

**Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича**

ННІ біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ
ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ БІСФЕНОЛУ ТА ОПРОМІНЕННЯ ТВАРИН
ДІОДНИМ ЛАЗЕРОМ ЧЕРВОНОГО СПЕКТРУ ДІЇ**

Кваліфікаційна робота
рівень вищої освіти - перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу

спеціальність 091 біологія

Родинчук Евеліна Владиславівна

Науковий керівник: д. б. н., професор М. М. Марченко

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____

від „____” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню біохімічних маркерів функціонального стану печінки за умов ведення бісфенолу А та опромінення тварин діодним лазером червоного спектру дії.

У роботі встановлено, що введення бісфенолу А супроводжується зростанням аланінамінотрансферазної та аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові. Опромінення тварин лазером червоного спектру дії супроводжується зниженням основних біохімічних маркерів функціонального стану печінки, проте лише за умов опромінення тварин після останнього введення ксенобіотика.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ І ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Основні маркери гепатотоксичності.....	6
1.2. Гепатотоксичність бісфенолу А.....	12
1.3. Вплив лазерного опромінення на біологічні об'єкти	13
РОЗДІЛ ІІ МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	18
2.1. Об'єкт та методи дослідження.....	18
РОЗДІЛ ІІІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ..	24
ВИСНОВКИ.....	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	31
ДОДАТКИ.....	35

ВСТУП

На сьогодні одну з найсерйозніших медико-соціальних проблем становлять екзогенно-токсичні ураження печінки, які виникають внаслідок впливу низки різноманітних фізичних і хімічних факторів, серед яких – медикаментозні препарати, алкоголь, токсини грибів, засоби побутової хімії тощо [1, 2]. Зокрема, в результаті масового виробництва та широкого застосування повсюдним стала присутність в життєдіяльності людини та навколишньому середовищі бісфенолу А (далі – БФА), який досить часто використовується для синтезу полікарбонатних пластмас, епоксидної смоли та інших полімерних матеріалів (в т. ч. і харчових ємкостей). БФА може потрапляти в організм різними шляхами (через травний тракт, дихальну систему чи шкірні покриви). При цьому, метаболізм БФА характеризується головним чином реакціями кон'югації II фази в шлунково-кишковому тракті та печінці. В подальшому БФА може призвести до низки патологічних порушень (ендокринних, нейро-, гепато-, генотоксичних проблем тощо) [1].

В даний час все частіше повідомляється про перспективність використання у діагностиці та лікуванні пристроїв, що випромінюють низькі дози лазерного світла. Адже, продемонстровано, що червоне лазерне випромінювання низької потужності здатне індукувати захисний модифікуючий ефект. Останнє обумовлено впливом на систему антиоксидантного захисту, яка контролює в організмі рівень вільних радикалів та процесів пероксидного окиснення ліпідів, що утворюються в процесі біохімічних реакцій за участю активних форм кисню. В свою чергу, антиоксидантна система запобігає розвитку некерованих ланцюгових реакцій (наприклад, реакцій перекисного окиснення ліпідів) [3].

Враховуючи вищесказане, *метою* роботи було дослідити зміни активності аланін- та аспартатамінотрансфераз у сироватці крові щурів за умов надходження бісфенолу А та опромінення тварин лазером червоного спектру дії.

Для реалізації мети були поставлені наступні *завдання*:

- визначити аланін- та аспартатамінотрансферазні активності у сироватці крові щурів за умов надходження бісфенолу А та опромінення тварин лазером червоного спектру дії.
- розрахувати коефіцієнт де-Рітиса у різних експериментальних групах тварин.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Основні маркери гепатотоксичності

Важливу роль у діагностиці захворювань печінки, оцінці ступеня її пошкодження, ефективності відновлення відіграє визначення ферментів, активність яких у крові залежить від проникності мембранних систем клітини та її органел. Традиційно визначаються трансамінази («ферменти некрозу») [2].

Варто зазначити, що гепатотоксичність – це структурно-функціональні порушення печінки, викликані чужорідними речовинами (ксенобіотиками). Відповідно, хімічні речовини, що викликають травмування печінки, називаються гепатотоксинами. Останні часто завдають субклінічного пошкодження печінці, що проявляється «аномальними» аналізами печінкових ферментів (аспартатамінотрансферази – АсАТ (ЕС 2.6.1.1.), аланінамінотрансферази – АлАТ (ЕС 2.6.1.2.), лужної фосфатази – ЛФ) [5].

Найбільш чутливим та специфічним індикатором гепатоцелюлярного ушкодження (запалення та некрозу) клітин печінки є активність АлАТ, що зумовлено її знаходженням в цитоплазмі гепатоцита, і, відповідно, підвищення АлАТ корелює зі ступенем цитолізу останнього. Також про некроз гепатоцита, який супроводжується розпадом клітинних органел, вказує значне підвищення АсАТ. Підвищення активності ЛФ свідчить про холестаз будь-якого генезу та дифузне ураження печінки. Ізольоване зростання рівня ЛФ є несприятливою прогностичною ознакою і може свідчити про розвиток гепатоцелюлярної карциноми [2].

АлАТ (аланінамінотрансфераза) каталізує утворення глутамінової кислоти з α -кетоглутарової під час трансамінування аланіну. Цей фермент присутній у клітинах різних тканин, зокрема в печінці та нирках, і він є індикаторним ферментом.

Фермент АлАТ каталізує перенесення аміногруп з L-аланіну на α -кетоглутарат. Внаслідок трансамінування α -кетоглутарової кислоти й аланіну

у печінці за дії АЛАТ утворюється L-глутамат і піруват. У цьому процесі необхідним є кофермент піридоксальфосфат. АЛАТ в основному локалізована в цитозолі гепатоцитів. Активність АЛАТ у клітинах печінки приблизно в 3000 разів перевищує активність АЛАТ у сироватці крові. Коли відбувається пошкодження печінки, АЛАТ вивільняється з пошкодженої клітини печінки та потрапляє у кров. АЛАТ також знаходиться в м'язах, жировій тканині, кишечнику, товстій кишці, передміхуровій залозі та мозку; однак концентрація АЛАТ у цих органах набагато нижча, ніж у печінці [4].

АсАТ каталізує утворення глутамінової кислоти із α -кетоглутарової під час трансамінування аспарагінової кислоти. Внаслідок трансамінування α -кетоглутарової й L-аспарагінової кислот за дії аспартатамінотрансферази утворюються L-глутамінова та щавелевооцтова кислоти. Остання самовільно декарбоксилюється до піровіноградної кислоти. Цей фермент міститься у клітинах різних тканин (найбільше – у серцевому м'язі, в печінці, нирках і підшлунковій залозі). Подібно до інших індикаторних ферментів, аспартатамінотрансферазна активність сироватки крові у нормі є низькою (0,1-0,45 мкмоль/(год×мл). Зростання рівнів цього показника є свідченням цитолітичних процесів і, зокрема, спостерігається при інфаркті міокарда, важкій серцевій недостатності, некротичній загибелі гепатоцитів за гепатиту, цирозу та інших печінкових розладів.

Своєчасне виявлення ураження печінки, є дуже важливим, оскільки підвищення АЛАТ і АсАТ при ранньому виявленні є зворотним процесом [6].

Залежно від величини співвідношення АЛАТ і лужної фосфатази (ЛФ) можна визначати тип ураження печінки [6]:

а) якщо рівень АЛАТ підвищений в >5 разів від верхньої межі норми, а індекс R (співвідношення рівня АЛАТ до рівня ЛФ) ≥ 5 , то це свідчить про гепатоцелюлярне ураження печінки;

б) у разі підвищення ЛФ в >2 рази, а індексу R в ≤ 2 діагностується холестатичне ураження печінки;

в) якщо показники підвищуються в >2 рази від верхньої межі норми, а індекс R знаходиться в діапазоні 2-5, то діагностують змішане ураження печінки;

г) холестатичне ураження печінки має довший перебіг, ніж гепатоцелюлярне; водночас тяжкість гепатоцелюлярного ураження печінки вища, ніж холестатичного.

Корисним у диференційній діагностиці уражень печінки є співвідношення АсАТ/АлАТ, яке відоме під назвою Коефіцієнт де Рітіса (далі – КдР). Співвідношення цих індикаторних печінкових ферментів має діагностичне значення за рахунок органоспецифічності та органелоспецифічності ензимів. Так, АлТ є цитоплазматичним ферментом і підвищується першим при гепатоцелюлярному пошкодженні. АсТ локалізується в мітохондріях, і підвищення його рівня відбувається при більш глибоких ураженнях печінкової клітини [7].

Оскільки обидва ферменти є внутрішньоклітинними, то в сироватці крові здорових людей їхня активність є незначною (АСТ: 0,1-0,45 ммоль/год $\times$ л, або 8-40 МО; АЛТ: 0,1-0,68 ммоль/год $\times$ л, або 5-30 МО). Відповідно, КдР становить у нормі $1,33 \pm 0,42$, або $0,91 \div 1,75$. Діагностичне значення мають зменшення КдР менше ніж 1,0 та збільшення понад 2,0. Зокрема, менше 1,0 є характерним для нетоксичного стеатозу та стеатогепатиту чи зниження функціональної активності печінки, а високий КдР (2,0) є достовірною ознакою токсичного ураження печінки. В умовах інтенсивного фізичного навантаження КдР є індикатором активації глюконеогенезу через глюкозоаланіновий шунт із використанням АлАТ, який є необхідним для підтримки адекватного рівня глюкози у крові та розвитку гіпоглікемії, що призводить до зростання активності трансаміназ [7].

Згідно відомостей літератури вищий КдР асоціюється зі збільшеною смертністю за цирозу печінки. У медичній літературі вказують на те, що АсАТ/АлАТ є вищим у жінок, ніж у чоловіків [7].

Активність обох трансфераз у крові суттєво зростає під час руйнування клітин, тобто є критерієм синдрому цитолізу. Зменшення КдР може спостерігатись за умов зменшення активності АСТ або збільшення АЛТ. Оскільки активність цитоплазматичного ізоферменту АЛТ переважає над АСТ, то цитоліз клітин із виходом обох цитоплазматичних ізоферментів супроводжується зниженням КдР [8].

Окрім коефіцієнта де Рітиса, для діагностики хвороб печінки використовують також інші співвідношення печінкових ензимів:

- (АСТ+АЛТ)/ГлДГ (глутаматдегідрогеназа; коефіцієнт Шмідта),
- ЛДГ (лактатдегідрогеназа)/АСТ, АЛТ/ГлДГ,
- ГГТП(гамма-глутамілтранспептидаза)/АСТ [8] (табл. 1.1).

Таблиця 1.

Співвідношення активностей ферментів у сироватці крові [8]

Патологічний процес чи хвороба	Показник
АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітиса)	
Запальний тип: АСТ<АЛТ	<1
Некротичний тип: АСТ>АЛТ — при алкогольному ураженні чи пухлинах печінки	>1 >2
(АСТ+АЛТ)/ГлДГ (коефіцієнт Шмідта)	
Метастази в печінку	<10
Обтураційна жовтяниця	5-20
Біліарний цироз	20-30
Загострення хронічного гепатиту, активний цироз печінки	30-40
Холестатичний гепатоз	40-50

Гострий вірусний гепатит. Гострий алкогольний гепатит	>50
ЛДГ/АСТ	
Гемолітична жовтяниця	>12
Гепатоцелюлярна жовтяниця	<12
АЛТ/ГЛДГ	
Обтураційна жовтяниця	<10
Гепатоцелюлярна жовтяниця	>10
ГГТП/АСТ	
Гострий вірусний гепатит	<1
Токсичний гепатит. Хронічний персистивний гепатит	<2
Хронічний гепатит. Гострий алкогольний гепатит. Цироз печінки	2-3
Алкогольний цироз. Гостра обтураційна жовтяниця	3-6
Біліарний цироз. Хронічна обтураційна жовтяниця	>6
Рак печінки/метастази в печінку	>12

Печінка відіграє центральну роль у численних реакціях проміжного обміну вуглеводів. Серед них особливо важливі перетворення галактози в глюкозу; перетворення фруктози в глюкозу; синтез і розпад глікогену; глюконеогенез, окислення глюкози, утворення глюкуронової кислоти [7].

Печінка є єдиним постачальником глюкози в кров, тому що тільки під впливом печінкової мікросомальної глюкозо-6-фосфатази із глюкозофосфату звільняється глюкоза. Швидке фосфорилування глюкози і затримка її в печінці попереджують значне підвищення вмісту глюкози у загальному колі кровообігу (фосфорильована глюкоза не виходить із клітин у кров). Таким чином, під впливом зворотних реакцій глікогенолізу і глюконеогенезу

регулюється кількість глюкози відповідно до потреб організму. Завдяки цьому печінка строго підтримує концентрацію глюкози у межах фізіологічної норми (3,33-5,55 ммоль/л). Стан, при якому вміст глюкози в крові знаходиться вище норми називають гіперглікемією, нижче норми – гіпоглікемією [7].

Використання показника рівня глюкози як маркера порушення функції печінки доведено і дослідженнями Li Y. et al. (2019). Показано, що вірусний гепатит С характеризується зростанням рівня глюкози в крові натще. Це обумовлене порушенням функцій печінки у вуглеводневому обміні, зокрема метаболізмі глюкози, і виникненням стану, що зменшує поглинання глюкози клітинами печінки, відповідно її більше надходило у кров. Після антивірусного лікування і одужання вчені відмітили значне зниження рівня глюкози в крові натще незалежно від результату лікування. Аналогічні зміни відмічені при дифузних ураженнях печінки (гепатити А і В, гостра жовта атрофія печінки, токсичні ушкодження паренхіми печінки, а також цирози та сифіліс печінки) результати проби позитивні [9]. Завдяки багатогранності метаболічних функцій печінки, багаточисельності та мозаїчності їх порушень, не можна користуватися яким-небудь одним «універсальним» тестом. Тому необхідно підібрати комплекс методик, найбільш інформативних для даного патологічного стану, з урахуванням характеру патології і фази захворювання [10].

Таким чином, визначення біохімічних показників дає змогу оцінити стан організму, не застосовуючи спеціальні методи дослідження. При цьому, більш інформативними є інтегральні та маркерні показники гепатотоксичності. Вони можуть оцінити інтенсивність, спрямованість та характер перебігу типових патологічних процесів.

1.2. Гепатотоксичність бісфенолу А

Бісфенол А (BPA, 2-біс (4-гідроксифеніл) пропан; BPA) – це органічна синтетична сполука, що за хімічною природою є похідним дифенілметану та

бісфенолів, та у своєму складі містить дві гідроксифенільні групи [11].

За оцінками експертів у 2015 році було створено 4 мільйони тонн хімічної речовини, отриманої з ВРА, що робить її однією з найбільших вироблених органічних хімічних речовин у світі. ВРА є речовиною-попередником, з якої виготовляють широковживані пластмаси, зокрема полікарбонати, епоксидні смоли, деякі полісульфони тощо. Пластик на основі ВРА прозорий, міцний і вогнестійкий. Основні сфери застосування включають: електроніку (наприклад, корпус для електроприводу), будівельні матеріали (наприклад, вікна), автомобільну техніку (кришки фар), зберігання даних (наприклад, компакт-диски) [11].

В організм людини ВРА здебільшого потрапляє пероральним шляхом (наприклад з їжею, що зберігається в пластикових ємностях). Надходження даного ксенобіотика можливе також і через дихальні шляхи (провокує астматичні напади, бронхоспазми, кашель); слизові, наприклад, очей (зумовлює набряк чи свербіння, кон'юнктивіт); покриви шкіри (викликає дерматити і почервоніння [12]. Небезпека полягає і в тому, що БФА володіє здатністю миттєвої абсорбції (достатньо і 5 хвилин, за певних умов – і 20). При цьому біодоступність БФА складає понад 70 %. Подібність фенольних груп ВРА до фенолів, що утворюються бактеріями кишечника, впливає на здатність ВРА до кон'югування з глюкуроновою кислотою як в кишечнику, так і в печінці. В подальшому відбувається його перетворення на нетоксичні кон'югати і практично повне виведення із сечею [13].

В 2017 році Європейське агентство з хімічних речовин дійшло висновку, що ВРА слід внести до списку речовин, що викликають велике занепокоєння, через його властивості як ендокринних руйнівників. Так, доведено, що ВРА – це ксеноестроген, який проявляє імітуючі естроген-гормоноподібні властивості [14].

Здатність ВРА імітувати ефекти природного естрогену походить від подібності фенольних груп як на ВРА, так і на естрадіол, що дозволяє цій

синтетичній молекулі запускати естрогенні шляхи в організмі [11]. Як правило, фенолвмісні молекули, подібні до ВРА, мають слабку естрогенну активність, тому його також вважають ендокринним руйнівником (ЕД) та естрогенною хімічною речовиною. Ксеноестрогени – це ще одна категорія, до якої підходить хімічна речовина ВРА, завдяки своїй здатності переривати мережу, яка регулює сигнали, що контролюють репродуктивний розвиток у людей і тварин. Крім того токсичність ВРА проявляється у розладах імунної системи, щитовидної залози, метаболізму [11], а також стає передумовою виникнення процесів нефротоксичності [13] та є одним із потенційних індукторів гепатотоксичності *in vivo* [15]. У високих концентраціях БФА може викликати оксидативний стрес, порушуючи баланс між генеруванням активних форм Оксигену та їхнім знешкодженням антиоксидантною системою. При зниженні активності ензимів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза, може відбуватись пероксидне окиснення ліпідів, що спричиняє окислювальний стрес. До того ж, ВРА (бісфенол А) спричиняє утворення пероксинітриту супероксидного та радикалу, за рахунок яких можливе пошкодження тканини. Наприклад, науково доведено, що ВРА викликає окислювальний стрес у нирковій паренхімі, а це пошкодження може бути ще більшим через дефіцит неферментативних антиоксидантів [13].

1.3. Вплив лазерного опромінення на біологічні об'єкти

Серед науковців лазерне (або світлове) опромінення низькими рівнями відоме під назвою фотобіомодуляція, суть котрого полягає у це застосуванні монохроматичного когерентного світла низьких енергетичних рівнів, червоного і ближнього інфрачервоного спектру (600-1000 нм), джерелом і виступає лазер. Перевагою даного методу є його неінвазивність [18].

Біологічний ефект полягає в наступному. Однією з найважливіших хромофорів є оксидаза цитохрому С (одиниця IV у дихальному ланцюзі мітохондрій), що містить як гем-, так і купрум-центри, які поглинають світло

в ближній інфрачервоній області. Так, згідно з провідною гіпотезою, фотони дисоціюють інгібуючий оксид азоту від ферменту, що призводить до збільшення транспорту електронів, мембранного потенціалу мітохондрій та продукування аденозинтрифосфату (АТФ). Інша гіпотеза стверджує, що світлочутливі іонні канали можуть активуватися, пропускаючи кальцій у клітину. Після початкових процесів поглинання фотонів активуються численні сигнальні шляхи за допомогою активних форм кисню, циклічного АМР, NO та Ca^{2+} , що призводить до активації факторів транскрипції. Ці фактори транскрипції можуть призвести до підвищеної експресії генів, пов'язаних із синтезом білка, міграцією та проліферацією клітин, протизапальною сигналізацією, антиапоптотичними білками, антиоксидантними ферментами. Стовбурові клітини та клітини-попередники, як виявлено, особливо сприйнятливі до LLLT [17, 18, 19]. Так, механізм дії ІЧ (інфрачервоного) лазерного випромінювання зазвичай пов'язана з його тепловим ефектом. ІЧ випромінювання має низьку енергію, що не викликає вираженого фотохімічного ефекту в тканинах. При поглинанні ІЧ випромінювання тканинами, його енергія перетворюється на теплову енергію, яка викликає вібрацію молекул. Це може призводити до розширення протоплазми клітин і гідродинамічного удару, що є початковим імпульсом більш загального впливу ІЧ випромінювання. У результаті цих процесів різні біологічні сполуки можуть переходити в активний стан або інактивуватись. Важливо відзначити, що світло у ближній ІЧ спектральній області слабо поглинається меланіном, водою та іншими компонентами тканин, що сприяє його високій проникності [20, 21].

Так, специфічність відповіді на лазерне випромінювання виявляється в особливостях первинної відповіді (фотореакції) та наступних етапів спряження, які виникають у результаті локальних атомно-молекулярних змін. Після первинної резонансної абсорбції енергії світлового кванта або розподілу поглиненої енергії між збудженими станами окремих атомних груп

відбуваються конформаційні перебудови макромолекул. Це може призводити до зміни активності ключових ферментів тканинного метаболізму та мікроархітекτονіки клітинних мембран [20].

Отже, характер взаємодії світла з біотканиною залежить як від параметрів джерела випромінювання (довжина хвилі, інтенсивність, довжина та частота повторення імпульсів і. т. д.), так і від параметрів біотканин (ступінь пігментації та однорідності тканини, її теплові та пружні властивості і. т. д.). Чим більше поглинання світла у певному хромофорі (пігмент, вода), тим менша глибина проникнення світла в біотканину. Таким чином, максимальне пропускання електромагнітного випромінювання через шкіру спостерігається в червоній та ближній інфрачервоній областях спектру (так звана прозорість біологічних тканин). «Так, у червоній та ближній інфрачервоній областях спектру ($\lambda = 620-1300$ нм) шкіра поглинає 25-40 % лазерного випромінювання, м'язи та кісткова тканина – 30-80 %, паренхімні органи (серце, печінка, нирки, підшлункова залоза, селезінка) – до 100 %» [20].

Вплив ЛВ на біологічні об'єкти можна охарактеризувати за рівнями реалізації реакції організму на цей вплив [21]:

- *субклітинним (молекулярним)* – виникненням збуджених станів молекул, утворенням вільних радикалів, стереохімічною перебудовою молекул, збільшенням швидкості синтезу білків, РНК, ДНК, зміною активності окисно-відновних процесів;
- *клітинним* – зміною заряду електричного поля клітини, її мембранного потенціала, збільшенням проліферативної активності тощо;
- *тканинним* – зміною рН міжклітинної рідини, морфо-функціональної активності та мікроциркуляції;
- *органичним* – нормалізацією функції певного органа;
- *системним та організменним* – виникненням комплексних адаптаційних нейро-рефлекторних та нейро-гуморальних реакцій з подальшою активацією симпатoadреналової та імунної систем.

Доведено, що червоне ЛВ з довжиною хвилі 655 нм низької потужності при його застосуванні перед введенням мутагену (у формі попередньої обробки) здатне індукувати модифікуючий ефект [17]. Так, використання LLLT було продемонстровано як коригуючий засіб для різноманітних патологічних процесів. Це досягається завдяки дозозалежній здатності LLLT викликати відновлення тканин і послаблювати негативні наслідки запалення і фіброзу. При цьому, LLLT знижує окислювальний стрес, що призводить до зменшення запалення і швидшого відновлення після процесів процеси нефротоксичності, а саме пошкоджених клітин (некроз) нирок чи навіть тканин порожнини рота [13].

Ефект червоного лазерного випромінювання базується на слідуєчих процесах [17]:

- активація тканинного дихання;
- інтенсифікація обмінних процесів у тканинах;
- зростання утилізації кисню клітинами;
- регулювання проникності бар'єрів між судинами та тканинами;
- збільшення проліферативних процесів у сполучній тканині.

Дані експерименту підтверджують що лазерне опромінення сприяє активації молекулярно-пептидних регуляторів та нейропептидів, які відповідають за контроль усіх функцій організму. Також спостерігається активація калікреїн-хінінової системи, а її продукти активації (кініни) впливають на регулювання тонуусу та рівня мікроциркуляторних процесів у тканинах [21]. Тому взаємодія лазерного випромінювання з біологічними об'єктами є специфічною, а специфічність ефекту залежить від довжини хвилі випромінювання. Біоефект лазерного випромінювання розпочинається з моменту поглинання енергетичного кванта фоточутливою біомолекулою, що призводить до активації численних сигнальних шляхів, що регулюють антиоксидантний захист організму в цілому.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт та методи дослідження

Дослідження проводили на щурах віком 2,5-3 місяці масою 180-200 г, яких утримували на звичайному харчовому раціоні віварію. Тварини мали вільний доступ до води та їжі. Поводження з тваринами та маніпуляції проводились відповідно зі статтею 26 Закону України No 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей», «Загальним етичним принципам експериментів на тваринах», ухвалених VII національним конгресом з біоетики.

Усі тварини були поділені на п'ять експериментальних груп:

I – контроль – інтактні тварини, що перебували на звичайному раціоні;

II – щури, яким упродовж трьох діб вводили бісфенол А (далі – БФА) у дозі 50 мг/кг (найнижча доза, при якій спостерігається найменший несприятливий ефект) [22];

III – щури, яких через 6 годин після кожного введення БФА у вищезгаданій дозі опромінювали лазерним діодом (НІЛО) за схемою БФА → НІЛО → БФА → НІЛО → БФА → НІЛО;

IV – щури, яких опромінювали лазерним діодом через 24 години після останнього введення (3-го) БФА, загальна схема: БФА → БФА → БФА → НІЛО → НІЛО → НІЛО;

V – щури, яким яких опромінювали лазерним діодом протягом 3 діб.

Опромінювали анатомічну ділянку черевної порожнини протягом 2 хв на відстані 10 см від поверхні шкіри діодним лазером червоного спектру дії, довжина хвилі – 650 нм, потужністю 50 мВт.

Токсичне ураження печінки оцінювали через 24 год після останнього введення ксенобіотика або опромінення. Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом, збирали кров з нижньої порожнистої вени. Сироватку крові отримували центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 15

хв. Ступінь ураження печінки визначали за допомогою каталітичної активності аспартатамінотрансферази (АсТ, ЕС. 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлТ, ЕС 2.6.1.2) та розрахунком коефіцієнту де-Рітиса (КдР).

Визначення аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові

Активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) у сироватці (плазмі) крові визначали за методом Райтмана-Френкеля, суть якого полягає у наступному: “Внаслідок переамінування, яке відбувається під дією аспартатамінотрансферази [ЕС 2.6.1.1.], утворюються глутамінова та оксалатнооцтова кислоти. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину ензиматичний процес зупиняється і утворюються в лужному середовищі забарвлені гідразони оксалатнооцтової та піровиноградної кислот (гідразон піровиноградної кислоти утворюється при самовільному декарбоксилюванні оксалатацетату та має більшу оптичну густину). За величиною абсорбції і визначали активність ферменту.

Проведення аналізу здійснювали за схемою наведеною в таблиці 2.1

Таблиця 2.1

Компоненти	Макро № 1		Макро № 2		Напівмакро		Мікро	
	Д	Х	Д	Х	Д	Х	Д	Х
Субстратно-буф.	0,5	0,5	0,4	0,4	0,25	0,25	0,1	0,1
Інкубують 5 хв при температурі 37 °С								
Сироватка	0,10	—	0,08	—	0,05	—	0,02	—
Інкубують 60 хв при температурі 37 °С								
2,4-ДНФГ	0,5	0,5	0,4	0,4	0,25	0,25	0,1	0,1
Сироватка	—	0,1	—	0,08	—	0,05	—	0,02

Витримують 20 хв. при кімнатній температурі								
Гідрооксид натрію	5,0	5,0	4,0	4,0	2,5	2,5	1,0	1,0
Витримують 10 хв. при кімнатній температурі. Вимірювали оптичну густину дослідної проби проти холостої проби.								

Примітка: X – холоста проба; Д – дослідна проба.

Побудова калібрувального графіку наведено за піруватом натрію (1,0 ммоль/л) наведено у таблиці 2.2 (в мілілітрах).

Таблиця 2.2

Компоненти	X	Калібрувальні проби				
		1	2	3	4	5
Дистильована вода	0,600	0,585	0,575	0,550	0,500	0,450
Калібратор 1,0 ммоль/л	–	0,015	0,025	0,050	0,100	0,150
	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
2.4-ДНФГ						
Витримують 20 хв при кімнатній температурі 37 °C						
Гідрооксид натрію	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірювали оптичну густину калібрувальних проб проти холостої проби						
мкмоль/(год-мл)	0	0,300	0,500	1,000	2,000	3,000
мккат/л	0	0,083	0,139	0,278	0,556	0,834
Од/л	0	4,990	8,330	16,67	33,34	50,01

"[25].

Визначення активності аланінамінотрансфери

[illegible]

Побудова калібрувального графіку наведено за піруватом натрію (1,0 ммоль/л) наведено у таблиці 2.4 (в мілілітрах).

Таблиця 2.4

Компоненти	X	Калібрувальні проби				
		1	2	3	4	5
Дистильована вода	0,600	0,585	0,575	0,550	0,500	0,450
Калібратор 1,0 ммоль/л	—	0,015	0,025	0,050	0,100	0,150
2.4-ДНФГ	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Витримують 20 хв. при кімнатній температурі 37 °C						
Гідрооксид натрію	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Витримують 10 хв. при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину калібрувальних проб проти холостої проби.						
мкмоль/(год-мл)	0	0,300	0,500	1,000	2,000	3,000
мккат/л	0	0,083	0,139	0,278	0,556	0,834
Од/л	0	4,990	8,330	16,67	33,34	50,01

Коефіцієнт де Рітиса розраховували як співвідношення показників АсАТ до показників АлАТ (АсАТ/АлАТ)” [26].

Статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали за допомогою пакету комп’ютерної програми Microsoft Excel, використовуючи при цьому t-критерій Стьюдента. Статистично вірогідною вважали різницю при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На сьогоднішній день однією з основних цілей біомедичних досліджень є дослідження гепатотоксичності, що обумовлено постійно зростаючим токсичним впливом на печінку як органу гомеостазу та детоксикації різних чужорідних речовин (наприклад, засобів побутової хімії, медикаментозних препаратів, алкоголю тощо) [3, 4, 6, 10]. Одним з таких є і бісфенол А (ВРА) [11]. Відповідно поглиблене дослідження механізмів прогресування гепатотоксичності за допомогою адекватних експериментальних моделей сприятиме кращому розумінню біохімічних процесів і подальшій розробці та апробації нових підходів для протидії цій патології [22].

Відомо, що найбільш чутливим та специфічним індикатором проявів гепатотоксичності є активність печінкових ферментів (аспартатамінотрансферази – АсАТ, аланінамінотрансферази – АлАТ) [7].

Результати проведених нами досліджень показали, що введення 50 мг/кг ВРА супроводжується підвищенням АлАТ активності у сироватці крові (рис. 3.1). Даний показник був вищим у ~2 рази, ніж відповідний показник у контрольній групі тварин. Отримані нами дані вказують на те, що введення ВРА супроводжується пошкодженням гепатоцитів, їх цитолізom та виходом АлАТ у кров. Такий вплив ВРА, як відомо з джерел літератури та попередніх досліджень, проведених на кафедрі, пов'язаний з активацією вільнорадикальних процесів у печінці, що і призводить до пошкодження даного органу [3, 24].

Водночас, у групі тварин, яких через 6 годин після кожного введення БФА у вищезгаданій дозі опромінювали лазерним діодом (далі – НІЛО) за схемою БФА → НІЛО → БФА → НІЛО → БФА → НІЛО; III група – *ВРА+НІЛО*) зафіксовано незначне зниження АлАТ активності у сироватці крові порівняно з групою тварин, яким вводили БФА. Проте даний показник

не досягав величини показника у контрольній групі тварин, та був вищим за відповідну величину у цій групі тварин на 37%.

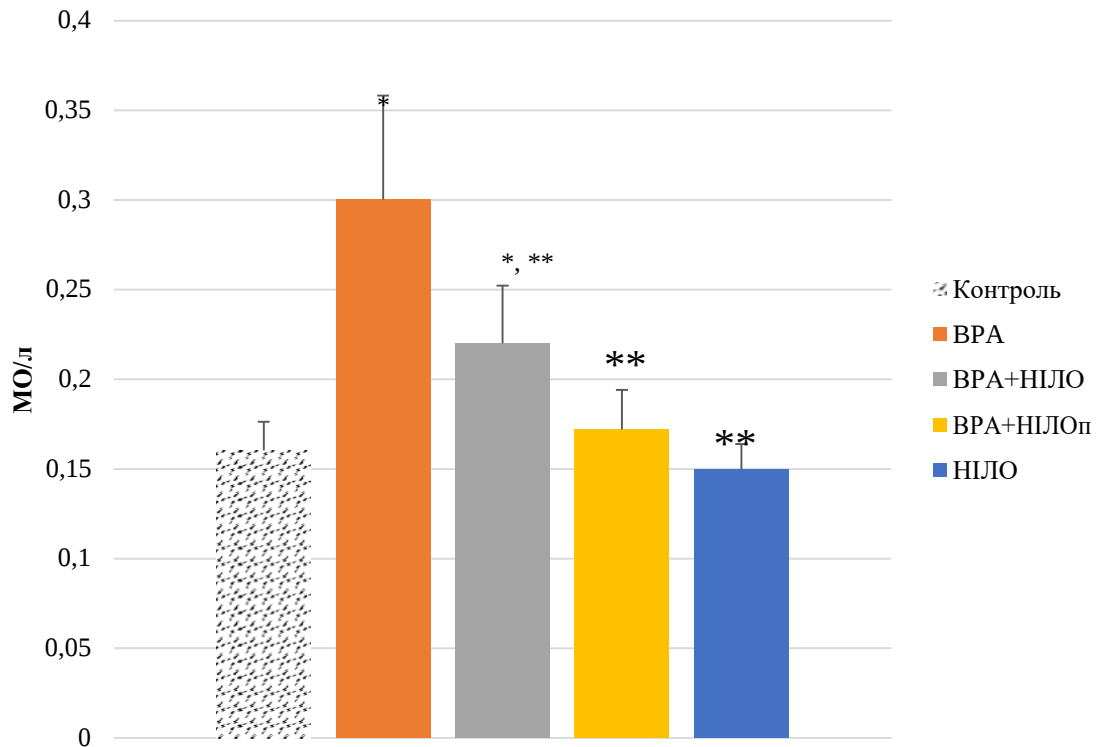


Рис. 3.1. Аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення БФА та опромінення діодним лазером

Примітка (тут і далі):

* - статистично достовірна різниця з контролем; ** - статистично достовірна різниця, порівняно з групою тварин БФА, БФА – бісфенол А, НІЛО – низькоінтенсивне лазерне опромінення, НІЛО_п - низькоінтенсивне лазерне опромінення після введення ксенобіотика

Водночас, зміна режиму опромінення супроводжувалась ще більшим зниженням АлАТ активності, зокрема, її показник у групі тварин БФА+НІЛО_п був нижчим на 43% порівняно з показником у групі тварин яким вводили лише БФА та статистично вірогідно відрізнявся від показника групи інтактних тварин. Отримані результати, ймовірно, пов'язані з впливом світла червоного спектру дії на процеси гепатотоксичності, індуковані введенням БФА. Так, можливо, дія низькоінтенсивного лазерного опромінення полягає у

підвищенні антиоксидантного потенціалу шляхом впливу на ензиматичні активності. Це може сприяти зменшенню окислювального стресу та покращенню захисних механізмів організму.

Введення 50 мг/кг ВРА супроводжується підвищенням також підвищенням АсАТ активності у сироватці крові щурів цієї групи. Значення останнього було вищим за відповідний показник у контрольній групі тварин на 38 % (рис. 3.2).

Порівнюючи активність обох печінкових маркерних ферментів бачимо, що введення 50 мг/кг ВРА супроводжується підвищенням активності і АлАТ, і АсАТ. Проте поєднуючи введення ксенобіотику з НІЛО виявляє дещо різнонаправлений характер дії (рис. 3.1, 3.2). Дане спостереження ми можемо пояснити тим фактом, що за дії БФА відбувається пошкодження гепатоцитів, та АсАТ, яка локалізована в мітохондріях, виходить у кров, що може свідчити про глибоке ураження клітин печінки [7-8].

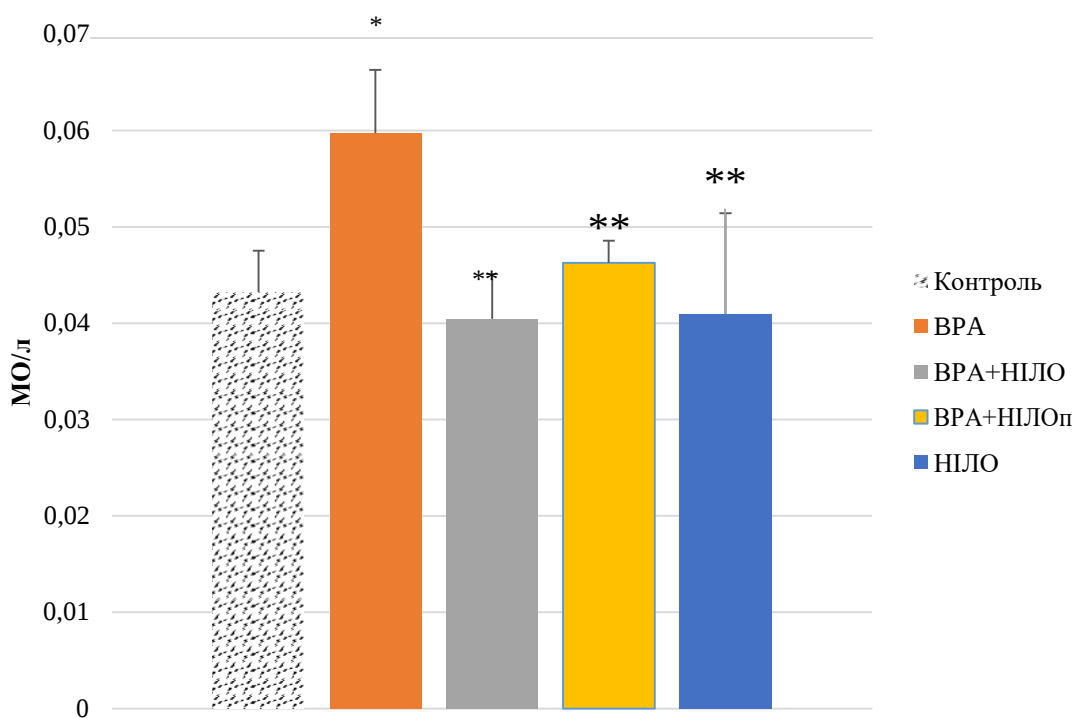


Рис. 3.2. Аспаратамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов введення БФА та опромінення діодним лазером

Натомість, у групі тварин, які отримували БФА у вищезгаданій дозі та опромінювали за схемою БФА → НІЛО → БФА → НІЛО → БФА → НІЛО відмічено зниження АсАТ активності в сироватці крові, у порівнянні з БФА групою на 32% та статистично-вірогідно не відрізнялись від відповідного показника контрольної групи.

Тотожні зміни АсАТ активності зафіксовано при зміні режиму опромінення, а саме при опроміненні за схемою БФА → БФА → БФА → НІЛО → НІЛО → НІЛО. Зокрема, показник даної ензиматичної активності знижувався на 23% порівняно з групою тварин, яким вводили ксенобіотик, та статистично-вірогідно не відрізнялись від відповідного показника контрольної групи.

Повідомляється, що корисним у диференційній діагностиці уражень печінки є співвідношення АсАТ/АлАТ, яке відоме під назвою Коефіцієнт де Рітиса (далі – КдР). Співвідношення цих індикаторних печінкових ферментів має діагностичне значення за рахунок органоспецифічності та органелоспецифічності ензимів [8].

Результати проведених нами досліджень показали, що введення КдР у групі тварин, яким вводили БФА менший за 1 (рис. 3.3), що вказує на пошкодження гепатоцитів за дії даного ксенобіотика. Відомо, що співвідношення АсАТ/АлАТ менше 1,0 є характерним для нетоксичного стеатозу та стеатогепатиту [7]. Зменшення КдР може спостерігатись за умов зменшення активності АсАТ або збільшення АлАТ. Оскільки активність цитоплазматичного ізоферменту АлАТ переважає над активністю цитоплазматичного ізоферменту АсАТ, то цитоліз клітин із виходом обох цитоплазматичних ізоферментів супроводжується зменшенням КдР<1,0 [8].

Водночас опромінення тварин діодним лазером після кожного введення ксенобіотика, не призвело до підвищення даного показника

Обернена тенденція, тобто зростання КдР, спостерігалася у групі тварин, яких опромінювали лазерним діодом через 24 години після останнього

введення (3-го) БФА, загальна схема: БФА → БФА → БФА → НІЛО → НІЛО → НІЛО) та у групі тварин, яких опромінювали лазерним діодом протягом 3 діб. Так, зареєстровано достовірне підвищення КдР відносно групи тварин, яким вводили БФА. Якщо порівняти КдР даної групи з групою інтактних тварин, то даний показник статистично-достовірно не відрізнявся (рис. 3.3).

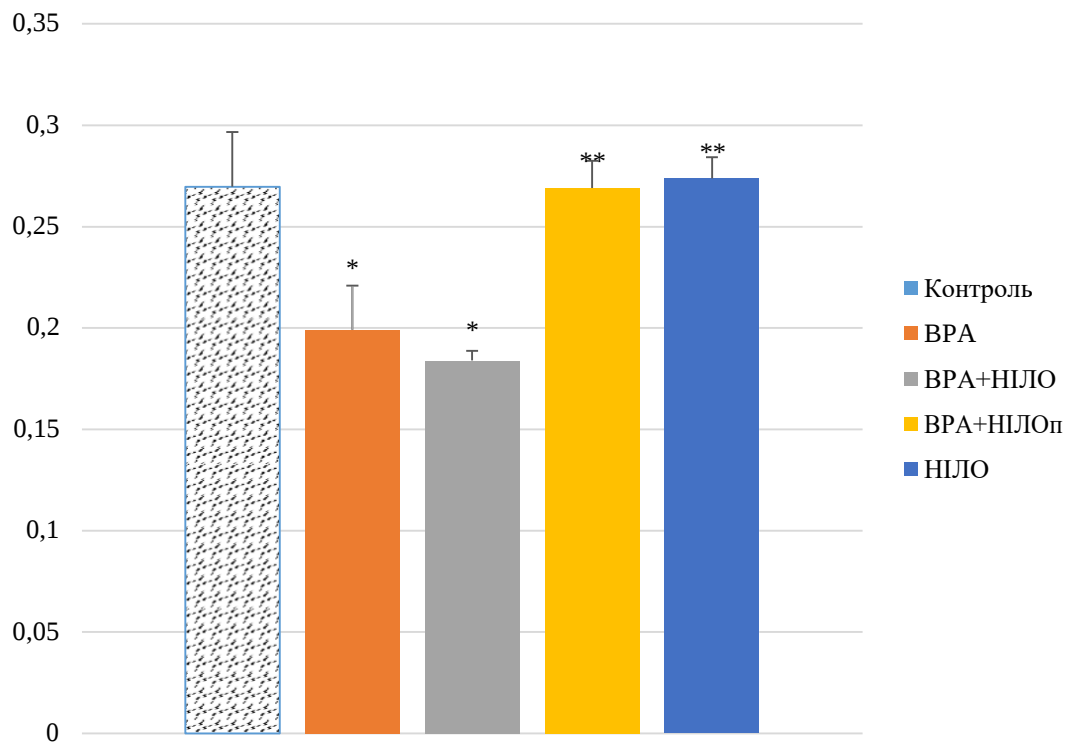


Рис. 3.3. Коефіцієнт de Ritis в сироватці крові щурів за умов введення БФА та опромінення діодним лазером

Таким чином, в результаті наших досліджень встановлено, що введення ВРА супроводжується зростанням активності амінотрансфераз, що вказує на розвиток процесів гепатотоксичності. Таке підвищення первинних біохімічних показників гепатотоксичності може бути пов'язано з окислювальними ураженнями ліпідів та білків печінки, що може бути результатом дії токсичних радикалів ВРА або активації вільнорадикальних процесів, спричинених ВРА [3].

Зниження активності АлАТ та АсАТ при опроміненні тварин

низькорівневим діодним лазером може бути пов'язано з впливом червоного світла на процеси гепатотоксичності, зокрема на стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

Отже, отримані результати свідчать, що лазерне опромінення може сприяти нормалізації функціональної роботи гепатоцитів шляхом зниження інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – що виникають при введенні вірусних агентів (ВРА). Встановлені нами факти мають підтвердження і у інших дослідницьких роботах [13, 15], де повідомляється про дію лазерного опромінення низької потужності як корегуючого засобу різноманітних патологічних процесів, оскільки завдяки своїй дозозалежній здатності воно може викликати відновлення та послаблювати негативні наслідки ксенобіотиків. НІЛО знижує окислювний стрес. Так, на дію червоного світла також було зафіксовано збільшення потенціалу мітохондріальної мембрани, що призводить до підвищення синтезу аденозинтрифосфату (АТФ) та прискореного відновлення тканин [24].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що введення бісфенолу А супроводжується зростанням аланінамінотрансферазної та аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові.

2. Опромінення тварин лазером червоного спектру дії супроводжується зниженням основних біохімічних маркерів функціонального стану печінки, проте лише за умов опромінення тварин після останнього введення ксенобіотика.