

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

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

**ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У
МІТОХОНДРІАЛЬНІЙ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ
ВВЕДЕННЯ ДИЕТИЛФТАЛАТУ**

**Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістер)**

Виконала:
студентка 6_курсу, 600 М групи
Гусякова Анна Петрівна

Керівник:
кандидат біологічних наук,
доцент **Кеца О.В.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2023 р.
Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню впливу різних доз та термінів введення такого ксенобіотика як диетилфталат (ДЕФ) на інтенсивність вільнорадикальних процесів в мітохондріальній фракції печінки щурів та показаний їхній взаємозв'язок з активністю протеолітичних ензимів.

Під час дослідження було показано, що при щоденному вживанні в харчовий раціон ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тварин призводить до ініціації генерації гідроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$) та супероксидного радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), інтенсифікації процесів окиснювальної модифікації протеїнів (ОМП) у мітохондріальній фракції печінки. В роботі на це вказує зниження сульфгідрильних груп (SH-груп) протеїнів та одночасне підвищення рівня карбонільних похідних. Разом з цим, застосування ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин ініціює генерацію активних форм кисню (АФК) лише за тривалого введення ДЕФ, про що свідчить збільшення швидкості утворення $\text{O}_2^{\cdot-}$ і $\cdot\text{OH}$ та інтенсивності ОМП через 3 тижні після введення ксенобіотика. Крім того було показано, що активність протеолітичних ензимів у мітохондріальній фракції прямо залежить від ступеня ОМП, збільшуючись при незначних змінах маркерів ОМП.

Отримані дані можна розглядати, як порушення стану системи антиоксидантного стану організму тварин, що супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення протеїнів під дією ДЕФ.

Ключові слова: супероксидний радикал, гідроксильний радикал, окиснювальна модифікація протеїнів, SH-групи, карбонільні похідні, протеази, мітохондріальна фракція, печінка

ANNOTATION

The master's thesis is devoted to the study of the effect of different doses and timing of administration of the xenobiotic diethyl phthalate (DEP) on the intensity of free radical processes in the mitochondrial fraction of rats and shows their relationship with the activity of proteolytic enzymes.

The study showed that daily dietary intake or routine use of DEP at a dose of 5,4 mg/kg of animal weight leads to the initiation of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generation and intensification of OMP processes in the mitochondrial fraction of the liver. This is indicated by a decrease in sulfhydryl groups (SH-groups) of proteins and a simultaneous increase in the level of carbonyl derivatives. At the same time, the use of DEP at a dose of 2,5 mg/kg body weight initiates the generation of ROS only with prolonged administration of DEP, as evidenced by an increase in the rate of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OH}$ formation and the intensity of OMP 3 weeks after the administration of the xenobiotic. In addition, it was shown that the activity of proteolytic enzymes in the mitochondrial fraction directly depends on the degree of OMP, increasing with minor changes in OMP markers.

These data can be considered as one of the possible mechanisms of disruption of the antioxidant system in animals, accompanied by intensification of free radical oxidation of proteins under the influence of DEP.

Keywords: superoxide radical, hydroxyl radical, oxidative modification of proteins, SH-groups, carbonyl derivatives, proteases, mitochondrial fraction, liver.

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

А.П. Гусякова
(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Поняття про фталати	7
1.2. Диетилфталат та його метаболізм.	10
1.2.1. Метаболізм диетилфталату.	10
1.2.2. Дослідження токсичності ДЕФ.	11
1.3. Активні форми кисню	15
1.4. Окисна модифікація протеїнів.....	16
2. МЕТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	22
2.1. Об'єкти та методи досліджень	22
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	30
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	Ошибка! Закладка не определена.

ВСТУП

Нині характерна тенденція, до посиленого використання ксенобіотиків в промисловості для швидкості та зручності вироблення продукції для покращення якості продуктів харчування, що доволі часто втрачаються в процесі переробки продукції. Надмірне використання ксенобіотиків у різноманітних галузях, призводить до забруднення цими речовинами навколишнє середовище. Поширені джерела синтетичних забруднювачів у всьому світі включають антибіотики, пестициди, синтетичні стероїди, фармацевтичні препарати, фталати та іони неорганічних металів та їх комплекси [1]. Широке застосування саме фталатів створює небезпечний вплив не тільки на екологію, але і на організм людини та тварин [2].

Останніми роками диетилфталат (ДЕФ) є одним із найбільш часто використовуваних фталатів, широко використовуються як пластифікатори, добавки в багатьох споживчих товарах та засобах особистої гігієни [3, 4]. Цей ксенобіотик може накопичуватися в ґрунті та потрапляти в харчовий ланцюг людини [5]. Окрім того, ДЕФ майже всюди використовується в засобах особистої гігієни, косметичі, медичному обладнанні та фармацевтичних препаратах. ДЕФ вважається потенційним ендокринним руйнівником [6].

Ці сполуки здатні легко потрапляти в організм, за допомогою ковтання, взаємодією зі шкірою, у результаті чого вони порушують перебіг роботи багатьох систем організму, що в кінцевому результаті призводить до різноманітних захворювань. Однією із причин розвитку патологічних станів у організмі є ініціація вільнорадикальних процесів у результаті генерації активних форм кисню (АФК) мітохондріальними системами, що призводить до виникнення великої кількості патологій в організмі людини та тварини. Завдяки такому широкому застосуванню, вплив фталатів на

людину відбувається на всіх етапах життя, включаючи період вагітності та ранній постнатальний період [7].

Актуальність вибраної теми в тому, що продукти АФК та окисно модифікованих протеїнів мають тривалий період розпаду. Саме цей фактор може вказувати на них, як на перспективні маркери оцінки інтенсивності вільнорадикального окиснення самих біологічних систем. Це дає можливість діагностувати пошкодження тканин печінки.

Мета роботи: оцінити інтенсивність вільнорадикального окиснення протеїнів у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов впливу диетилфталату.

Завдання:

- Визначити швидкість утворення АФК за визначенням утворення супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) та гідроксильного радикала ($\cdot OH$) у мітохондріальній фракції печінки дослідних щурів за умов впливу диетилфталату.
- Дослідити інтенсивність ОМП за визначенням вмісту карбонільних похідних та шиффових основ у мітохондріальній фракції печінки дослідних щурів.
- Оцінити інтенсивність ОМП за визначенням вмісту протеїнових SH-груп у мітохондріальній фракції печінки дослідних щурів.
- Дослідити протеолітичну активність у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов впливу диетилфталату.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поняття про фталати

Фталати – це хімічні речовини, які використовуються в промисловому виробництві як пластифікатори, що забезпечують еластичність пластикових виробів [8]. Зростання кількості доказів ендокринних порушень викликало занепокоєння щодо постійного використання фталатів в оточенні людини [9]. Занепокоєння про здоров'я щодо шкідливого впливу фталатів на розвиток і репродуктивну систему для людини були підняті доволі нещодавно. Оскільки фталати сприяють прозорості, міцності, гнучкості та довговічності матеріалів, вони, як правило, широко використовуються у пластмасах, добривах, пестицидах, іграшках, косметичці та інших продуктах. Було встановлено, що приблизне споживання фталатів у 2017 році становило приблизно 65% світового споживання пластифікаторів, яке, як очікується, становитиме приблизно 60% світового споживання в 2022 році [10]. Світове споживання фталатів оцінюється в 3,07 млн тонн, глобальний попит на пластифікатори продовжує зростати і наступні роки [11]. Хоча фталати є лише добавкою у всі комерційні продукти, серед цих пластикових добавок вони є найбільш широко використовуються як пластифікатори для покращення пластичності та гнучкості пластикових виробів [12].

Пластифікатори легко виділялися з пластику в навколишнє середовище і стали важливим джерелом забруднення навколишнього середовища [13]. Важливо зазначити, що фталати не поєднуються у формі ковалентних зв'язків з пластиковими полімерами. Через це, вони легко можуть мігрувати з цих продуктів в навколишнє середовище через випаровування або вимивання. Після чого потрапляють в тканини або шлунок, що надалі може призвести до негативних наслідків для організму.

Взагалі вплив фталатів на людину може відбуватися різними шляхами. До прикладу, людське тіло може бути легко взаємодіяти з фталатами під

час орального впливу, тобто вживання лікарських препаратів або вживання продуктів, які були вирощені у забруднених фталатами місцями. Ці ксенобіотики дуже легко потрапляють до маленьких дітей, коли малеча кусає або смоче іграшки. Також, доросла людина та дитина може отримати певно дозу фталатів при вдиханні повітря, змішаного з цими речовинами, через контакт шкіри з пластиковими виробами, це можуть бути різноманітні засобами особистої гігієни, косметика, одяг або фарби, та навіть внутрішньовенне опромінення, пов'язане з медичним обладнанням, наприклад через медичні системи [14]. Крім цього, було доведено, що ці речовини можуть передаватися від матері до плоду через плаценту. Життя плоду є критичним в період розвитку, під час якого вплив будь-яких хімічних речовин може негативно вплинути на розвиток нервової системи та призвести до довготривалих наслідків для плоду [15]. Також науковці звертають увагу на дослідження, які показали, що фталати можуть впливати на гомеостаз щитовидної залози, сигналізацію кальцію, активацію рецепторів, що активуються проліфератором пероксисом, і метаболізм ліпідів, що є критично важливим для розвитку нервової системи [15].

Якщо говорити про метаболізм фталатів, то в організмі людини він доволі швидкий, так як фталати мають короткий період напіврозпаду, а саме: близько дванадцяти годин. Метаболізм фталатів поділяється на 2 етапи, як і в інших ксенобіотиків. Перший етап - гідроліз та другий - кон'югація, розглянемо ці етапи трішки детальніше.

Як зазначалося вище, після поглинання ксенобіотика тканинами організму, першим етапом метаболізму є гідроліз. Другим етапом є кон'югація з утворенням гідрофільного глюкуронідного кон'югату, який каталізується ферментом уридин-5'-дифосфоглюкуронілтрансферазою [16]. Тип фталатів визначає його токсикологічну дію в організмі.



Рис.1.1. Метаболізм фталатів [16].

Короткорозгалужені фталати, такі як диетилфталат (ДЕФ) часто гідролізуються до моноефірних фталатів, які виводяться із сечею, тоді як довгорозгалужені фталати в основному піддаються двом етапам біотрансформації, а потім виділяються з сечею та калом у вигляді кон'югованих сполук другої фази [16].

На сьогоднішній день більше як 25 типів фталатів задіяні у використанні для комерційних цілей, так як кожен з фталатів може надати продуктам унікальну якість. Використовують, такі види фталатів у споживчих продуктах: диметилфталат (ДМФ), диетилфталат (ДЕФ), дибутилфталат (ДБФ), бензилбутилфталат (БзБФ), дициклогексилфталат (ДЦГФ), ді-2-етилгексилфталат (ДЕГФ), діізобутилфталат (ДіБФ), діізононілфталат (ДіНФ), діізодецилфталат (ДіДФ), ді-н-гексилфталат (ДнГФ) і ді-н-октилфталат (ДнОФ) [17].

Всі зазначені фактори засвідчують, що на сьогоднішній день фталати все більше і більше своєї уваги привертають у науковців.

1.2. Диетилфталат та його метаболізм

Диетилфталат (ДЕФ) – це фталат із коротким алкільним ланцюгом, являється безбарвною маслянистою речовиною без запаху, з низькою молекулярною масою, використовується для покращення ефективності та довговічності багатьох продуктів [18]. Також цей ксенобіотик використовують у різноманітних продуктах, таких як: пластикові плівки, гуму, стрічки, зубні щітки, іграшки, ручки для інструментів та до компонентів в деяких автомобілях.

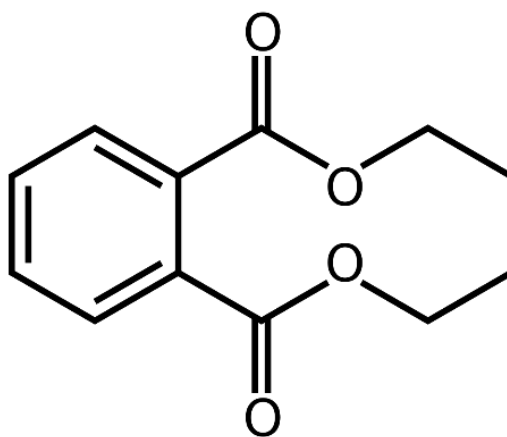


Рис.1.2. Структурна формула диетилфталату.

Крім пластику, ДЕФ присутній у широкому спектрі засобів особистої гігієни, в саме: косметика, парфумерія, лак для нігтів, спреї для волосся, миючий засіб мило та гелі для душу. Також можуть бути додатковими речовинами таких промислових матеріалів як упаковки, барвники, ракетне паливо та мастило. В медичних продукти: матеріалах для відбитків зубів та кишковорозчинні покриття на таблетках, особливо капсулах [19].

1.2.1. Метаболізм диетилфталату

Метаболізм диетилфталату після перорального введення щурам, призводить до гідролізу у фталатний моноефір, а саме - моноетилфталат.

Моноетилфталат або МЕФ є головним сечовим метаболітом і фталевою кислотою (ФК) як другорядним сечовим метаболітом ДЕФ [20]. У людей МЕФ є основним метаболітом після перорального введення диетилфталату.

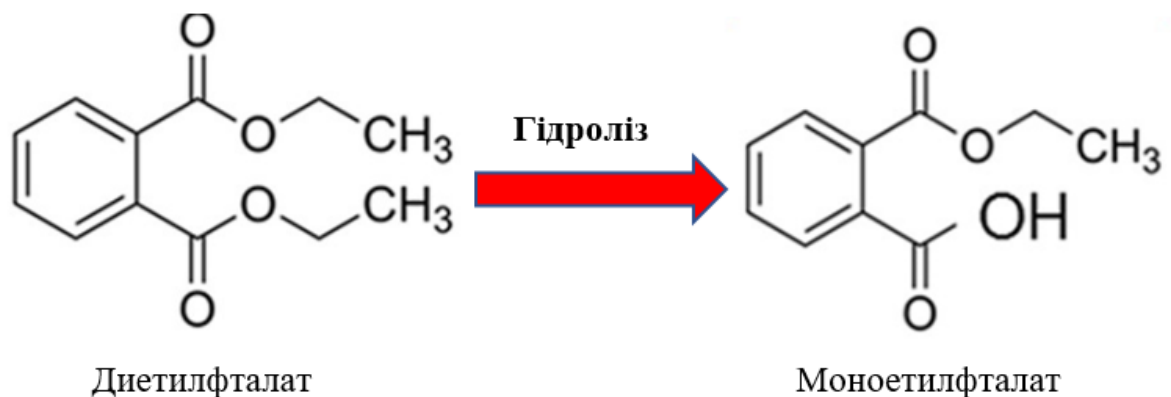


Рис.1.3. Метаболізм диетилфталату (ДЕФ)

Таким чином, можемо свідчити, що рівень моноетилфталату у сечі використовувався як біомаркер для оцінки експозиції ДЕФ у людей [20]. Розподіл ДЕФ та МЕФ в тканинах печінки, нирок, головного мозку, м'язів, тимуса, серця, шлунково-кишкового тракту, селезінки, легень, яєчок, та жирової тканини визначали вже через 24 години після введення препарату. Гідроліз продукту відбувається доволі швидко, так як моноетилфталат виводиться з організму із сечею. Різні дослідження показали, що протягом 12 годин виводиться 47% дози ДЕФ, протягом 24 годин 82% дози і протягом 48 годин після перорального прийому введення щурам виводиться 90% дози диетилфталату, яку було спожито. Незважаючи на цю тенденцію, рівень МЕФ, як правило, залишався вищим порівняно з іншими метаболітами фталату в сечі в різних вікових групах [19].

1.2.2. Дослідження токсичності ДЕФ

Аналізи даних біомоніторингу виявили, що саме ДЕФ забезпечує найвищий вплив з типу фталатів, на вагітних або жінок дітородного віку.

Цікаво, що основним джерелом впливу вважаються засоби особистої гігієни. ДЕФ часто призводить до утворення фталатного синдрому у плода, який характеризується недорозвиненням чоловічих репродуктивних органів, порушенням утворення сім'яного каналця, зниженням вироблення тестостерону в яєчках [19].

Дослідження токсичності ДЕФ показали, що даний ксенобіотик, може пригнічувати біохімічні та фізіологічні функції клітин, що призводить до загибелі клітин. Науковці констатують, що ДЕФ в організмі щурів призводить до проліферації мітохондрій, а також до накопичення глікогену, холестеролу та тригліцеридів у печінці, але вплив нижчих концентрацій протягом більш тривалого періоду (5 місяців) призводить до збільшення кількості пероксисом, що призводить до серйозних гепатоцелюлярних змін, які можуть бути підтверджені значним збільшенням маси печінки, підвищеним рівнем ферментів у сироватці крові та печінці та порушенням метаболізму глікогену, холестеролу та тригліцеридів, а також зміненою гістологією печінки у щурів [21]. Епідеміологічні дослідження показують зв'язок між впливом ДЕФ та негативними наслідками для здоров'я, таких як окислювальний стрес, діабет, алергічний ринокон'юнктивіт, астму та atopічний дерматит [22].

Крім цього в багатьох дослідженнях є підтвердження, що ДЕФ являється ендокринним руйнівником з репродуктивною токсичністю. МЕФ, як основний метаболіт ДЕФ, також є ендокринним руйнівником з репродуктивною токсичністю, подібний до ДЕФ [23]. Було доведено, що ендокринні руйнівники націлені переважно на рецептори гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи, таким чином негативно впливаючи на вироблення статевих гормонів, а саме андрогени та прогестерон. Так вони можуть впливати на нормальні гормональні функції, зв'язуючись із рецепторами стероїдних гормонів, активуючи відповідь клітини, що несе рецептор [24]. Ендокринні руйнівники можуть безпосередньо впливати на

розвиток статевих органів, як тератогени, під час внутрішньоутробного розвитку життя (крипторхізм, гіпоспадія, мікропеніс) і під час пізніх статевих подій (пубертатний, дорослий) як дефектний імпринтинг – функціональні тератогени, коли вплив відбувається перинатально або пізніше [25].

Вплив діетилфталату на еритроцити. Еритроцити вважають хорошими клітинами-мішенями, їх використовують для розуміння токсичності ксенобіотиків. Вплив ксенобіотиків спричиняє гемоліз або запрограмований ериптоз, що означає загибель клітин, для скорочення та зморщування клітин і переміщення клітинної мембрани, тобто, вплив фосфатидилсерину на поверхню клітини [26]. Завдяки своїй жиророзчинності ДЕФ проникає у мембрану еритроцитів і взаємодіє із гемоглобіном, змінюючи його структуру та функцію, викликаючи прискорене еритроцитарне виділення, зменшення еритроцитів і анемію [27].

Серед мішеней ДЕФ, безпосередньо є і репродуктивна система. Було показано, що диетилфталат має антиандрогенну дію на чоловіків, включаючи коротшу аногенітальну відстань та сильне пошкодження ДНК сперми [28]. У чоловічій репродуктивній системі фталати впливають на клітини Сертолі та клітини Лейдіга. Підвищена концентрація фталатів впливає на зниження фертильності та рухливості сперматозоїдів у чоловіків або навіть безпліддя [25]. Також, ДЕФ може викликати аномальну кількість головок і джгутиків у сперматозоїдах [25].

Якщо розглядати вплив ДЕФ на жіночу репродуктивну систему, було показано, що молоді жінки, які зазнали впливу фталатів, страждали передчасним статевим дозріванням [28]. Була також оцінена кореляція між ендометріозом і впливом фталатів. Ендометріоз відноситься до поширення тканин за межі порожнини матки. У деяких зразках сироватки крові у жінок з ендометріозом були виявлені підвищені концентрації певних фталатів. У

сечі деяких жінок було виявлено фталати, які в майбутньому можуть спричиняти ускладнення при вагітності [25]. Якщо розглядати можливість причетності ДЕФ до раку молочної залози, то ця хвороба вважається гормональним захворюванням. Враховуючи гормональні руйнівні властивості ДЕФ та його широке поширення через використання засобів особистої гігієни та споживчих товарів, існує потреба систематично спостерігати, чи ДЕФ може впливати на розвиток раку молочної залози [28]. Провівши наукове дослідження за участю жінок був знайдений зв'язок між впливом МЕФ і підвищеним ризиком раку грудей. Високий рівень МЕФ у сироватці крові жінок у постменопаузі пов'язаний із підвищеною щільністю грудей, що є маркером ризику раку молочної залози [28].

Деякі дослідження показали зв'язок між концентрацією фталату в сечі та передчасними пологами. Однак механізм, за допомогою якого існує цей причинно-наслідковий зв'язок, нажаль, залишається погано вивченим [29].

Крім перелічених даних, зазначається, що ДЕФ бере участь у метаболічних змінах, які можуть призвести до діабету 2 типу, а також декілька проведених досліджень в яких пов'язують концентрацію МЕР в сечі зі змінами кров'яного тиску [30].

Отже цей підрозділ детально аналізує основні аспекти токсичності ксенобіотика диетилфталату та його вплив на організм людини та тварини. На сьогоднішній день, науковці продовжують активну роботу над вивченням ДЕФ та інших фталатів, висвітлюючи важливість обмеження впливу цієї речовини та обговорюються можливі способи запобігання негативному впливу на організм.

1.3. Активні форми кисню

Біологічні системи піддаються впливу певного спектру окислювачів, а саме вільних радикалів та двоелектронних окислювачів. Основною причиною пошкодження та дисфункції мітохондрій є накопичення АФК у клітинах. Насправді мітохондрії є основним клітинним джерелом АФК [31].

АФК – це набір нестабільних молекул, включаючи перекис водню (H_2O_2), гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$), синглетний кисень (O_2) і супероксид ($\text{O}_2^{\cdot-}$), які виробляються всіма типами клітин [32]. Підвищене утворення різних АФК призводить до молекулярного пошкодження, що позначається як «окислювальний стрес» [33]. АФК відіграють одну з основних ролей в окислювально-відновній передачі сигналів через різноманітні посттрансляційні модифікації, які позначаються як «окислювальний стрес». Супероксидний аніон-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), та пероксид водню (H_2O_2) є ключовими окислювально-відновними сигнальними агентами, що генеруються під контролем факторів росту та цитокінів більш ніж 40 ферментами, зокрема НАДФН-оксидазами та мітохондріальними ферментами [33].

АФК відіграють важливу роль у стійкості патогенів і клітинній сигналізації, але вони також широко визнані як реакційноздатні частинки, які є шкідливими для клітин, оскільки вони пошкоджують ліпіди, внутрішньоклітинні білки і нуклеїнові кислоти всередині клітин. Підвищений рівень АФК здебільшого і призводить до окисного стресу.

Під окисним стресом розуміють токсичну дію АФК (супероксидних, гідроксильних і пероксидних радикалів) на біологічні мішені, що призводить до зниження функцій антиоксидантного захисту. Реакційноздатні молекули можуть модифікувати різні біологічні продукти такі як вуглеводи, ненасичені ліпіди, нуклеїнові кислоти, але через високий вміст білків у біологічних об'єктах вони є найпоширенішою мішенню для дії АФК, а окислювальна модифікація білків наразі вважається одним з

найбільш біологічно значущим проявом окисного стресу [34]. З усіх окиснених похідних білків найчастіше зустрічаються карбонільні похідні - вони утворюються зі швидкістю, що в 10 разів перевищує швидкість утворення будь-якої іншої модифікації білка [35]. Якщо розглядати карбонільний стрес, то він призводить до утворення реакційноздатних альдегідів, які окислюють вуглеводи або ліпіди, утворюючи карбонільвмісні проміжні продукти, які безпосередньо призводять до карбонілювання білків. Як реактивні альдегіди, так і білки, що містять карбоніл, інгібують папаїн і катепсину В і L шляхом глікації активного центру Cys25 [35]. З іншого боку, окислювальна модифікація білків розглядається як регуляторний механізм клітинної сигналізації [36] а оборотні модифікації цистеїну (наприклад, S-нітрозилювання та S-тіолування) можуть представляти додаткові регуляторні шляхи, кількість яких переважає контрольовані механізми шляхом фосфорилювання [37].

Як було зазначено надлишок виробництва АФК супроводжується зниженням антиоксидантної здатності та призводить до переривання генерації енергії, збільшення загибелі клітин і незворотного окислювального пошкодження білків та змін в експресії генів [31].

1.4. Окисна модифікація протеїнів

Окисна модифікація протеїнів (ОМП) викликана реакціями між амінокислотними залишками протеїнів та вільними радикалами.

Одні модифікації протеїнів можуть сприяти втраті функції протеїну, розщепленню або агрегації, в свою чергу інші окислювальні модифікації протеїнів можуть сприяти порушенню клітинного гомеостазу та протеотоксичності клітини [38].

Протеїни є основними мішенями для вільних радикалів і двоелектронних окислювачів у протеїнових системах. Хоча окислювальне пошкодження може відбуватися по всій молекулі протеїну, вважають, що бічні ланцюги амінокислот більш чутливі через їх редукційний потенціал і просторова локалізація [39]. Також було показано, що білки акцептують до 50-75% АФК, що призводить до їхньої окисної модифікації [40].

Взагалі процес ОМП є складним і залишається на сьогоднішній день недостатньо визначеним. Шляхи реакцій залежать від конкретних ініціаторів та умов навколишнього середовища, сприяючи розвитку багатьох різних механізмів [41]. Вплив АФК на білки може бути кількома варіантами: окислення амінокислотних залишків, розщеплення пептидних зв'язків і агрегація між протеїнами [42].

Розглянемо процес окислення протеїнів (Рис.1.4). Спочатку від протеїну відривається водень за допомогою гідроксильного радикалу та генерує алкільний радикал, стабілізований резонансом з карбоксильною функцією (А). Алкільний радикал в свою чергу реагує з O_2 з утворенням пероксидного радикалу (В). Після цього пероксидний радикал відриває інший водень від протеїну, та утворюються гідропероксид та алкільний радикал (С). Гідропероксид відновлюється до алкоксильного радикалу в присутності двовалентного заліза (D) [41].

Наділі відбувається відрив водню вже від сусіднього протеїну алкоксильним радикалом утворює похідні гідроксиамінокислоти (Е). Алкоксильний радикал при розщепленні генерує різні протеїнові карбоксильні радикали та алкільні радикали (F). За відсутності або при низьких рівнях кисню алкільні радикали утворюють протеїнові агрегати (G) [41].

Якщо говорити простіше, то АФК атакують протеїни по всій довжині поліпептидного ланцюга. Вони руйнують не лише первинну структуру, а

також вторинну і третинну, призводячи до агрегації та фрагментації протеїнових молекули.

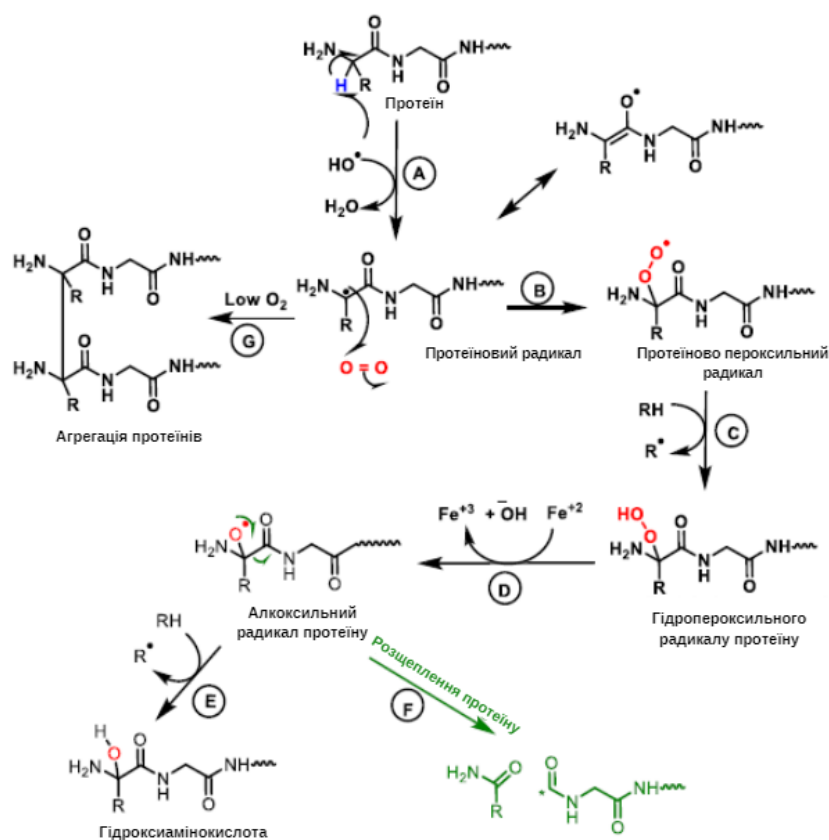


Рис.1.4. Механізм окислення білка [41].

Окислення протеїнів в біологічних матеріалах, підданих АФК, і перекиси утворювалися на цистеїні, метіоніні пептиду, а також через одноелектронне відновлення [43]. Пошкодження бічних ланцюгів амінокислот вільними радикалами та зв'язування з окисними сполуками призводить до розриву внутрішньомолекулярних зв'язків, що призводить до конформаційних переходів і дестабілізації структури протеїнів [43].

В результаті пошкодження протеїну відбувається зниження активності ферментів, тоді як ДНК призводить до мутагенезу та канцерогенезу [44] так як окиснення протеїнів призводить до серйозних змін фізичних і хімічних властивостей протеїнів [45].

ОМП завжди пов'язана з широким спектром патологій, включаючи деякі види раку, неврологічні розлади (бічний аміотрофічний склероз, хвороби Паркінсона та хвороби Альцгеймера), гіпертензію, серцево-судинні захворювання, включаючи атеросклероз, ішемічно-реперфузійне ураження багатьох органів, ураження нирок і очей, катаракту, сепсис, хронічну обструктивну хворобу легень, астму, ревматоїдний та остеоартрит, захворювання рухових нейронів, панкреатит, гепатит, синдром подразненого кишечника, сонячні опіки та фотоушкодження та багато іншого [46].

Хоча деякі патології, можуть бути просто пов'язані між собою (тобто, інколи стверджують, що ОМП не є причиною, а лише наслідком інших шкідливих процесів), ОМП, інколи, є сприятливим фактором для організму. ОМП також може бути засобом у лікуванні деяких захворювань, при променевій і фотодинамічній терапії пухлин, використання препаратів, що регулюють окисно-відновний цикл наприклад, доксорубіцину та нітроароматичних речовин і фотохімічне з'єднання тканин під час закриття рани після операції є хорошими прикладами [47].

Також деякі дослідження показали, що ОМП загострює старіння та вікові захворювання обмежуючи здорове довголіття особин [47].

Також велика кількість досліджень констатує, що ОМП широко впливає на репродуктивну систему з негативної сторони як чоловіків так і жінок. Для жінок характерним є проблеми перед та під час вагітності. Якщо в організмі людини відбулося окиснення протеїнів, то протягом кількох годин після овуляції яйцеклітина втрачає свою життєздатність і функціональність, тоді як еякульовані сперматозоїди призначені для того, щоб провести кілька днів у жіночому репродуктивному тракті в очікуванні прибуття яйцеклітини помирають [48]. Так як у нашого виду, акти осіменіння та овуляції не синхронізовані. Таким чином, ооцити запрограмовані на швидку смерть після овуляції, якщо їх не врятувати

з'єднанням зі сперматозоїдом, після чого вони стають (потенційно) увічненими [48].

Як вже розглянуто, ОМП впливає на властивість самих протеїнів. Саме це призводить до модифікації бічних ланцюгів амінокислот, включаючи всі аміноацильні групи протеїну. Приклади цих модифікацій включають гідроксилування, хлорування та нітрування бічних ланцюгів аліфатичних амінокислот, сульфонування залишків метіоніну, нітрування сульфгідрильних груп і карбонілювання бічних ланцюгів амінокислот [49].

Якщо говорити про найбільш поширений приклад цих модифікацій, то це безпосередньо карбонільні модифікації та окислення сірковмісних амінокислот. Наукові дані найчастіше зв'язують утворення карбонільних похідних з наслідком ОМП.

Карбонільні похідні протеїнів можуть бути створені шляхом модифікації бічних ланцюгів амінокислот під впливом АФК, в свою чергу відбувається розщеплення пептидних зв'язків. Наприклад, АФК можуть безпосередньо атакувати лізин, аргінін, пролін і треонін для генерації карбонілів [50]. Крім того, відновлюючі цукри та альдегіди в результаті розкладання Штрекера можуть утворювати комплекси з протеїнами для отримання зв'язаних з протеїнами карбонілів [50]. Таким чином, після зв'язування з протеїнами, карбоніли, отримані з ліпідів та вуглеводів, сприяють загальному вмісту карбонілів в окислених протеїнах. Так як, карбонілювання відбувається майже у всіх окислених протеїнів, науковці зробили висновок, що карбонільні похідні є одним з найчастіших маркерів ОМП, який використовується в лабораторних практиках.

Якщо говорити про окиснення сірковмісних амінокислот (Рис. 1.5.), то найбільш часто окислюється цистеїн. Цистеїн окислюється в багатоетапній реакції до відповідних модифікацій сульфенової, сульфінової та сульфонової кислот або окислювально кон'югований з глутатіоном (GSH) або іншим залишком цистеїну (A) [41].

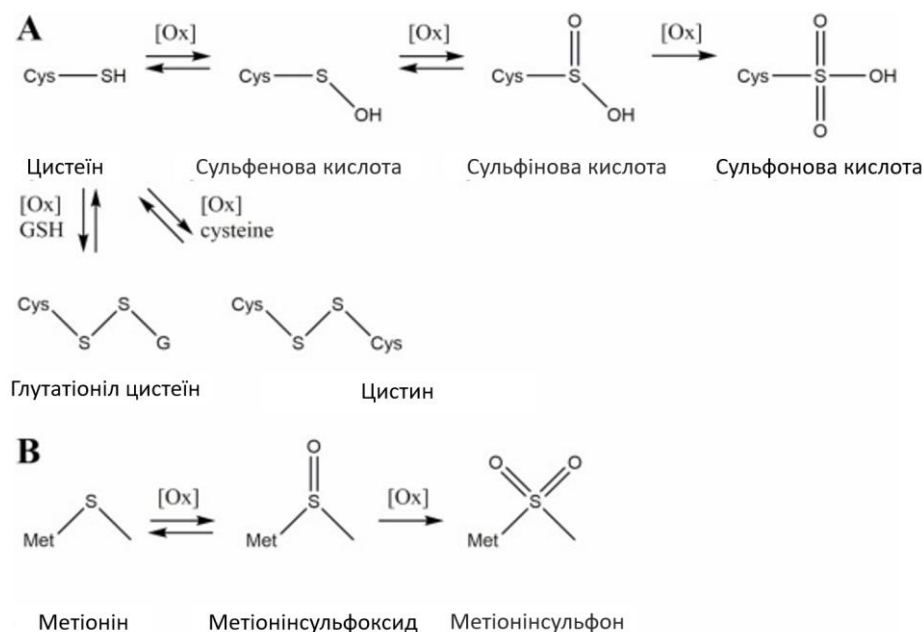


Рис.1.5. Окиснення сірковмісних амінокислот

Метіонін може оборотно окислюватися до метіонінсульфоксиду і необоротно окислюватися до метіонінсульфону (Рис.1.5.В).

Утворення тїлового радикала цистеїну та сульфенової кислоти є оборотним процесом, і обидва проміжні продукти дуже нестабільні. Обидва вони служать попередниками для кількох окислених модифікацій цистеїну [31].

Отже, нами було розглянуто, механізм дії АФК на окислення біологічних продуктів клітини та безпосередній вплив цих модифікацій на організм людини та тварини.

2. МЕТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи досліджень

Дослідження проводили за стандартною схемою: «на білих безпородних щурах масою 120-160 г. Утримання та всі маніпуляції з тваринами здійснювали згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та VII Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2019 р.)» [3].

Дослідних тварин поділили на 3 групи:

- I група – інтактні тварини (контроль),
- II група – щурі, які отримували ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тварин,
- III група – щурі, які отримували ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тварин.

Досліджувані тварини отримували ДЕФ перорально, протягом трьох тижнів у дозах, що відображає рівні доз, які отримує людина [51].

Евтаназію для тварин проводили під ефірним наркозом як на 14-ту так і на 21-у добу з початку введення досліджуваного ксенобіотика.

З печінки щурів виділяли мітохондріальну фракцію шляхом диференційного центрифугування. Метод описаним у (Kitagawa, 2008). Печінку досліджуваних тварин гомогенізували із додаванням 250 мМ розчину сахарози та 150 мМ трис-НСl, довели до рН 8. Після цього, ядра та уламки клітин осаджували за допомогою центрифуги протягом 10 об/хв при 1000 g. Після чого, досліджувану фракцію із супернатанту осаджували протягом 15 об/хв при 10 500 g, отриману фракцію залили буфером 0,1 М трис-НСl [52].

Генерацію супероксидного радикалу. Принцип методу базується на здатності супероксиддисмутази окислювати продукт адреналіну – адренохрому.

Хід аналізу

В пробірку додали 3 мл карбонатного буферу і 30 мкл досліджуваної речовини (мітохондріальної фракції). У контроль додали 3 мл карбонатного буферу. Далі проби вимірювали на спектофотометрі при довжині хвилі 480 та 575 нм. У дослідні пробірки під час того як міряють, додають 100 мкл адреналіну та вмикали таймер.

До контрольної проби, проти якої проводили вимірювати, не вносили адреналін. Про величину активності супероксиддисмутази у пробірці судили за ступенем інгібування ним швидкості аутоокислення адреналіну. Відсоток інгібування вираховували за формулою:

$$\% \text{ інгібування} = [1 - (\Delta D(\text{проби})/\Delta D(\text{контролю}))] \cdot 100 \%,$$

де ΔD (проби) і ΔD (контролю) – швидкості реакції аутоокислення адреналіну в присутності і відсутності проб відповідно. Про швидкість окислення адреналіну судили за зміною оптичної щільності [53].

Генерація гідроксильного радикалу. Для визначення швидкості генерації гідроксильного радикалу готували інкубаційну суміш.

Хід аналізу

Вносили у пробірки 200 мкл мітохондріальної фракції та 200 мкл інкубаційного середовища. Інкубаційне середовище для визначення утворення гідроксильного радикала містило: 20 ммоль натрій-фосфатний буфер (рН 7,4), 20 ммоль дезоксирибози, 1 ммоль H_2O_2 , мітохондріальна фракція. Після інкубації 30 хв при 37 °С до суміші додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 ммоль NaOH і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти та знову інкубували 20 хв на киплячій водяній бані. Отриману суміш охолоджували та вимірювали екстинкцію при $\lambda = 532$ нм. Утворення $\cdot\text{OH}$ виражали як ммоль $\cdot$ / хв на $\cdot$ мг білка. Вміст $\cdot\text{OH}$ радикала, ще генерувався при цьому за 30 хв інкубації вимірювали в умовних одиницях $\Delta E \cdot 10^2$ за 30 хв на 1 мг білка проби. [54].

Вміст карбонільних похідних визначали за допомогою визначення кількості продукту ДНФГ-СО з використанням спектрофотометричного методу. Принцип даного методу заснований на тому, що карбонільні похідних, які утворилися, взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ). Під час даної реакції відбувається утворення 2,4-динітрофенілгідразону [55].

Хід аналізу

Карбонільні похідних визначали в мітохондріальній фракції дослідних тварин.

Для того, щоб осадити протеїни, було взято 26 дослідних і 26 контрольних центрифужних пробірок. У всі пробірки додали по 1 мл дослідної речовини (мітохондріальної фракції) і по 1 мл 20% розчину ТХО. Після всі пробірки поставили на центрифугу на 10 хв при 3 000 g. Після того, як відбулася денатурація протеїну в контрольні проби додали по 2 мл 2 М розчину HCl, тоді як в дослідні проби налили по 2 мл розчину 2,4-ДНФГ. Наступним кроком було інкубування всіх проб при температурі 37°C впродовж 1,5 годин. Для того, щоб осадити протеїни, ми знову центрифугували досліджуванні проби при 3 000 g протягом 10 хв [55].

Для екстракції ліпідів та видалення залишків 2,4-динітрофенілгідразину, який не прореагував, осад був промитий сумішшю етанол : етилацетат (1 : 1) три рази по 2 мл. Після промивання, до осаду додали 3 мл 8 М сечовини, наступним кроком, всі проби поставили на киплячу баню до розчинення осаду. Отриманні ДНФГ вимірювали при довжині хвилі 370 нм за допомогою спектрофотометру. Кількість утворених продуктів 2,4-динітрофенілгідразонів визначали за допомогою молярного коефіцієнта екстинції, що дорівнює 21×10^{-3} моль⁻¹см⁻¹,

результати вираховували за формулою: $C = E \times 3 \text{ мл} \times 100 \div (21 \times 10 - 3 \times \text{мл білка})$ [55].

Визначення вмісту протеїнових SH-груп. Дане дослідження проводили з використанням реактиву Еллмана. Принцип цього методу базується на використанні реагенту Еллмана-5,5'-дітіобіс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБК), який вступає в реакцію з SH-групами, з утворенням змішаних дисульфідів. Таким чином здійснюється вивільнення тіонітрофенільних аніонів, кількість яких зазвичай дорівнює кількості вільних SH-груп протеїну, що прореагує з ДТНБК [56].

Хід аналізу

Визначення вмісту білкових SH-груп проводили в мітохондрій фракції щурів, в яку перед роботою залили 0,1 М трис-HCl. Для роботи було взято 52 пробірки, з них містили 26 контрольних та 26 дослідних проб. В центрифужні пробірки додали по 1 мл дослідного розчину (мітохондріальної фракції) і по 1 мл 20% розчину трихлороцетової кислоти (ТХО), пробірки обов'язково потрібно зрівноважити, після чого, поставили на центрифугу протягом 10 хв при 3 000 об/хв [56].

Далі робота відбувається лише з осадом, надосадову рідину зливаємо, в усі проби наливаємо по 2 мл розчину (0,3 М HClO_4 + 5 мМ EDTA) і добре перемішуємо отриманий розчин. Після цього повторюємо центрифугування 10 хв при 3 000 об/хв. Наступним кроком, до осаду наливаємо по 2 мл, розчину етанол-етилацетат (1:1) (попередньо розведеного), далі знову ставимо центрифугувати проби на 10 хв при 3 000 об/хв. Після чого, до осаду, який залишився в усі проби додаємо по 5 мл 8 М карбаміду та 5 мл буферу, $\text{pH}=7,4$ (KH_2PO_4 + 5 мМ EDTA). Далі всі проби ставлять на киплячу водяну баню до розчинення осаду. Після того, як осад розчинився, проби відбирали в довгі пробірки по 3 мл. В контрольні проби додають 0,02 мл води, до

кожної дослідної проби додавали по 0,02 мл розчину Еллмана, витримували 30 хвилин та вимірювали результати на спектрофотометрі за довжиною хвилі 412 нм [56].

Результати розраховують за допомогою коефіцієнту молярної екстинції, який складає $11\,400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і виражаємо у нмоль/мл протеїну [56].

Визначення кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів шифових основ. Принцип методу, за допомогою суміші гептан-ізопропіловий спирт витягують ліпіди. Гептан екстрагує переважно нейтральні ліпіди, а ізопропанол – фосфоліпіди. Таким чином, стає можливим визначення продуктів ліпопероксидації у різних класах ліпідів.

Хід аналізу

Визначення вмісту шифових основ проводили в мітохондрій фракції щурів, для роботи було взято 52 пробірки. Досліджуваний матеріал брали в присутності ЕДТА розчину в кінцевій концентрації 1 мг 0,5 мл досліджуваного розчину при вздовтуванні в закритих пробірках. Досліджуваний розчин, а саме 2 мл та 2,5 мл спиртового розчину гептан:ізопропан (1:1) поставили на мішалку на 15 хв. Після цього всі проби поставили центрифугуватися на 10 хв при 10 000 об/хв. Утворений надосад перелили в скляні пробірки та додали по 2,5 мл спиртового розчину гептан:ізопропан (3:7) та по 2,5 мл водного розчину HCl. Відбулося утворення двох фаз, верхню (гептанову) фазу відібрали окремо в нові пробірки, а до водно-спиртової фази додали 10 мл NaCl для обезвожування ізопропального естракту. Після виділення водної фази ізопропанол переносили в окрему пробірку, дві фази вимірювали на спектрофотометрі за довжиною хвилі 400 нм [57].

Для гептанової фази за контроль брали 3 мл гептану, для ізопропанової фракції - ізопропанол.

Розрахунок шифових основ проводили співвідносячи величини відповідних екстинцій до кількості ліпідів в пробі до 1 мл досліджуваного матеріалу за формулами:

$E/\text{мл досліджуваної речовини} = E \cdot V \text{ фази} / V \text{ досліджуваної речовини},$

де E – оптична щільність проби щодо контролю;

V – об'єм відповідного ліпідного екстракту;

(для гептанової фази: $\frac{E \cdot 4}{0,5} = E \cdot 8$; для Ізопропанольної: $\frac{E \cdot 6}{0,5} = E \cdot 12$).

Протеолітичну активність у мітохондріальній фракції визначали модифікованим методом Ансона. Принцип методу полягає в розщепленні казеїну протеазами мітохондрій до продуктів, що не осаджуються трихлороцтовою кислотою. Протеолітичну активність виражали в мікромолях утвореного тирозину за 1 хв на мг протеїну при 37 °С [58].

Хід аналізу.

Визначення вмісту протеалітичної активності проводили в мітохондріальній фракції печінки щурів, для роботи було взято 52 пробірки. У пробірку, що містить 1 мл 1% розчину ферменту через 5 хв інкубації за 37°C додавали 2 мл 1% розчину казеїну в 0,1 М фосфатному буфері рН 7,4 термостатованому за 37°C. Через 10 хв інкубації з казеїном до інкубованої суміші додали 5 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО) та інкубували ще 20 хв [58].

Контроль отримували додавши в пробірки по 1 мл 1% розчину ферменту 5 мл 5 % розчину ТХО та інкубували протягом 10 хв, після інкубації до проб додали по 2 мл 1% розчину казеїну в 0,1 М фосфатному буфері рН 7,4 та інкубацією ще протягом 20 хв. Розчин додавали до об'єму 10 мл 0,1 М фосфатного буферу (рН 7,4). Отриманий розчин центрифугували протягом 10 хв (6000 об/хв) і фільтрували крізь складчастий паперовий фільтр. В пробірки відбирали по 1 мл

профільтрованого розчину й додали до нього 5 мл 0,5 М розчину Na_2CO_3 та 1 мл розчину реактиву Фоліна. Після цього інкубували ще 20 хв до зміни забарвлення від жовтого до синього. Вимірювали оптичну густину всіх проб за довжиною хвилі 670 нм у кюветі з товщиною шару 0,5 см. Вимірювали на фотоколориметрі [58].

Протеолітичну активність розраховували за формулою:

$$\text{ПА} = \text{Д} \cdot 5 / \text{ТЕ} \cdot \text{п} \cdot 10$$

Де Д – оптична густина дослідного розчину контрольно пробірки.

10 – час інкубації, у хвилинах

ТЕ – тирозиновий еквівалент – оптична густина одного мікромоля тирозину в одному міліметрі

N – маса наважки препарату у грамах.

Кількісне визначення білка проводили за методом Лоурі.

Принцип даного методу базується на тому, що відбувається утворення кольорових продуктів ароматичних амінокислот за дією на протеїн реактиву Фоліна, а також в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [59].

Хід аналізу

У дослідні проби додають 0,1 мл досліджуваного розчину (мітохондріальної фракції), 0,9 мл води та по 2 мл реактиву С, суміш добре взбовтують та витримують 10 хв. Після походження 10 хв, додаємо до проб по 0,2 мл реактиву D, ставимо в темне місце та витримуємо 30 хв. В контроль натомість мітохондріальної фракції (дослідної речовини) нашиваємо 1 мл H_2O_2 , досліджувані зразки колориметруємо при хвилі 750 нм, в подальшому розраховуємо отримані результати (мг/мл білка) [59].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою використання дисперсійного аналізу (ANOVA). Вірогідними вважали відмінності між групами при $p \leq 0,05\%$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фталати у підвищених концентраціях та при тривалому потраплянні в організм можуть викликати серйозні дисфункції печінки через метаболічну активацію високоактивних речовин, таких як вільні радикали. В основі механізмів пошкоджуючої дії ДЕФ може бути генерація АФК та наступна ініціація вільнорадикального окиснення протеїнів мітохондрій.

Результати проведених досліджень показали, що за дії на організм ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин протягом 14 діб не спостерігалось змін швидкості утворення O_2^- у мітохондріальній фракції печінки щурів, оскільки досліджуваний показник був на рівні показників інтактних тварин (рис.3.1).

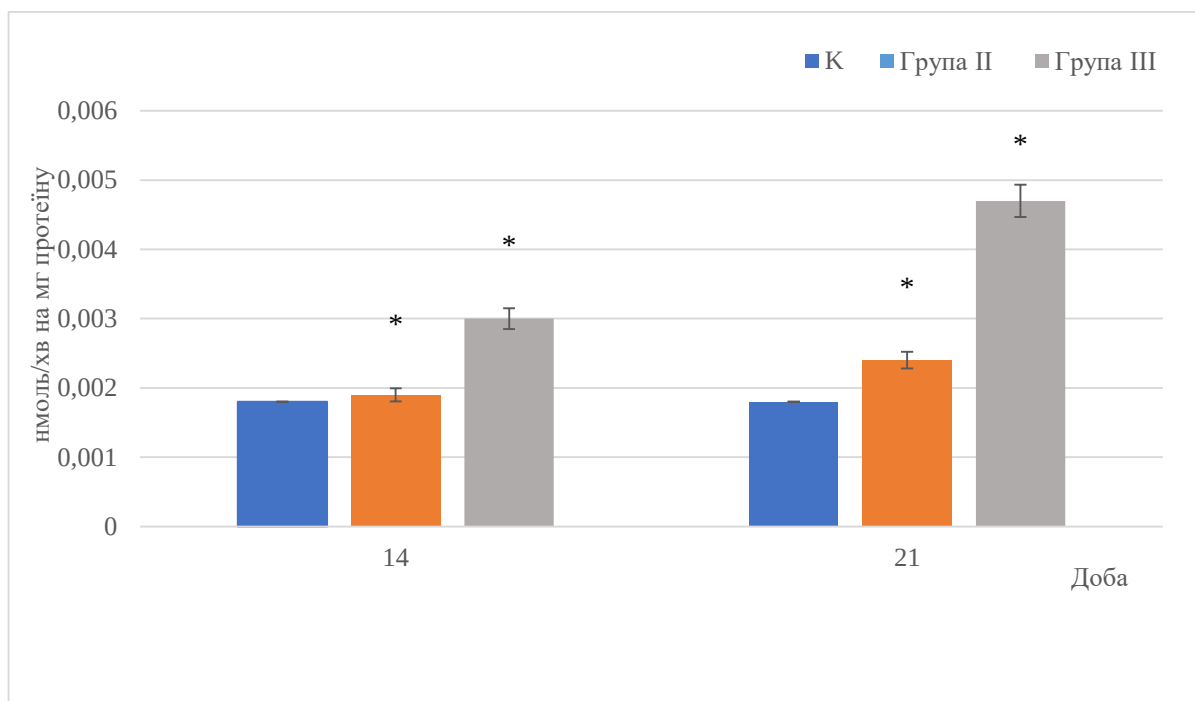


Рис.3.1. Швидкість утворення супероксидного радикала у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов введення ДЕФ

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

У тварин, які отримували ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг маси тіла протягом 14 діб, спостерігалось підвищення генерації $O_2^{\cdot-}$ у мітохондріальній фракції печінки щурів у 1,6 рази порівняно з показниками інтактних тварин (рис.3.1).

При введенні ДЕФ протягом 21-ї доби виявлено підвищення генерації $O_2^{\cdot-}$ у мітохондріальній фракції печінки щурів як за умов введення досліджуваного ксенобіотика у дозі 2,5 мг/кг маси тварин, так і при введенні дози 5,4 мг/кг маси тварин, оскільки досліджуваний показник у 1,3 рази та у 2,6 разів перевищував показник контролю відповідно (рис.3.1). Посилена генерація $O_2^{\cdot-}$ може бути пов'язана з порушенням метаболічних механізмів регуляції кисневого гомеостазу в клітинах за дії ДЕФ, у зв'язку з чим порушується транспорт електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій з генерацією $O_2^{\cdot-}$ [60]. Утворений $O_2^{\cdot-}$ може бути джерелом утворення більш реакційноздатного $\cdot OH$ [61].

Аналіз результатів показав, що чотирнадцятиденна дія на організм ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин призводить до незначного підвищення швидкості утворення $\cdot OH$ (у 1,2 рази) порівняно із показником контролю (рис.3.2). Водночас, у щурів, яким вводили ДЕФ протягом 2-х тижнів, доза складала 5,4 мг/кг маси тіла тварин швидкість утворення $\cdot OH$ підвищується у 1,8 рази порівняно з контролем (рис.3.2).

Як випливає з результатів, швидкість утворення $\cdot OH$ виражене більшою мірою за швидкість утворення $O_2^{\cdot-}$. Імовірно, $\cdot OH$ утворюється з $O_2^{\cdot-}$ і H_2O_2 у реакції Габера-Вейса, що викликати окиснювальний стрес у мітохондріях. Оскільки $\cdot OH$ є високо реакційноздатним радикалом, то його утворення локально буде призводити до ОМП мітохондрій [62].

Введення ДЕФ протягом 21-ї доби сприяло суттєвішому підвищенню швидкості утворення $\cdot OH$. Так, у тварини, які отримували дозу 2,5 мг/кг, швидкість утворення $\cdot OH$ у 1,6 рази перевищувала показник інтактних

тварин, тоді як введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг збільшувало генерацію $\cdot\text{OH}$ у 3,1 рази порівняно з контролем (рис.3.2).

За даних умов підвищення інтенсивності утворення $\cdot\text{OH}$ може призводити до пошкодження мітохондрій з наступним пошкодженням клітин. При вираженому або тривалому стресі концентрація АФК у клітині може підвищуватися і, починаючи з певного порогового рівня захисні системи клітин слабшають, що спричинить загибель клітин печінки [62].

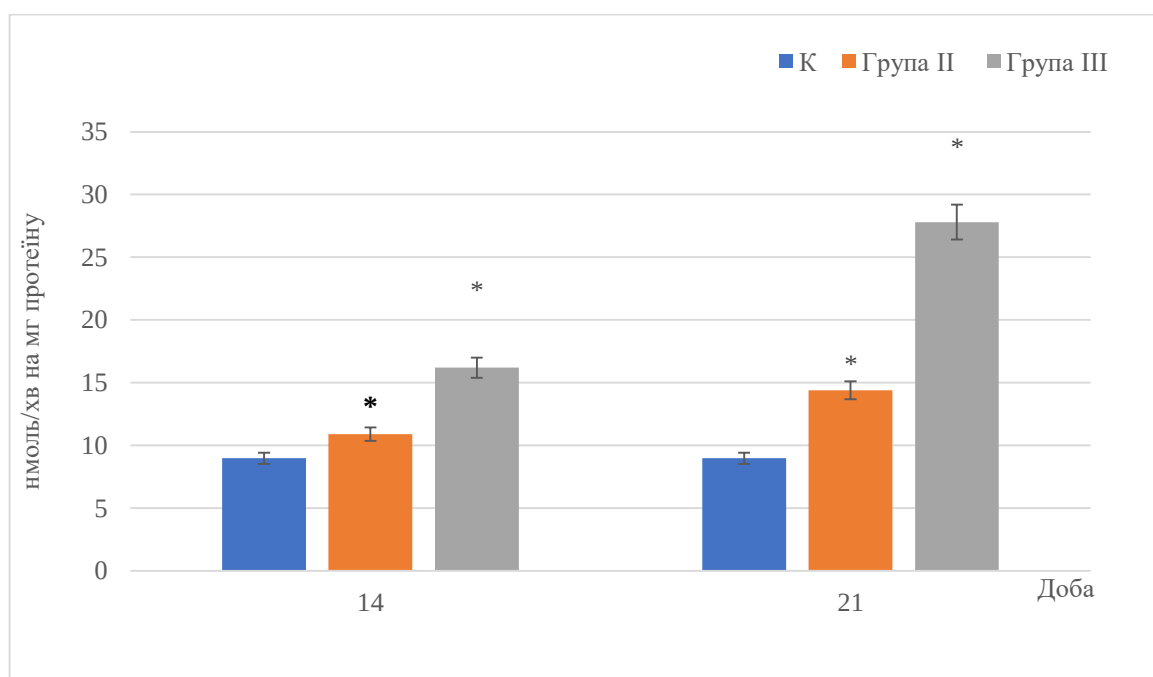


Рис.3.2. Швидкість утворення гідроксильного радикала в мітохондріальній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Мітоптоз може бути наслідком збільшення продукції АФК, виснаження пулу біоантиоксидантів та посилення місцевих реакцій [63]. Ці порушення можуть бути наслідком окиснювальної модифікації мітохондріальних протеїнів. Щоб перевірити це припущення нами визначено рівень карбонільних похідних як один із маркерів ОМП.

Результати проведених досліджень показали, що в мітохондріях печінки щурів за умов чотирнадцятиденної дії ксенобіотика дозою 2,5 мг/кг маси тіла тварини не спостерігалось збільшення рівня карбонільних похідних порівняно з інтактними тваринами (рис.3.3). Водночас, введення даного ксенобіотика у дозі 5,4 мг/кг маси тіла тварин супроводжувалося підвищенням у 2 рази вмісту карбонільних похідних у мітохондріальній фракції печінки щурів порівняно з показниками контролю (рис.3.3).

В свою чергу, введення ДЕФ протягом трьох тижнів показало, що тварини, які споживали дозу 2,4 мг/кг даної речовини, рівень карбонільних похідних підвищувався у 1,4 рази, а за дії дози 5,4 мг/кг – у 3,2 рази порівняно із показником контролю (рис.3.3).

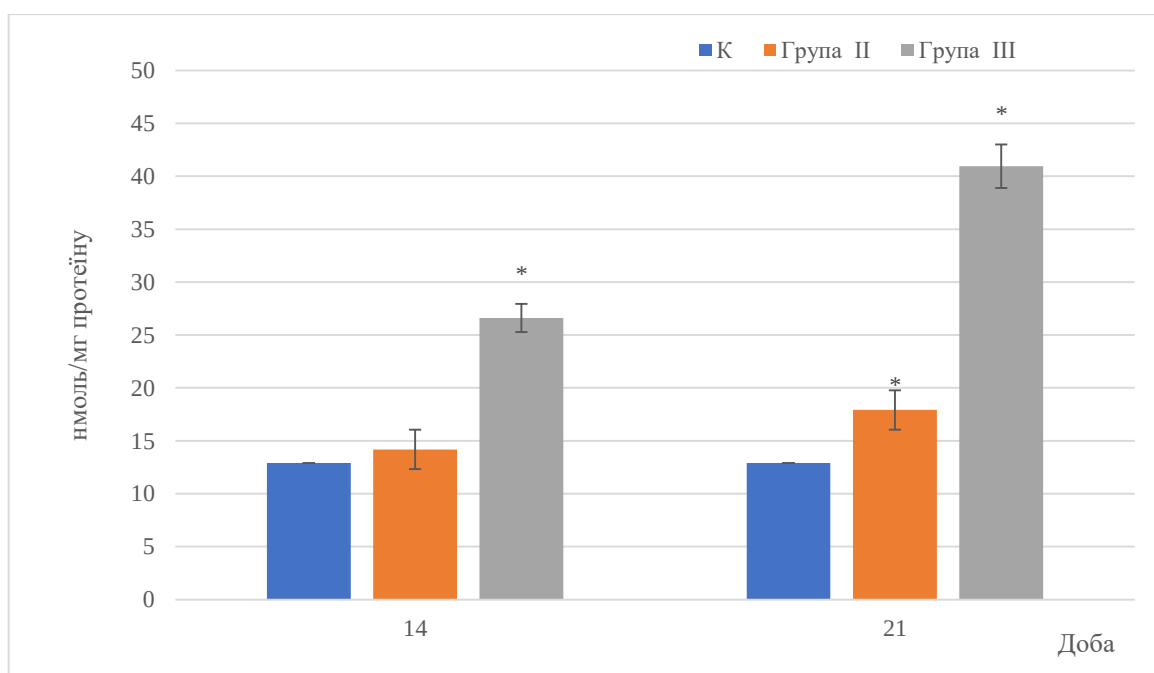


Рис.3.3. Вміст карбонільних похідних у мітохондріальній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Оскільки в молекулах протеїнів окиснювальній модифікації піддаються не лише вільні аміногрупи, але й сульфгідрильні групи, то як маркер ОМП нами також визначено вміст SH-груп.

Аналіз результатів проведених досліджень показав зниження рівня протеїнових SH-груп у мітохондріальній фракції печінки щурів, яке посилювалося зі збільшенням дози та терміну введення ДЕФ, що підтверджує інтенсифікацію ОМП за дії цього ксенобіотика. Так, за умов введення середніх доз ДЕФ (2,5 мг/кг) протягом 14 діб рівень SH-груп у мітохондріальній фракції печінки щурів не відрізнявся від показника контролю (рис.3.4). У щурів, яким вводили максимальну дозу ДЕФ спостерігалось зниження вмісту SH-груп у 1,6 разів порівняно з контролем (рис.3.4).

При цьому вплив ДЕФ на 21-у добу показав, що рівень SH-груп у мітохондріальній фракції печінки щурів зменшився в 1,7 рази порівняно з контролем у тварин, які отримували дозу 2,5 мг/кг та у 2 рази – у тварин, які отримували дозу 5,4 мг/кг (рис.3.4).

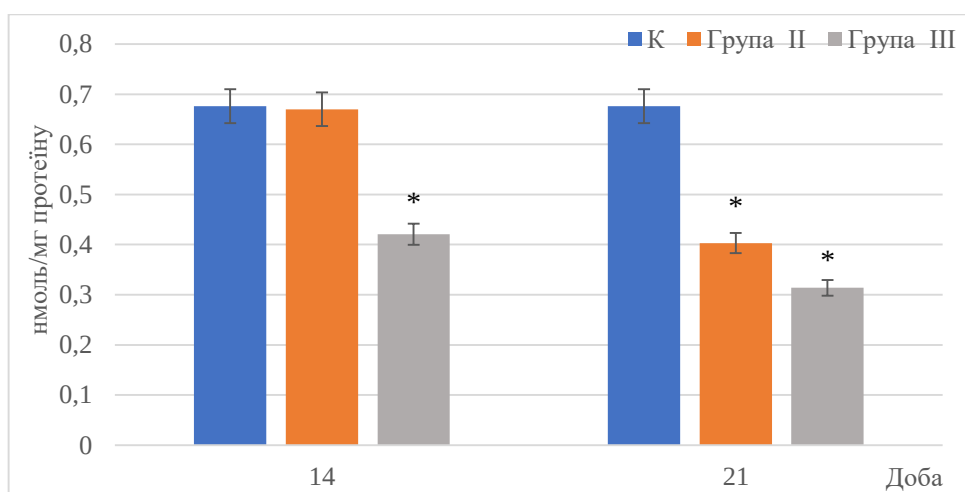


Рис.3.4. Вміст сульфгідрильних груп в мітохондріальній фракції печінки щурів за дії диетилфталату

Імовірно, генерація O_2^- та $\cdot OH$ призводить до ОМП, на що вказують маркери окиснення протеїнових аміногруп і сульфгідрильних груп. Оскільки одна із функцій SH-групи – зниження цитотоксичної та деструктивної дії АФК, то зниження їхнього вмісту може вказувати на

зміни редокс-потенціала клітин організму. Розташовані на поверхні протеїнової молекули SH-групи мають змогу інактивувати вільні радикали, окиснюючись до дисульфідів, цим самим, захищаючи від пошкоджень внутрішні ділянки протеїнів [64]. Зниження вмісту даного показника може бути пов'язане як з посиленою інтенсифікацією вільнорадикальних процесів, а також як з інтенсивнішим використанням даних сполук.

Отже, збільшення вмісту карбонільних похідних та зниженням вмісту SH-груп протеїнів свідчить про підвищення інтенсивності ОМП у мітохондріях, що є результатом генерації АФК у відповідь на надходження в організм ДЕФ. Окисненні протеїни можуть взаємодіяти з альдегідами та утворювати шиффові основи – кінцеві продукти окиснення біомолекул у клітині.

Аналіз результатів показав, що введення ДЕФ протягом 14 діб призводило до підвищення рівня шиффових основ у мітохондріальній фракції печінки лише у тієї групи тварин, які отримували високу дозу ксенобіотика (5,4 мг/кг), оскільки досліджуваний показник у 2,8 рази перевищував показник інтактних тварин (рис.3.5). У тварин, що отримували ДЕФ протягом 21-ї доби рівень шиффових основ підвищувався у 3,7 разів – при введенні дози 2,5 мг/кг та у 4,5 – при введенні дози 5,4 мг/кг порівняно із показниками інтактних тварин (рис.3.5).

Накопичення основ Шиффа може вказувати на дестабілізацію структурно-функціонального стану мітохондріальних мембран, оскільки цей показник також є кінцевим продуктом пероксидного окиснення ліпідів, що утворюють мембрани.

Під час встановлення одночасного підвищення вмісту карбонільних похідних і шиффових основ, нами виявлено, що підвищення рівня основ Шиффа відбувалося більшою мірою. Так, якщо вміст карбонільних похідних на 21-шу добу експерименту підвищувався у 1,4 рази – група II та у 3,2 рази – група III, то рівень основ Шиффа підвищувався у 3,7 рази –

група II та у 4,6 рази – група III (рис.3.5). Це і може бути пов'язано з тим, що карбонільні групи взаємодіють з аміногрупами, утворюючи основи Шиффа.

Підвищення рівня карбонільних похідних на всіх етапах експерименту, очевидно зумовлене постійним утворенням АФК при введенні ДЕФ, які атакують аміногрупи мітохондріальних протеїнів.

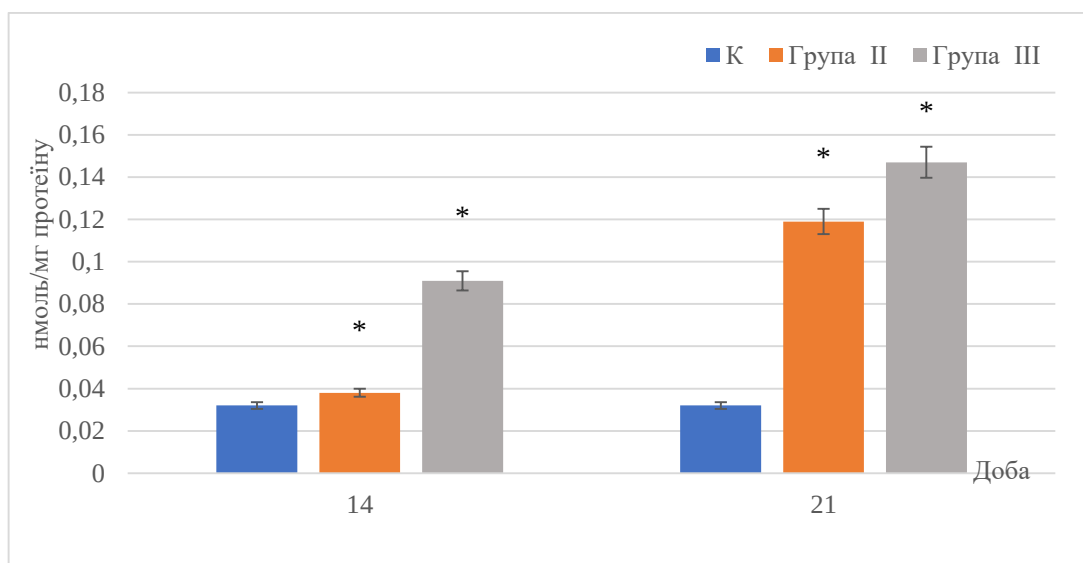


Рис.3.5. Вміст шиффових основ у мітохондріальній фракції щурів за дії диетилфталату

Зміни ОМП у мітохондріях можуть відобразитися на змінах активності протеаз мітохондрій, оскільки, з одного боку, може відбуватися їхня активація для гідролізу окислених протеїнів, а з іншого боку може спостерігатися їхня інактивація у результаті окиснення. Ці зміни позначаються на роботі мітохондрій, оскільки мітохондріальні протеази утворюють складну систему, яка виконує обмежений і кінцевий протеоліз для утворення мітохондріального протеома.

Результати проведених досліджень показали, що за чотирнадцятиденної дії на організм ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг не спостерігалось змін показника протеолітичної активності порівняно з контролем, тоді як при подальшому введенні ДЕФ виявлено підвищення досліджуваного

показника у 1,8 рази порівняно з контролем (рис.3.6). Активація протеаз мітохондрій, імовірно, відбувається у відповідь на утворення окислених протеїнів, які необхідно утилізувати з клітини.

При введенні ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг рівень протеолітичної активності підвищується у 1,6 рази порівняно з контролем вже після чотирнадцятиденного введення ксенобіотика, імовірно, для деградації окислених протеїнів (рис.3.6). На 21-у добу експерименту у цієї групи тварин виявлено зниження активності протеаз порівняно з контролем, що, очевидно, пов'язано з їхнім окислення (рис.3.6).

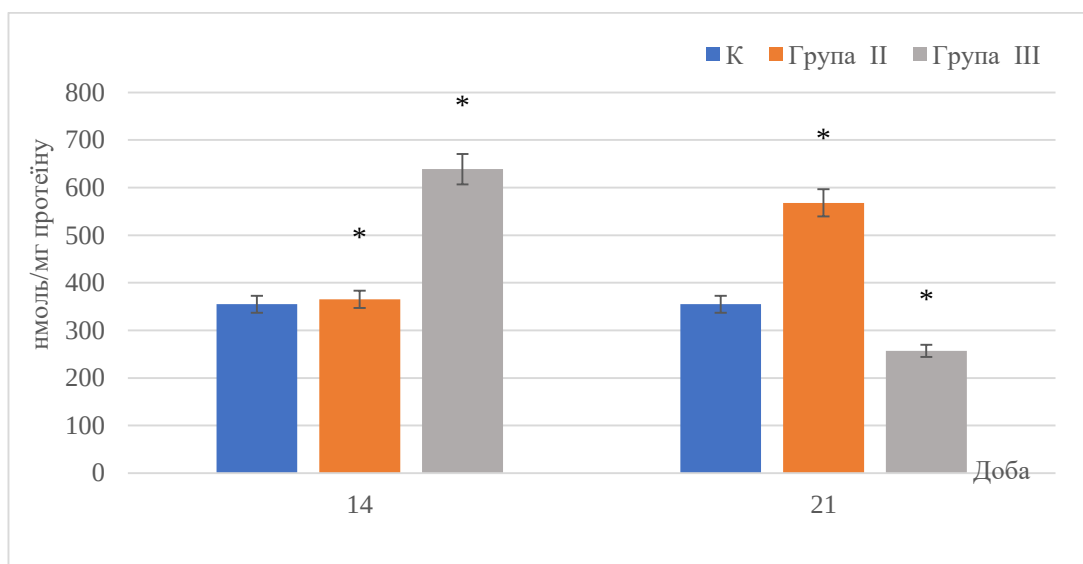


Рис.3.6. Протеолітична активність у мітохондріальній фракції печінки щурів

Отримані результати вказують на той факт, що існує кореляції між інтенсивністю ОМП та підвищення протеолітичної активності. Таким чином, посилення протеолізу при введенні ДЕФ може бути зумовлене як активацією протеолітичних ферментів, так і модифікацією білків-субстратів, що підвищує їхню чутливість до дії цих ферментів. Через збільшення карбонільних похідних в мітохондріях можуть утворюватися нерозчинні агрегати, які не можуть бути знешкодженими протеазами, що призводить до ушкодження клітин та тканин. Висока інтенсивність ОМП

зумовлює зниження активності протеаз, імовірно, внаслідок їхнього окислення [65].

ВИСНОВКИ

1. Введення ДЕФ у дозі 2,5 мг/кг маси тіла тварин протягом 14 діб не призводить до змін швидкості утворення $O_2^{\cdot -}$ та $\cdot OH$ у мітохондріальній фракції печінки щурів, оскільки досліджуваний показник був на рівні показників інтактних тварин. Введення ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг сприяє підвищенню генерації $O_2^{\cdot -}$ та $\cdot OH$ у мітохондріальній фракції печінки щурів, яка посилюється по мірі збільшення терміну введення ксенобіотика.
2. За умов чотирнадцятиденної дії ДЕФ у дозі 5,4 мг/кг спостерігалось підвищення у 2 рази вмісту карбонільних похідних та зниження у 1,6 разів вмісту SH-груп у мітохондріальній фракції печінки щурів порівняно з показниками контролю. Триваліша дія ДЕФ на організм посилює процеси ОМП не залежно від дози введення.
3. Введення ДЕФ протягом 14 діб призводило до підвищення рівня шиффових основ у мітохондріальній фракції печінки лише у тієї групи тварин, які отримували високу дозу ксенобіотика (5,4 мг/кг). На 21-у добу експерименту рівень шиффових основ підвищувався у 3,7 разів – при введенні дози 2,5 мг/кг та у 4,5 – при введенні дози 5,4 мг/кг порівняно із показниками інтактних тварин.
4. Активність протеолітичних ензимів у мітохондріальній фракції знаходиться у прямій залежності від ступеня ОМП, посилюючись при незначних змінах маркерів ОМП з наступною інактивацією при значній інтенсифікації вільнорадикального окиснення протеїнів.