідними наслідками для здоров'я, яке включає дисфункцію печінки. Тритижневе введення в організм високих доз NaB супроводжується дисфункціонуванням органів гепатобіліарної системи щурів, про що свідчить порушення білок-синтетичної функції печінки та вихід АЛТ, АСТ і ГГТ у кров'яне русло, а також підвищення рівня різних фракцій білірубину в сироватці крові. Введення аскорбінової кислоти з NaB посилює гепатотоксичність NaB.

ВИСНОВКИ

1. Підвищення ензимних активностей АЛТ, АСТ, ГГТ та рівнів загального і прямого білірубину в сироватці крові вказує на зміни функціонального стану печінки щурів після тритижневого введення бензоату натрію.

2. Введення аскорбінової кислоти з бензоатом натрію посилює гепатотоксичність останнього, оскільки гіперферментемія амінотрансфераз, ГГТ і гіпербілірубінемія перевищує показники групи щурів, яким вводили тільки бензоат натрію.

3. Підвищення показника тимолової проби в крові щурів вказує на порушення білково-синтетичної функції печінки щурів за дії бензоату натрію й аскорбінової кислоти.