

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗИНА

**БЕЗРОДНА АНАСТАСІЯ ІГОРІВНА**

УДК 616.36-092.9:543.395

**ВПЛИВ БЛОКСОПОЛІМЕРІВ НА ОСНОВІ ОКСИПРОПІЛЕНУ  
ТА ЕТИЛЕНУ НА ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО  
СТАНУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ТА КОРЕКЦІЯ ЙОГО ПОРУШЕНЬ**

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового  
ступеня кандидата біологічних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор  
**Наконечна Оксана Анатоліївна,**  
Харківський національний  
медичний університет,  
Міністерства охорони здоров'я України,  
м. Харків  
завідувач кафедри біологічної хімії

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Кравченко Віра Миколаївна,**  
Національний фармацевтичний університет  
Міністерства охорони здоров'я України,  
м. Харків  
професор кафедри біологічної хімії

доктор біологічних наук, професор  
**Жегунов Геннадій Федорович,**  
Харківська державна зооветеринарна академія  
Міністерства освіти і науки України,  
м. Харків  
завідувач кафедри хімії та біохімії ім. В. О. Чечоткіна

Захист відбудеться «29» \_\_\_\_\_ листопада 2019 р. о 15-15 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-26

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий 28.\_10\_. 2019 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

М. К. Ковальова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Одним з перспективних напрямів сучасної біохімії є ксенобіохімія, що вивчає вплив шкідливих хімічних факторів навколишнього середовища, молекулярні механізми ефектів та закономірності їх перетворення в організмі (Божков А. І. та ін., 2017; Перський Є. Е. та ін., 2017; Загайко А. Л., 2018).

Актуальність проведення експериментальних досліджень з розкриття біохімічних механізмів розвитку дисметаболических процесів в організмі за умов впливу ксенобіотиків (КБ) обумовлено зростаючим проникненням хімічних речовин до середовища перебування людини (Наконечна О. А., 2017; Кот Ю. Г. та ін., 2018). Визначено, що 42 % КБ потрапляють в атмосферу повітря, 12 % - вивозяться на смітник, 11 % - надходять на присадибні ділянки, 7 % - забруднюють територію населених пунктів, а 6 % залишаються в житлових приміщеннях (Eerkes-Medrano D. et al., 2015; Hortonab A. A. et al., 2017).

До числа найбільш поширених та широко використовуваних речовин практично в усіх галузях господарства України відносяться блоксополімери (БП) на основі оксипропілену та етилену (Щербань М. Г. та ін., 2016). Населення України щорічно використовує полімери етилену карбамідних смол, фарб та лаків на основі поліефірів, акрилових і вінілових полімерів, об'єм яких досягає 302,6 тис. т.; мила на основі поверхнево-активних речовин (ПАР) та парфумних, косметичних і туалетних засобів – 100,1 тис. т.; гумових та пластмасових виробів з використанням ПАР – 288,4 тис. т.; пестицидів та агрохімічної продукції на основі ПАР – 1242,2 тис. т.; будівельних виробів з пластмас – 11821,0 тис. т.; тари з пластмас – 371,3 тис. т.; продукції домашнього вжитку з пластмас – 49,3 тис. т. (Гребняк М. П., 2017; Шевченко О. А., 2018).

Захворювання печінки, зокрема гострі та хронічні гепатити, цирози займають одне з найпоширеніших місць у патології людини, в патогенезі яких відводиться значна роль КБ (М'ясоєдов В. В., 2001; Божков А. І. та ін., 2016).

Необхідність вивчення впливу БП на показники функціонального стану печінки обумовлена недостатньою інформацією в існуючій літературі про механізми виникнення метаболічних порушень в організмі за умов їхньої тривалої дії (Абрамова Л. П., 2015; Бабійчук Л. А., 2016; Зубов П. М., 2017).

Однією з функцій печінки є детоксикаційна, що пов'язана з процесами біотрансформації КБ та ендогенних речовин. Порушення механізмів кон'югації КБ залишками глюкуронової, сірчаної кислот, гліцину, глутатіону та інших речовин призводить до порушення гомеостазу та розвитку патологічних станів (Бондарева А. В., 2017; Бараннік Т. В., 2018). Відомо, що в процесі метаболізму КБ утворюються активні форми кисню та інтермедіати, що сприяють розвитку оксидативного стресу та зв'язуються з компонентами мембран та іншими клітинними структурами (Качула С. О., 2015; Губський Ю. І., 2017).

Однак, не дивлячись на розповсюдженість даної групи КБ, вплив БП на основі оксипропілену та етилену на функціональний стан печінки щурів та його корекція залишається невивченою.

В такому разі поглиблені дослідження ролі оксидантно-антиоксидантної системи, стану цитоплазматичних мембран клітин, різних видів клітинної смерті (апоптоз, некроз) гепатоцитів, порушення метаболізму білків, вуглеводів, ліпідів та їхньої регуляції, інтенсивності репарації ДНК, біотрансформації за умов субтоксичної дії КБ та їх корекція на сьогодні є актуальним завданням.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри біохімії біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна та кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету в рамках Договору № 201/11-18/Н про науково-практичне співробітництво між Харківським національним університетом імені В. Н. Каразіна та Харківським національним медичним університетом згідно виконання НДР кафедри біологічної хімії ХНМУ «Біохімічні механізми розвитку дисметаболических процесів за умов впливу хімічних чинників навколишнього середовища» № державної реєстрації 0115U000240.

**Мета та завдання досліджень.** Метою дисертаційної роботи є встановлення ролі змін метаболізму, оксидативного стресу, апоптозу і некрозу гепатоцитів та зміни структури мембран цих клітин та еритроцитів в розвитку порушень функціонального стану печінки за тривалої дії блоксополімерів на основі оксипропілену та етилену.

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Дослідити функціональний стан печінки щурів за визначенням активності індикаторних ферментів, процесів кон'югації (сульфатної та глюкуронової) за умов дії блоксополімерів. Вивчити морфологічні особливості печінки та дослідити рівень експресії MGMT.
2. Дослідити інтенсивність ліпідної пероксидації за вмістом дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, 8-ізопростану в крові та стан антиоксидантної системи за визначенням активності каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та вмісту церулоплазміну у крові експериментальних тварин.
3. Оцінити структурний стан цитоплазматичних мембран гепатоцитів шляхом визначення розміщення фосфатидилсерину в мембрані, а також дослідити стан мембран еритроцитів за допомогою флюоресцентних зондів за умов тривалої дії ксенобіотиків.
4. Оцінити життєздатність гепатоцитів та види їх клітинної загибелі за умов дії ксенобіотиків.
5. Дослідити вміст основних показників обміну білків, вуглеводів, ліпідів та їхню регуляцію.
6. Обґрунтувати можливість використання біофлавоноїдів (препарату «Квертин») для корекції метаболічних порушень в організмі щурів.

**Об'єкт дослідження** - стан метаболічної та детоксикаційної активності печінки за умов тривалого впливу блоксополімерів.

**Предмет дослідження** - біохімічні показники ліпідної пероксидації та стану антиоксидантної системи, стан мембран гепатоцитів та еритроцитів, експресія MGMT, активність апоптозу гепатоцитів, вміст загальних сульфатів та глюкуронідів у постмітохондріальній фракції гепатоцитів, активність трансаміназ, вміст

показників метаболізму білків, вуглеводів, ліпідів та гормонів, що здійснюють їхню регуляцію в крові щурів.

**Методи дослідження** – клініко-лабораторні (отримання сироватки крові, гомогенату печінки, гепатоцитів, еритроцитів); спектрофотометричні (визначення вмісту метаболітів та активності ферментів), імуноферментні, метод проточної цитофлюориметрії, метод флуоресцентних зондів, морфологічні (імуногістохімічні), статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** У роботі проведено комплексне дослідження функціонального стану печінки, зокрема метаболічна та знешкоджувальна активність за умов дії БП на основі оксипропілену та етилену.

Встановлено, що біологічна дія БП у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> супроводжується розвитком оксидативного стресу: підвищується в 2,17 рази вміст продуктів перекисного окислення ліпідів - ТБК-активних продуктів, на 61,5 % - вміст дієнових кон'югатів, в 2,35 рази – вміст 8-ізопростану в крові щурів на тлі зниження вмісту моніторингових показників стану антиоксидантної системи, а саме церулоплазміну на 47,24 % та активності каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази - на 42,69 %, 41,26 %, 32,37 % відповідно, порівняно з контролем. Встановлено порушення структурно-функціонального стану печінки за умов впливу БП на основі оксипропілену та етилену, а саме підвищення активності трансаміназ: аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази - в 4,66 та 4,38 рази відповідно, пригнічення процесів кон'югації КБ за умов зниження вмісту загальних сульфатів та глікуронідів.

Вперше за допомогою флуоресцентних зондів визначено зміну стану мембран еритроцитів, зокрема формування на поверхні мембран клітин додаткової оболонки з молекул поліетиленгліколю-400, молекули КБ можуть вбудовуватися в гідрофобні ділянки плазматичної мембрани, взаємодіяти з жирними кислотами фосфоліпідів або з інтегральними білками.

Вперше доведено, що у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> рівень експресії MGMT в ядрах гепатоцитів підвищується, особливо за умов впливу поліетиленгліколю-400.

Вперше визначено, що за умов дії БП у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> виникає асиметрія розподілу фосфоліпідів у цитоплазматичній мембрані гепатоцитів, а саме екстерналізація фосфатидилсерину.

Доведено, що тривала токсифікація БП сприяє зниженню життєздатності гепатоцитів на 18,2 %, підвищенню відсотку ранньо- та пізньоапоптичних клітин, а за умов впливу етиленгліколю виникає некроз гепатоцитів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Проведене експериментальне дослідження поглиблює сучасні уявлення про порушення метаболічної та знешкоджуючої функції печінки за умов тривалої дії БП на основі оксипропілену та етилену у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>.

У експерименті доведено використання лікарського препарату «Квертин» як біофлавоноїда для покращення структурно-функціонального стану печінки, що може в подальшому бути використано у лікуванні екопатологій, роботі НДІ з профілактичною та терапевтичною метою.

Одержані результати можуть бути використані у профпатологічній службі для працівників хімічних підприємств, безпосередньо контактуючих з БП.

Отримані результати досліджень захищені Патентом України на винахід «Спосіб прогнозування рівня токсичності поверхнево-активних речовин» (№ 118223). Результати дослідження впроваджено у навчально-педагогічний процес кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України, кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії ВДНЗУ „Українська медична стоматологічна академія” МОЗ України, кафедри біохімії Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (впровадження підтвержені відповідними актами).

**Біоетична експертиза.** Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» та згідно відповідних Законів України. Доцільність використання експериментальних тварин та їх кількість була узгоджена з комісією з біоетики НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Експертиза з питань біоетики проведена на засіданні комітету з біоетики НДІ біології (протокол № 6 від 21 червня 2018 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом проведено визначення наукової концепції роботи, мети, завдань, об'єктів дослідження. Автором проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз та систематизація наукової літератури з теми дисертації. Дисертантом особисто обрано комплекс сучасних методів дослідження, проведені експериментальні дослідження, одержані дані та їх статистична обробка. Підготовлено матеріали публікацій. Аналіз та інтерпретація одержаних результатів проведені спільно з науковим керівником д.мед.н., проф. Наконечною О. А. Наукові положення і результати, наведені в дисертаційній роботі, отримані автором особисто.

Дослідження стану мембран гепатоцитів, визначення асиметрії мембран, оцінка стадій апоптозу/некрозу та життєздатності гепатоцитів було виконано за підтримки проф. Бабійчук Л. О. (відділ кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України), стан клітинних мембран еритроцитів визначено методом флуоресцентних зондів, що проведено в лабораторії «Інституту сцинтиляційних матеріалів» НАН України; морфологічні дослідження проведені в патоморфологічному секторі Центральної науково-дослідної лабораторії ХНМУ за консультативної допомоги професора Губіної-Вакулик Г. І. У дисертації не використовували ідеї або концепції, які належать співавторам опублікованих наукових праць.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основні результати дисертації були представлені та обговорені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів: 9th ISABS Conference on Forensic, Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualised Medicine (Bol, 2015); CROSS 12 - Croatian Student Summit (Zagreb, 2016); XXIV Міжнародній науково-практичній конференції «КАЗАНТИП-ЕКО-2016. Инновационные пути решения актуальных проблем базовых отраслей, экологии, энерго- и ресурсосбережения» (Харків, 2016); Науково-практичній

конференції «Довкілля і здоров'я», присвяченій 30-річчю Чорнобильської катастрофи (Тернопіль, 2016); VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біологічні дослідження - 2017» (Житомир, 2017); III Конференції молодих вчених біохіміків і молекулярних біологів з міжнародною участю (Гродно, 2017); Республиканской научно-практической конференции и 27-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета «Актуальные проблемы медицины» (Гомель, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 25-річчю медичного інституту Сумського державного університету «Здоров'я людини: теорія і практика» (Суми, 2017); II Міжнародній заочній науково-практичній конференції «Проблеми, досягнення та перспективи розвитку медико-біологічних і спортивних наук» (Миколаїв, 2017); Науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії» (Харків, 2017 та 2018); Науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання лабораторної медицини» (Харків, 2018); ISIC 2018 (Харків, 2018).

**Публікації.** За результатами досліджень, наведених у дисертаційній роботі, опубліковано 26 наукових робіт, серед яких 12 статей (6 статей - у наукових фахових виданнях України, 3 статті у виданнях, які входять до міжнародних наукометричних баз (1 стаття – в Scopus), 3 статті, які додатково відображають наукові результати дисертації), 1 – патент на винахід України та 13 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 202 сторінки, з них основного тексту 139 сторінок. Робота ілюстрована 25 таблицями та 42 рисунками. Список використаних джерел містить 302 найменування.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету і завдання дослідження, наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, наведено відомості про впровадження результатів роботи, наукові публікації та особистий внесок автора.

В **огляді літератури** проводиться аналіз сучасного стану знань щодо використання та розповсюдження КБ; про сучасні уявлення їх токсикокінетики та біохімічні механізми розвитку метаболічних порушень в організмі теплокровних тварин за умов їхньої дії; наведено окремі розділи про біотрансформацію КБ у печінці, про стан оксидантно-антиоксидантної системи, про вплив КБ на апоптоз/некроз клітин та морфологічні дослідження, про способи корекції патологічних порушень в організмі людини та теплокровних тварин за умов дії хімічних чинників.

**Матеріали та методи дослідження.** У роботі використано зразки хімічно чистих речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками, синтезовані та надані НВО «Синтез ПАВ» (м. Шебекіно, Росія): Лапрол-3603-2-12 та

Лапрол-10002-2-80; поліетиленгліколь-400 (ПЕГ-400) («Барва-фарм», м. Івано-Франківськ); етиленгліколь (ЕГ) та пропіленгліколь (ППГ) (ООО «Біолар», м. Харків). Експериментальна частина досліджень виконана на 280 статевозрілих (6-8 місяців) білих щурах популяції WAG обох статей (140 самців та 140 самиць) масою 200–250 г, отриманих з науково-експериментальної клініки ХНМУ. Дослідження проведено в процесі підгострого токсикологічного експерименту тривалістю 45 діб. Роботу з тваринами проведено згідно загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), правил гуманного відношення до експериментальних тварин та національного законодавства в цій галузі. Тварин піддавали пероральній затравці за допомогою металевого зонду водними розчинами КБ (Л-3603-2-12, Л-10002-2-80, ПЕГ-400, ППГ, ЕГ) щоденно вранці натщесерце у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Усі маніпуляції проводили в стандартних умовах з 9<sup>00</sup> до 10<sup>00</sup>. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Розрахунок необхідної дози КБ для підгострого експерименту здійснювали, виходячи з відомих даних про параметри гострої токсичності: 1/10 та 1/100 від середньолетальної дози (ДЛ<sub>50</sub>) досліджуваних речовин відповідно складали для Л-3603-2-12 – 0,334 та 0,0334 г/кг маси тіла щурів; для Л-10002-2-80 – 3,84 та 0,384 г/кг, ПЕГ-400 – 2,89 та 0,289 г/кг, ППГ - 3,25 та 0,325 г/кг, ЕГ - 0,55 та 0,055 г/кг (Димент О. Н., 1976). По закінченню експерименту на 45 добу тварин знеживлювали методом цервікальної дислокації (Елизарова О. Н., 1971). У дослідженні були використані сироватка крові, суспензія еритроцитів, печінка щурів, постмітохондріальна фракція гепатоцитів.

Для одержання *сироватки* крові пробірки з кров'ю термостатували протягом 20 хвилин з наступним центрифугуванням (центрифуга UNIVERSAL 320 R) протягом 10 хвилин при 1500 об/хв. (Кондрахін І. П., 2004). *Еритроцити* відділяли від плазми центрифугуванням стабілізованою гепарином крові протягом 15 хв. при 3000 g. Суспензію еритроцитів тричі промивали шляхом центрифугування при 1500 g 3 хв в 10-кратному об'ємі фосфатно-сольового буферу (Медведев В. В., 1997). Гомогенат печінки отримували згідно способу розділення *гепатоцитів* (Петренко А. Ю., 1987), де визначали вміст глюкуронідів карбазоловим методом (Yuki H., 1963), сульфатів - турбідиметричним методом (Цевелева І. А., 1971). Активність *аспартатамінотрансферази* (АсАТ) (КФ 2.6.1.1), *аланінамінотрансферази* (АлАТ) (КФ 2.6.1.2) у сироватці крові визначали уніфікованими колориметричними методами з використанням наборів реактивів «Lachema» (Чехія). Вміст *8-ізопростану* в сироватці крові визначали імуноферментним методом за допомогою набору «8-isoprostane ELISA» фірми «USBiological» (США). Вміст *дієнових кон'югатів* (ДК) у сироватці крові визначали спектрофотометричним методом (Косухін А. Б., Ахметова Б. С., 1987). Вміст *ТБК-активних продуктів* (ТБК-АП) у сироватці крові оцінювали методом Федорової Т. Н. та співавт., (1983). Активність *супероксиддисмутази* (СОД) еритроцитів та *каталази* крові визначали спектрофотометричним методом (Гуревич В. С., 1990; Дубініна Е. Е., 1988). У сироватці крові визначали активність

глутатіонпероксидази (ГП) (КФ 1.11.1.9) за методом (Моін В. Н., 1986), вміст церулоплазміну (ЦП) - методом (Мошков К. А., 1986), загальну активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) (КФ 1.1.1.27) - кінетичним методом (Меншиков В. В., 1987), вміст глюкози - глюкозооксидазним методом (Barham D., 1972), лактату - ензиматичним колориметричним методом (Камишніков В. С., 2009), креатиніну - за реакцією з пікриновою кислотою (Александрова Л. М., 2011), сечовини - діацетилмонооксимним методом (Інгерлейб М. Б., 2011), загального білку - мікробіуретовим методом (Кочетов Г. А., 1980), альбуміну - з бромкрезоловим зеленим (Тиц Н. У., 1997), тригліцеридів - за допомогою ензиматичного колориметричного методу (Ткачук В. А., 2004), холестеролу - фотометричним методом з використанням тест-системи фірми «СплайнЛаб» (Україна). Вміст трийодтироніну, тироксину, естрадіолу, тестостерону в сироватці крові визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою наборів реагентів фірми ООО «ХЕМА» (РФ): «Т<sub>3</sub>-ИФА», «Т<sub>4</sub>-ИФА», «Эстрадиол-ИФА», «Тестостерон-ИФА». Вміст інсуліну визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою наборів реагентів фірми «EIA-2048 Insulin Elisa» (США). Дослідження проведене на біохімічному аналізаторі «Lab Line – 80» (Австрія).

Визначення стану ліпідного бішару клітинних мембран еритроцитів досліджували за допомогою флуоресценції зондів 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд **010**), 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол (зонд **060**) та 2-(2'-ОН-феніл)-фенантр(10,11)-1,3-оксазол (зонд **PH7**) у фізіологічних розчинах, що містять еритроцити щурів, токсифікованих ПЕГ (Posokhov E. A., 1999). Вимірювання спектрів флуоресценції проведене на спектрофлуориметрі «Hitachi 850» (Японія).

Ступінь порушення ліпідної асиметрії мембран, оцінку стадій апоптозу / некрозу та життєздатності гепатоцитів щурів проводили методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» фірми «Vector Dickinson» (США) з використанням набору реагентів «AnnexinV-FITC detection KIT» фірми «BD» відповідно до AnnexinV-FITC staining protocol і 7-AAD (BD Pharmingen). Для оцінки життєздатності клітин використовували вітальний барвник 7-AAD. Визначення стадій апоптозу/некрозу гепатоцитів проводили за допомогою одночасного використання AnnexinV-FITC і 7-AAD (Koorman G., 1994, Vermes I., 1995). Результати аналізували за допомогою програмного забезпечення фірми «BD» – «CELLQuest Pro».

Патоморфологічне дослідження печінки щурів проводили загальновизнаними методами (Ліллі Р., 1960; Пірс Е., 1962). За допомогою санного мікроскопа Мікромед МС-2М готували зрізи (5-7 мкм), які забарвлювали гематоксиліном-еозином та вивчали за допомогою світлової мікроскопії на мікроскопі Axiostar-plus (Zeiss, ФРГ).

Імуногістохімічні дослідження рівню експресії ферменту MGMT проведено з використанням мишачих моноклональних антитіл виробництва фірми «Thermo Fisher Scientific» (Великобританія).

Проводили корекцію порушень основних метаболічних процесів шляхом використання препарату «Квертин» (Борщагівський ХФЗ, Україна) протягом 2 тижнів, починаючи з 30 доби експерименту.

Статистичне опрацювання отриманих даних здійснювали за допомогою

стандартних методів із застосуванням програми «MS Excel XP» та комп'ютерного пакета для аналізу статистичної інформації Statistica 6.0. Первинне статистичне опрацювання кількісних даних починали з перевірки припущення про відповідність розподілу вибірок закону нормального розподілу методом Шапіро-Уїлка. Для порівняння двох нормальних розподілів застосовували t-критерій Стюдента. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали  $p < 0,05$ . При невідповідності нормальному розподілу достовірність оцінювали за непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні.

### Результати досліджень та їх обговорення

**Вплив блоксополімерів на основі оксипропілену та етилену на структурно-функціональний стан печінки щурів.** Встановлено, що за умов впливу всіх досліджених речовин активність трансаміназ в сироватці крові зростає залежно від дози, зокрема активність АЛАТ в середньому підвищується в 5,23 рази в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та в 4,08 рази в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, активність АсАТ в середньому підвищується в 5,03 рази в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та в 3,72 рази в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Всі досліджені КБ призводили до порушення цілісності цитоплазматичної мембрани гепатоцитів та вихід трансаміназ у кров щурів.

Визначено порушення детоксифікаційної функції печінки, як сульфатного, так і глюкуронідного шляху кон'югації. Вміст загальних сульфатів у постмітохондріальній фракції печінки знижувався за умов впливу всіх досліджених речовин у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> в середньому на 47,29 % за рахунок зв'язаних сульфатів, які в середньому знижувалися на 65,73 %. За умов дії 1/100 ДЛ<sub>50</sub> всі КБ призводили до збільшення загальних сульфатів на 14,86 % за рахунок збільшення вмісту зв'язаних сульфатів на 12,41 % у постмітохондріальній фракції печінки. Вміст вільних сульфатів не відрізнявся в порівнянні з контрольною групою тварин за умов впливу 1/10 ДЛ<sub>50</sub> всіх КБ, крім БП Л-3603-2-12, який спричиняв їх підвищення на 59,26 %. За умов дії 1/100 ДЛ<sub>50</sub> Л-10002-2-80 та ППГ вміст вільних сульфатів зростав на 50,70 % та 55,50 % відповідно. Вміст загальних глюкуронідів знижувався на 32,73 % та зростав на 30,52 % відповідно за умов дії 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> всіх досліджуваних КБ.

Визначено, що досліджені хімічні речовини призводять до гіпопротеїнемії, вміст загального білку за умов впливу всіх досліджених речовин в середньому знижується на 30,59 % за умов дії 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та на 22,51 % за умов дії 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, що може свідчити про порушення білоксинтезуючої функції печінки (рис. 1).

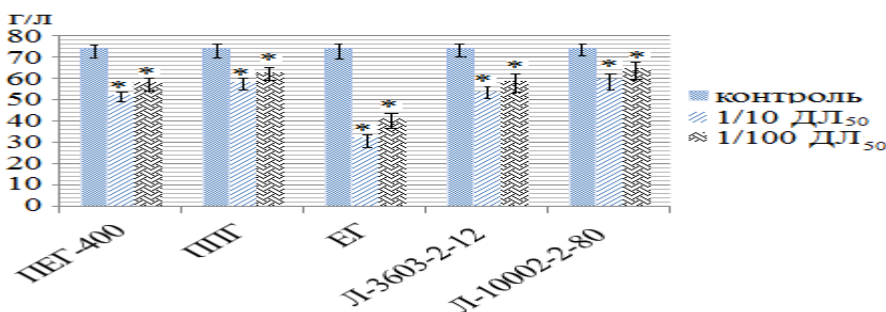


Рис. 1 Вміст загального білку (г/л) в крові щурів контрольної групи та за умов дії 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> блоксополімерів

За допомогою методу проточної цитофлуориметрії доведено, що ЕГ, ПЕГ-400 та ППГ у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> зумовлює зміну плазматичної мембрани гепатоцитів: транслокацію фосфатидилсерину з внутрішнього шару в зовнішній. Встановлено, що найбільш виражені структурні зміни фосфоліпідного бішару мембран гепатоцитів мали місце в результаті дії ПЕГ-400 у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> - фосфатидилсерин знаходиться у зовнішньому шарі у  $24,87 \pm 3,07$  % гепатоцитів (рис. 2). Майже аналогічний відсоток гепатоцитів з екстерналізацією фосфатидилсерину визначено у зовнішньому бішарі мембран у щурів, які були токсифіковані ЕГ та ППГ:  $15,21 \pm 2,15$  % та  $14,54 \pm 2,93$  % відповідно (рис. 2).

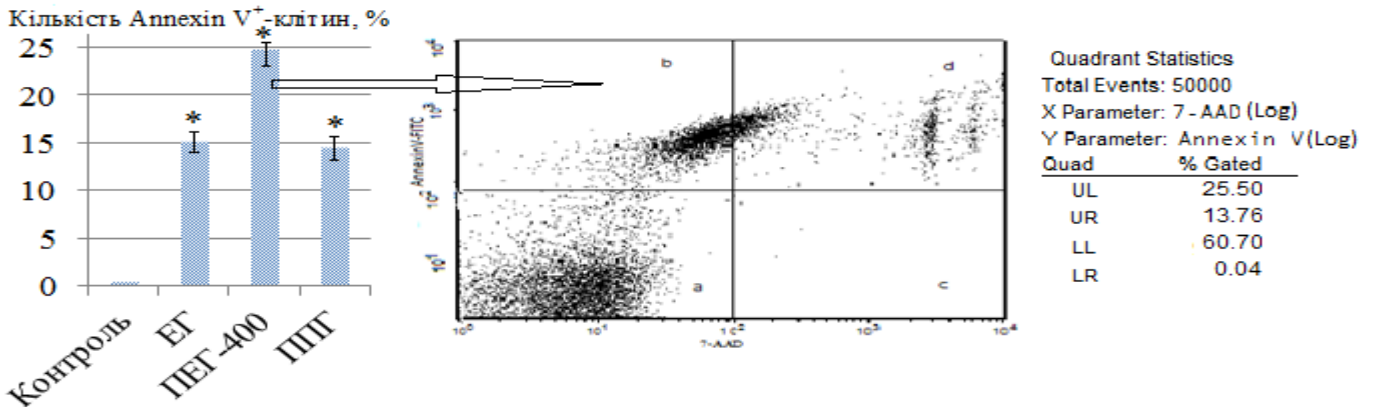


Рис. 2 Кількість Annexin V<sup>+</sup> гепатоцитів щурів після тривалого впливу ксенобіотиків у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>. Примітка: Дані представлені у вигляді  $M \pm SE$ . \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем.

Визначено, що види клітинної смерті у печінці щурів відрізняються в залежності від впливу досліджуваних КБ (рис. 3), зокрема дія ЕГ призводила до підвищення відсотку раноапоптотичних (15,21 %), пізноапоптотичних (8,13 %) та некротичних клітин (1,79 %). Найбільш вираженою була дія ПЕГ-400, що сприяло більш значному підвищенню відсотка рано- та пізноапоптотичних клітин – 26,39 % та 15,12 %, некротичних клітин – 0,08 %. За умов впливу ППГ відсоток рано- та пізноапоптотичних клітин складав 15,34 % та 5,98 %, а некротичних клітин – 0,17 %.

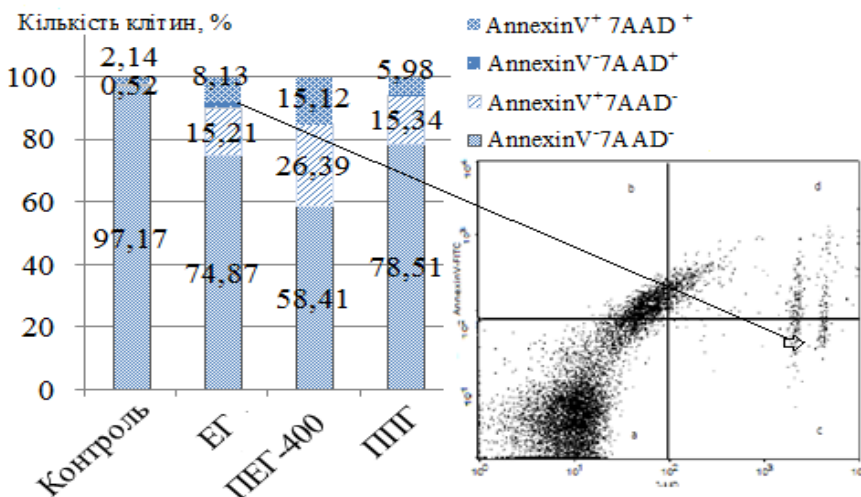


Рис. 3 Відсоток Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>, Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>, Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup> та Annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> гепатоцитів щурів після тривалого впливу ксенобіотиків: ЕГ, ПЕГ-400, ППГ в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>. Дані представлені у формі  $M \pm SE$

За допомогою патоморфологічних досліджень печінки щурів визначено, що картина змін майже однотипна, проте за умов впливу ЕГ спостерігається дуже виражене венозне повнокрів'я та наявність еритроцитів у синусоїдах, перипортальний макрофагально-лімфоцитарний інфільтрат, гіперемія судин у триаді (рис. 4 А). ПЕГ-400 викликає гіперемію центральної вени, різке розширення синусоїд, спостерігається загибель гепатоцитів в середній частині трабекул, ендотелій в синусоїдах місцями відсутній (рис. 4 Б). Вплив ППГ у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> зумовлює розширення синусоїд, ендотелій місцями відсутній, наявні двоядерні та неправильної форми гепатоцити, деякі гепатоцити мають дуже крупні ядра, що вказує на патологічний мітоз (рис. 4 В).

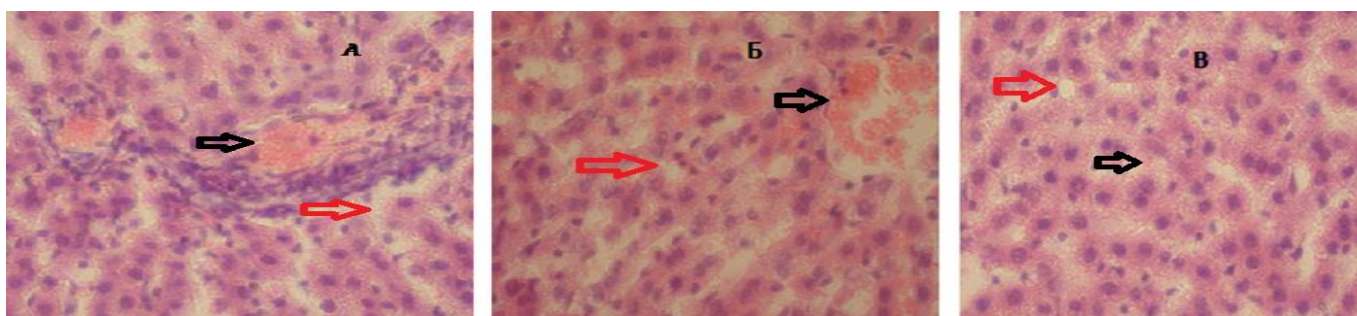


Рис. 4 Печінка щура за умов 45 добового впливу ЕГ (А), ПЕГ (Б), ППГ (В) у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>. ➡ Перипортальний макрофагально-лімфоцитарний інфільтрат. ➡ Гіперемія судин у триаді. Забарвлення гематоксиліном та еозинном. Зб.: x 400

Імуногістохімічно досліджено, що найбільший рівень експресії MGMT спостерігався за умов впливу ПЕГ-400 в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та складав  $47,58 \pm 2,39$  %, що вказує на активацію репараційного потенціалу клітин у порівнянні з контролем, в якій відсоток MGMT-мічених гепатоцитів складав  $14,28 \pm 2,39$  %, за умов дії ЕГ та ППГ -  $40,91 \pm 2,41$  % та  $42,74 \pm 1,98$  % відповідно (рис. 5).

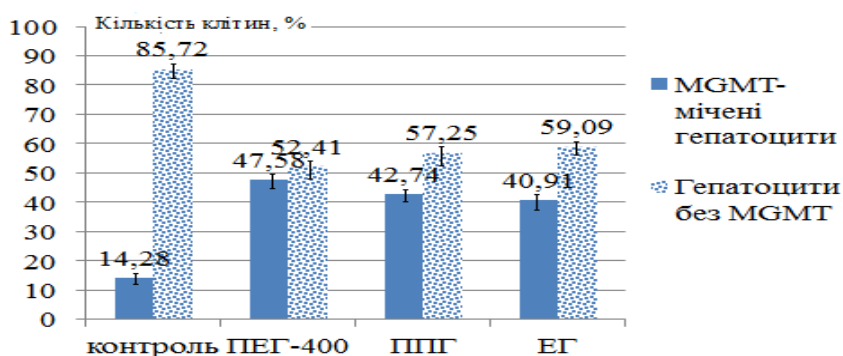


Рис. 5 Відсоток MGMT-мічених та MGMT-негативних гепатоцитів щурів ( $M \pm SE$ ) після тривалого впливу ксенобіотиків у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>

**Показники оксидантно-антиоксидантної системи та структурно-функціональний стан клітинних мембран теплокровних тварин за умов дії ксенобіотиків.** За умов впливу всіх БП в залежності від дози спостерігається підвищення вмісту продуктів ПОЛ в сироватці крові, зокрема вміст 8-ізопростану в середньому підвищується в 2,59 рази в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та в 2,10 рази в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, вміст ТБК-АП в середньому підвищується в 2,65 рази в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та

в 1,69 рази в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, вміст ДК в середньому підвищується на 85,82 % в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та на 37,17 % в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>.

Під впливом досліджуваної групи БП спостерігається пригнічення АОС у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та її активація в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>: зокрема активність каталази, СОД, ГП пригнічувалась і знижувався вміст ЦП у середньому на 42,69 %, 41,26 %, 32,37 % та 47,24 % відповідно за умов впливу КБ у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>, проте спостерігалась активація даних показників у середньому на 33,79 %, 80,17 %, 56,23 % та 57,14 % відповідно за умов впливу КБ у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>.

Доведено, що ПЕГ-400 у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> зумовлює зміну плазматичної мембрани еритроцитів. Зареєстрована динаміка інтенсивності флуоресценції зондів свідчить про формування на поверхні мембран еритроцитів крові щурів додаткової оболонки з молекул ПЕГ-400, що дозволяє йому не тільки адсорбуватись на поверхні мембрани, але і занурюватись у ліпідний бішар (рис. 6).

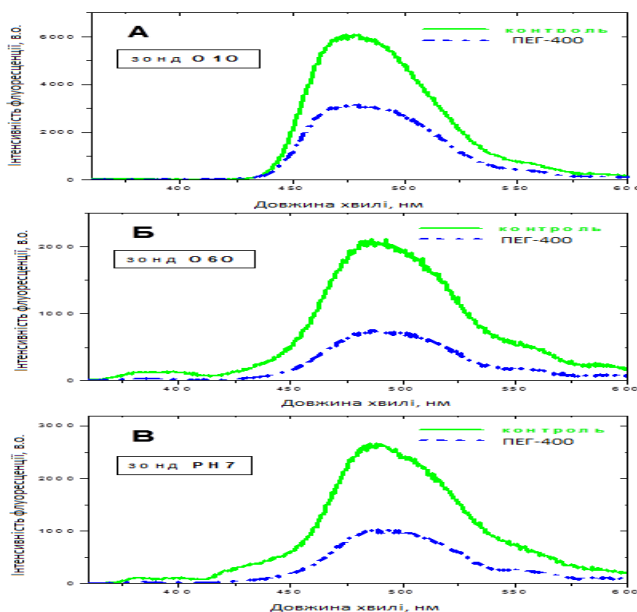


Рис. 6 Спектри флуоресценції зондів 010 (А), 060 (Б) и рН7 (В) у розчинах з еритроцитами щурів при впливі ПЕГ-400 у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> порівняльно до спектрів розчинів еритроцитів контрольної групи щурів

**Дослідження біохімічних показників метаболічних процесів у щурів за умов впливу ксенобіотиків.** БП у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> суттєво змінюють основні показники білкового обміну, викликаючи гіпопротеїнемію за рахунок гіпоальбумінемії. Вміст загального білка за умов досліджуваних речовин в середньому знижувався на 30,59 % та 22,51 % за рахунок зниження вмісту альбуміну в крові в середньому на 31,10 % та 24,17 % відповідно дозам 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, що свідчить про порушення білоксинтезуючої функції печінки.

Визначено значну уремію за умови впливу БП Л-3603-2-12 та Л-10002-2-80, зокрема вміст сечовини в крові збільшується в 3,01 та 2,25 рази відповідно дозам 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, а за умов впливу ПЕГ-400, ППГ та ЕГ виявлено зниження вмісту сечовини в середньому на 29,20 % і 17,53 % відповідно дозам 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Встановлена гіперкреатиніємія, зокрема вміст креатиніну в крові в середньому збільшувався на 106,16 % та 77,02 % відповідно 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, що може свідчити про порушення функціонального стану нирок.

Під впливом усіх КБ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> в організмі щурів вміст естрадіолу у самиць в середньому знижується на 54,67 % та 42,14 %, а тестостерону у самців – на 45,57 % і 40,32 % відповідно, що свідчить про токсичну дію на репродуктивну функцію та зниження анаболічної дії на організм статевих гормонів.

Досліджувані КБ викликають зниження в крові щурів вмісту глюкози, лактату, пірувату та співвідношення лактату до пірувату на фоні підвищення активності ЛДГ у порівнянні з досліджуваними показниками у щурів контрольної групи, що вказує на зниження обмінних процесів та є проявом патологічних змін в печінці.

Доведено, що за умов впливу досліджуваних хімічних речовин в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> в організмі щурів відмічено гіпоінсулінемію, зокрема вміст інсуліну в середньому знижувався – на 53,32 % і 39,18 %, вміст гормонів щитоподібної залози зазнавав збільшення: вміст Т<sub>3</sub> в середньому збільшувався на 58,95 % і 42,14 %, а вміст Т<sub>4</sub> - на 68,43 % і 50,17 % у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>.

Оцінка моніторингових показників ліпідного обміну виявила гіперхолестеринемію та гіпертригліцеролемію: вміст холестеролу в сироватці крові в середньому підвищувався за умов впливу досліджуваної групи КБ в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> в 1,92 і 1,78 рази, а вміст тригліцеридів – в 5,12 і 3,75 рази відповідно.

**Ефективність корекції біофлавоноїдом (препаратом «Квертин») структурно-функціональних порушень в організмі теплокровних за умов впливу блоксополімерів.** Корекція біофлавоноїдом покращує функціональний стан печінки за умов впливу досліджуваних КБ. Визначене зменшення активності АсАТ у середньому на 12,62 % та 22,77 %, а АЛАТ - у середньому на 8,67 % та 31,35 % відповідно впливу 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. «Квертин» відновлює детоксикаційну функцію печінки, про що свідчить підвищення вмісту загальних сульфатів в організмі щурів в середньому на 23,40 % у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та зниження вмісту загальних сульфатів в середньому на 23,31 % у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Глюкуронідний шлях кон'югації також зазнавав покращення. Зокрема, вміст загальних глюкуронідів підвищувався після корекції в середньому на 12,16 % у дозі впливу КБ 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та знижувався на 8,44 % - у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>.

Досліджували ефективність корекції біофлавоноїдом порушень білкового обміну: найбільші зміни вмісту загального білку - збільшення на 27,56 % та 21,86 %, а також альбуміну – збільшення на 47,79 % та 31,62 % спостерігались після корекції «Квертином» за умов впливу ЕГ у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Вміст креатиніну та сечовини зазнали найбільших змін після корекції «Квертином» за умов впливу ПЕГ-400 у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> - збільшення сечовини на 26,18 % та 21,29 % на тлі зниження креатиніну – на 16,39 % та 18,62 % відповідно. Визначено, що корекція біофлавоноїдом покращувала показники вуглеводного обміну: в середньому підвищувався вміст глюкози в крові на 22,23 % і 27,34 %, вміст лактату - на 36,29 % і 24,11 %, вміст пірувату - на 43,38 % і 39,81 % відповідно. Після корекції біофлавоноїдом за умов впливу досліджуваних речовин у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> змінюються показники ліпідного обміну - в середньому вміст холестеролу знижувався на 14,13 % і 13,80 %, вміст тригліцеридів знижувався на 24,15 % і 14,31 % відповідно доз впливу.

Після корекції «Квертином» знижується інтенсивність процесів ПОЛ за умов впливу досліджуваних КБ: найбільше покращувався вміст 8-ізопростану на 25,17 % та 30,92 % відповідно. Активність каталази після корекції підвищувалася на 19,41 % і 15,60 %, відповідно у токсифікованих ЕГ щурів у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Активність СОД крові підвищувалась на 23,21 % - в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та знижувалась на 18,63 % у щурів, які були токсифіковані ЕГ у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> після корекції «Квертином».

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та вирішено актуальну задачу з дослідження структурно-функціонального стану печінки щурів за визначенням активності процесів біотрансформації ксенобіотиків, активності оксидантно-антиоксидантної системи, стану мембран гепатоцитів та еритроцитів, апоптозу/некрозу гепатоцитів, активності репарації ДНК, визначення морфологічних особливостей печінки за умов дії блоксополімерів та обґрунтовано можливість використання біофлавоноїду (препарату «Квертин») для корегування метаболічних порушень в організмі щурів.

1. Встановлено, що блоксополімери в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> викликають порушення структурно-функціонального стану печінки, що підтверджується підвищенням активності трансаміназ (АлАТ в середньому - в 5,23 та 4,08 рази, АсАТ - в 5,03 та 3,72 рази відповідно доз впливу), порушенням сульфатної та глюкуронової кон'югації (вміст загальних сульфатів знижувався в середньому на 47,29 % та загальних глюкуронідів - на 32,73 % у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>, навпаки вміст загальних сульфатів підвищувався на 14,86 % та загальних глюкуронідів - на 30,52 % у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> у порівнянні з контролем). При імуногістохімічному дослідженні в ядрах гепатоцитів щурів було визначено збільшення відсотку МGMT-мічених гепатоцитів у порівнянні з контрольною групою в середньому.

2. За умов впливу блоксополімерів на основі оксипропілену та етилену в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> в організмі експериментальних тварин розвивається оксидативний стрес: у сироватці крові зростає вміст 8-ізопростану (в 2,59 рази за умов 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та в 2,10 рази за умов дії 1/100 ДЛ<sub>50</sub>,  $p < 0,05$ ), вміст ТБК-АП в середньому підвищується в 2,65 рази в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та в 1,69 рази в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, вміст ДК в середньому підвищується на 85,82 % в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> та на 37,17 % в дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. Спостерігається зниження активності антиоксидантної системи: активність каталази, СОД еритроцитів, глутатіонпероксидази крові - на 42,69 %, 41,26 %, 32,37 % відповідно та вміст церулоплазміну в крові в середньому знижується на 47,24 % за умов 1/10 ДЛ<sub>50</sub> порівняно з контролем.

3. В організмі щурів, токсифікованих блоксополімерами в дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>, спостерігається порушення стану цитоплазматичних мембран гепатоцитів: екстерналізація фосфатидилсерину у фосфоліпідному бішарі та зміна інтенсивності флуоресценції зондів на мембранах еритроцитів, відсутність змін в області гліцеринових та карбонільних груп фосфоліпідів, формування на поверхні мембран еритроцитів додаткової оболонки.

4. За умов дії досліджуваної групи ксенобіотиків протягом 45 діб у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> знижується життєздатність гепатоцитів на 18,21 %, активується апоптоз гепатоцитів, що підтверджується підвищенням відсотку ранньоапоптотичних гепатоцитів (в середньому на 18,98 %) та пізньоапоптотичних / некротичних клітин (в середньому на 9,75 %).

5. Встановлено, що блоксополімери сприяють розвитку гіпопротеїнемії за рахунок гіпоальбумінемії, уремії (вміст сечовини зростає в середньому в 2,63 рази); креатинінемії (вміст креатиніну підвищувався на 91,59 %). Спостерігається зниження репродуктивної функції білих щурів: гіпотестостеронемія та гіпоестрогенемія. Ксенобіотики в дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> викликають порушення вуглеводного обміну: зниження вмісту лактату, пірувату на тлі гіпоглікемії (вміст глюкози знижувався на 53,51 %,  $p < 0,05$ ). Визначається гіпоінсулінемія, що може свідчити про порушення функціонування підшлункової залози. Оцінка моніторингових показників ліпідного обміну під впливом досліджуваних речовин у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub> виявила гіперхолестеролемію та підвищення вмісту тригліцеридів.

6. Підтверджено ефективність використання біофлавоноїду лікарського препарату «Квертин» для корекції порушень структурно-функціонального стану печінки щурів на фоні токсифікації блоксополімерами у дозі 1/10 та 1/100 ДЛ<sub>50</sub>. На 45 добу знижується активність АсАТ, АлаТ в крові в середньому на 17 % та 19 %. «Квертин» сприяє активації процесів біотрансформації ксенобіотиків: підвищує вміст загальних сульфатів в середньому на 23,40% у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>, зменшує інтенсивність процесів ПОЛ та активує антиоксидантну систему, покращує моніторингові показники обміну білків, вуглеводів, ліпідів.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Наукові праці у наукових фахових виданнях України:*

1. Жуков В. І., Щербань М. Г., Наконечна О. А., Зайцева О. В., Безродна А. І., Ващук Н. А., Резуненко Ю. К., Оветчин П. В., Телегін В. О., Стеценко С. О. Вплив «Лапролів» марок Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 на імунобіологічну реактивність в умовах підгострої субтоксичної дії на теплокровних тварин // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2016. №3. С. 31-38. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, постановка імунологічних тестів (реакція специфічного лізису лейкоцитів, реакція специфічного пошкодження базофілів, реакція специфічної агломерації лейкоцитів), обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”*.
2. Жуков В. І., Щербань М. Г., Безродна А. І., Ващук Н. А., Стеценко С. О. Стан метаболічної і детоксикаційної активності печінки у щурів під впливом тривалої субтоксичної дії олігомерів Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2015. № 4. С. 45-50. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту загальних, вільних, зв'язаних сульфатів, відновленого та окисненого*

глутатіону, малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів, креатиніну, сечовини, глюкози, холестерину, активності глутатіонпероксидази, аспаратамінотрансферази, аланін амінотрансферази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.

3. **Безродна А. І.**, Жуков В. І., Щербань М. Г., Ващук Н. А. Вплив олігоєфірів марок Л-3603-2-12 і Л-10002-2-80 на мікросомальне окислення гепатоцитів і тканинне дихання мітохондрій в організмі експериментальних тварин в умовах тривалої субтоксичної дії // Аграрний вісник Причорномор'я. Серія: біологічні науки. 2014. Вип. 73. С. 3-13. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання активності о-деметилази, НАДФН-цитохром – С-редуктази, НАДН- цитохром – С-редуктази, швидкість ендogenousого дихання мікросом, швидкість окислення НАДФН, швидкість окислення НАДФН, швидкість перекисного окислення ліпідів, вміст цитохромів P<sub>450</sub> і v<sub>5</sub>, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

4. Nakonechna O. A., **Bezrodna A. I.**, Kornienko E. M., Tkacheva T. N., Efimova S. L., Posokhov E. A., Maksimova I. G. The Fluorescent Probe Method in Investigation of the State of Erythrocyte Membranes in White Rats at Exposure to Chemical Environmental Factors // Український журнал медицини, біології та спорту. 2018. Т. 3, № 6 (15). P. 299-303. (Google Scholar). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, виділення еритроцитів, вимірювання інтенсивності флуоресценції мембран еритроцитів, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

5. **Безродна А. І.** Корекція «Квертином» стану оксидантно-антиоксидантної системи у щурів за умов впливу ксенобіотиків // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2018. Вип. 31. С. 7-15. (Google Scholar).

6. Наконечна О. А., **Безродна А. І.**, Кривонос К. А. Вплив блоксополімерів на регуляцію та основні показники білкового та вуглеводного обмінів у щурів в умовах підгострого токсикологічного експерименту // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018. № 25. С. 55-59. (Google Scholar). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту глюкози, лактату, сечовини, креатиніну, загального білку, гормонів інсуліну, тестостерону, естрадіолу, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

**Наукові праці у наукових фахових виданнях України, що входять до наукометричних баз**

7. Nakonechna O. A., Babijchuk L. A., **Bezrodna A. I.** Disturbance of the transmembrane phosphatidylserine asymmetry in hepatocytes as an apoptosis marker under the action of xenobiotics on rats // Ukr. Biochem. J. 2018. Vol. 90, N 6. P. 82-88. (SCOPUS, CrossRef, DOAJ, Google Scholar). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання асиметрії фосфатидилсерину*

в ліпідному бішарі мембран гепатоцитів, визначення стадій апоптозу/некрозу гепатоцитів щурів, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.

8. **Безродна А. І.**, Вишницька І. А., Мельник О. Г., Оветчин П. В., Резуненко Ю. К. Вплив олігофірів в субтоксичній дозі на гормональний обмін при тривалій токсифікації тварин в підгострому експерименті // Вісник проблем біології і медицини. 2016. Вип. 1, Т. 1 (126). С. 120-124. (Index Copernicus, Google Scholar; Наукова електронна бібліотека "Cyberleninka"). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту гормонів ТТГ, Т<sub>3</sub>, Т<sub>4</sub>, інсуліну, глюкагону, тестостерону, естрадіолу, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

9. Щербань Н. Г., Жуков В. І., **Безродна А. І.**, Зайцева О. В., Ващук Н. А., Оветчин П. В., Гопкалов В. Г. Вплив субтоксичних доз олігофірів на вуглеводний і енергетичний обмін печінки білих щурів в експерименті // Світ медицини та біології. 2016. № 1 (55). С. 176-180. (Index Copernicus, Google Scholar; Наукова електронна бібліотека "Cyberleninka"). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання активності гексокінази, фосфофруктокінази, альдолази, глюкозо – 6 – фосфатдегідрогенази, лактатдегідрогенази, креатинфосфокінази, глюкозо-6-фосфатази, лужної фосфатази, вмісту глюкози, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

### **Патент України на винахід**

10. Спосіб прогнозування рівня токсичності поверхнево-активних речовин: пат. 118223 Україна ; заявл. 28.11.2016 ; опубл. 10.12.2018, Бюл. № 23. 6 с.

### **Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:**

11. Nakonechna O. A., Babijchuk L. A., **Bezrodna A. I.** Violation of the transmembrane asymmetry of lipides of hepatocytes as the index of apoptosis in the action of xenobiotics on the organism of rats // Актуальні питання лабораторної медицини : матеріали науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів, 20-21 листопада 2018 р. Харків, 2018. С. 61-62. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання асиметрії фосфатидилсерину в ліпідному бішарі мембран гепатоцитів, визначення стадій апоптозу/некрозу гепатоцитів щурів, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

12. **Безродна А. І.**, Максимова І. Г., Логвінова А. О., Толоконнікова А. А., Гарбузова Д. В. Вплив поліетиленгліколю на вміст холестеролу та статевих гормонів у крові щурів в підгострому токсикологічному експерименті // Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 12-13 квітня 2018 р. Харків, 2018. С. 22-23.

*“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту холестеролу, гормонів тестостерону, естрадіолу, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

13. **Bezrodnaya A. I.**, Mbonu Favour Chinomso, Aladeto Yinbo Anuoluwapo Elizabeth Investigation of enzyme activity under the conditions of influence of surface-active substances in rats in the subacute toxicological experiment // The International Scientific Interdisciplinary Conference (ISIC) : abstracts book, 23-25 may 2018, Kharkiv, 2018. P. 18-19. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання активності лактатдегідрогенази, альфа-амілази, лужної фосфатази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

14. Наконечная О. А., **Безродная А. И.** Основные показатели углеводного обмена в результате действия поверхностно-активных веществ на основе окиси этилена и пропилена // Актуальные проблемы медицины : сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции и 27-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета, 2–3 ноября 2017 г. Гомель, 2017. С. 553–556. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту глюкози, лактату, гормонів ТТГ,  $T_3, T_4$ , інсуліну, активності лактатдегідрогенази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

15. Наконечна О. А., Абрамова Л. П., **Безродна А. І.**, Новікова О. О. Вміст в крові тиреотропного та тиреоїдних гормонів за умов токсифікації тварин поверхнево-активними речовинами в підгострому експерименті // Біологічні дослідження - 2017 : збірник наукових праць VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, 14-16 березня 2017 р. Житомир, 2017. С. 270-271. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту гормонів ТТГ,  $T_3, T_4$ , обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

16. **Безродная А. И.**, Наконечная О. А. Влияние ксенобиотиков на белковый обмен белых крыс в подостром эксперименте // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : сборник материалов III Конференции молодых ученых биохимиков и молекулярных биологов с международным участием, 11-12 мая 2017 г. Гродно, 2017. С. 11-12. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання рН, вмісту загального білку, сечової кислоти, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

17. Наконечна О. А., **Безродна А. І.**, Абрамова Л. П. Основні показники вуглеводного обміну та його регуляції за умов впливу поліетиленгліколю // Здоров'я людини: теорія і практика : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 25-річчю медичного інституту Сумського державного університету, 17–19 жовтня 2017 р. Суми, 2017. С. 73–75. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту глюкози, лактату, гормонів ТТГ,  $T_3, T_4$ , інсуліну, активності*

*лактатдегідрогенази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

18. **Безродна А. І.**, Коцур В. Є., Стабровський С. С., Кучеренко І. О., Новікова Д. П. Вплив поверхнево-активних речовин на білковий обмін у білих щурів за умов підгострого токсикологічного експерименту // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической биохимии : материалы VI Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, 22 мая 2017 г. Харьков, 2017. С. 21–23. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту інсуліну, активності альфа-амілази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

19. Наконечная О. А., **Безродная А. И.** Основные показатели углеводного и белкового обмена в результате действия полиэтиленгликоля // Проблемы, достижения та перспективи розвитку медико-біологічних і спортивних наук : матеріали II Міжнародної заочної науково-практичної конференції, 30 жовтня 2017 р. Миколаїв, 2017. С. 60–62. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту глюкози, лактату, альбуміну, сечової кислоти, білку, гормонів ТТГ, Т<sub>3</sub>, Т<sub>4</sub>, інсуліну, активності лактатдегідрогенази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

20. Жуков В. І., Щербань М. Г., Зайцева О. В., **Безродна А. І.**, Ващук Н. А., Резуненко Ю. К., Оветчин П. В., Телегін В. О. Стан антирадикального, антиперекисного захисту під впливом тривалої субтоксичної дії олігоєфіра Л-3603-2-12 // Казантип-ЭКО-2016. Инновационные пути решения актуальных проблем базовых отраслей, экологии, энерго- и ресурсосбережения : сборник трудов XXIV Международной научно-практической конференции, 6-10 июня 2016 г. Харьков, 2016. С. 122-126. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту відновленого глутатіону, малонового дигідрогену, дієнових кон'югатів, церулоплазмину, гаптоглобіну, активності глутатіонпероксидази, СОД, каталази, глутатіонпероксидази, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

21. **Bezrodnaya A. I.**, Jukov V. I., Shcherban N. G. The influence of oligoesters on hormonal metabolism // Croatian student summit 12 : abstracts book, March 2016, Croatia, 2016. P. 12. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, вимірювання вмісту гормонів тестостерону, естрадіолу, пролактину, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

22. **Безродна А. І.** Вплив олігоєфірів на вуглеводний і енергетичний обмін // «Довкілля і здоров'я» присвяченої 30-річчю Чорнобильської катастрофи : матеріали науково-практичної конференції, 22-23 квітня 2016 р. Тернопіль, 2016. С. 31-32.

23. **Bezrodnaya A. I.**, Krivonos K.A. Genetic aspects of environmental pathology // 9th ISABS Conference on Forensic, Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualised Medicine : abstracts book, 22-26 June 2015, Croatia, 2015 P. 199. *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного*

*експерименту, дослідження мітотичної активності клітин червоного кісткового мозку, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні тез”.*

**Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

24. Наконечная О. А., Безродная А. И. Влияние олигоэфиров на репродуктивную функцию крыс в условиях эксперимента // БатысҚазақстан медицина журналы. 2016. №3 (51). С. 128-132. (Google Scholar; РИНЦ). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення токсикологічного експерименту, дослідження ембріотоксичного та гонадотоксичного впливу, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

25. Кучеренко В. П., Жуков В. І., Щербань М. Г., Безродна А. І., Стеценко С. О. Обгрунтування гранично допустимих концентрацій простих олігоєфірів технічної назви «Лапроли» марок 2102 і 3603-2-12 у воді водойм господарсько-питного і культурно-побутового призначення // Вісник проблем біології і медицини. 2015. Вип. 4, Т.1(124). С. 48-53. (Index Copernicus, Google Scholar; Наукова електронна бібліотека "Cyberleninka"). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, проведення органолептичних досліджень (запах, присмак, забарвлення, прозорість, піноутворення) та досліджень санітарного режиму, проведення токсикологічного експерименту, дослідження ембріотоксичного та гонадотоксичного впливу, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

26. Кучеренко В. П., Жуков В. І., Щербань М. Г., Безродна А. І. Якісна та кількісна оцінка ступеня гідролітичної деструкції та трансформації простих олігоєфірів призначення // Світ медицини та біології. 2015. №4 (53). С. 39-42. (Index Copernicus, Google Scholar; Наукова електронна бібліотека "Cyberleninka"). *“Особистий внесок здобувача: формулювання завдання, формування та утримання модельних водойм, дослідження санітарного режиму модельних водойм, обговоренні та інтерпретації результатів, участь у написанні статті”.*

## АНОТАЦІЯ

**Безродна А. І. Вплив блоксополімерів на основі оксипропілену та етилену на показники функціонального стану печінки щурів та корекція його порушень. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, Харків, 2019.

За результатами роботи визначена роль і значення оксидативного стресу, апоптозу та некрозу гепатоцитів та зміни структури їх клітинних мембран в розвитку порушень функціонального стану печінки за умов тривалої дії блоксополімерів на основі оксипропілену та етилену.

Ця група ксенобіотиків, яка широко використовується, практично, у всіх галузях господарства країни, сьогодні все більш активно проникає у всі сфери перебування людини з косметикою, ліками, миючими засобами тощо.

Встановлено, що за умов дії блоксополімерів у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> виникає асиметрія розподілу фосфоліпідів у цитоплазматичній мембрані гепатоцитів, а саме екстерналізації фосфатидилсерину, а тривала токсифікація блоксополімерами спричиняє зниження життєздатності гепатоцитів.

За допомогою флюоресцентних зондів визначено зміну стану мембран еритроцитів, зокрема формування на поверхні мембран клітин додаткової оболонки з молекул ПЕГ, молекули ксенобіотику можуть вбудовуватися в гідрофобні ділянки плазматичної мембрани, взаємодіяти з жирними кислотами фосфоліпідів або з інтегральними білками. Встановлено, що у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub> рівень експресії MGMT в ядрах гепатоцитів збільшується, особливо за умов впливу ПЕГ- 400.

На основі кліко-експериментальних досліджень доведено, що лікарський препарат «Квертин» може бути рекомендовано для використання у клінічній практиці лікарів-профпатологів для корегування патологічних змін у структурно-функціональному стані печінки внаслідок шкідливого впливу ксенобіотиків.

**Ключові слова:** блоксополімери, гепатотоксичність, оксидативний стрес, MGMT, мембрани, апоптоз, некроз.

## АННОТАЦІЯ

**Безродная А. И. Влияние блоксополимеров на основе оксипропилена и этилена на показатели функционального состояния печени крыс и коррекция его нарушений. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. - Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина МОН Украины, Харьков, 2019.

По результатам работы определена роль и значение оксидативного стресса, апоптоза и некроза гепатоцитов и изменения структуры их клеточных мембран в развитии нарушений функционального состояния печени в условиях длительного действия блоксополимеров на основе оксипропилена и этилена.

Эта группа ксенобиотиков, широко используясь практически во всех отраслях хозяйства страны, сегодня все более активно проникает во все сферы обитания человека с косметикой, лекарствами, моющими средствами и т.д.

Установлено, что в условиях действия блоксополимеров в дозе 1/10 ДЛ<sub>50</sub> возникает асимметрия распределения фосфолипидов в цитоплазматической мембране гепатоцитов, а именно экстернализация фосфатидилсерина, а длительная токсификация блоксополимерами приводит к снижению жизнеспособности гепатоцитов.

С помощью флюоресцентных зондов определено изменение состояния мембран эритроцитов, в частности формирование на поверхности мембран клеток дополнительной оболочки из молекул ПЭГ, молекулы ксенобиотика могут встраиваться в гидрофобные участки плазматической мембраны, взаимодействовать

с жирными кислотами фосфолипидов или с интегральными белками. Установлено, что в дозе 1/10 ДЛ<sub>50</sub> уровень экспрессии MGMT в ядрах гепатоцитов увеличивается, особенно в условиях воздействия ПЕГ- 400.

На основе клинико-экспериментальных исследований доказано, что лекарственный препарат «Квертин» может быть рекомендован для использования в клинической практике врачей-профпатологов для корректировки патологических изменений в структурно-функциональном состоянии печени вследствие вредного воздействия ксенобиотиков.

**Ключевые слова:** блоксополимеры, гепатотоксичность, оксидативный стресс, MGMT, мембраны, апоптоз, некроз.

## ABSTRACT

**Bezrodnaya A. I. Influence of block-copolymers on the basis of oxypropylene and ethylene on indicators of functional state of the liver of rats and correction of its disorders. – Qualification scientific paper, manuscript.**

Dissertation for a Candidate's of Biological Sciences degree by speciality: 03.00.04 – biochemistry. – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

Today in Ukraine and the world block-copolymers are widely used in almost all industries, and the ever-growing range of cosmetics and detergents, laundry detergents and modern building materials for apartments for the population, pharmaceuticals and much more created the conditions for aggressive penetration into all spheres of human stay and pollution tap water and also contributes to the emergence of a new ecological pathology in the population of chemical genesis, for which scientists still not defines a complex of pathological symptoms for the human body, as well as features of the development of the clinical picture, diagnosis, treatment, correction and prevention.

Since the liver is the main organ that neutralizes xenobiotics, the need to study the effect of block-copolymers on indicators of the functional state of the liver is due to insufficient information on the mechanisms of the occurrence of metabolic disorders in it and in the body as a whole under conditions of their long action. In the pathogenesis of liver diseases, xenobiotics play a significant role, including acute and chronic hepatitis, cirrhosis occupy one of the most common places in human pathology.

In the dissertation the actual scientific problem of determining the role of metabolic, oxidative stress, apoptosis and necrosis of hepatocytes and changes in the structure of membranes of these cells and erythrocytes in the development of violations of the functional state of the liver during the prolonged action of block-copolymers based on oxypropylene and ethylene has been solved.

Theoretical generalization and solving the actual task of studying the structural and functional state of the liver of rats by determination of the activity of xenobiotic biotransformation processes, the activity of the oxidant antioxidant system, the activity of DNA repair, determination of morphological features of the liver under the conditions of action of block-copolymers, and the possibility of using the drug "Kvertin" for correction is substantiated for metabolic disorders in the body of rats.

It was established that block-copolymers at doses of 1/10 and 1/100 of DL<sub>50</sub> cause a violation of the structural and functional state of the liver, which is confirmed by an increase in the activity of transaminases, violation of sulfate and glucuronic conjugation. In an immunohistochemical study in hepatocyte nuclei of rats, an increase in the percentage of MGMT-labeled hepatocytes was determined in comparison with the control group.

Oxidative stress develops under the influence of block-copolymers on the basis of hydroxypropylene and ethylene in doses of 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> in the body of experimental animals: the content of 8-isoprostane, TBK-AP, DC increases in blood serum. There is a decrease in the activity of the antioxidant system: the activity of catalase, SOD of erythrocytes, blood glutathione peroxidase - by 42.69 %, 41.26 %, 32.37 % respectively, and the content of ceruloplasmin in the blood decreases by 47.24 % on average by 1/10 DL<sub>50</sub> compared to control.

It has been determined that in the body of rats, toxicated with block-copolymers at a dose of 1/10 DL<sub>50</sub>, there is a violation of the state of cytoplasmic hepatocyte membranes: the externalization of phosphatidylserine in the phospholipid bile and the change in the fluorescence intensity of the probes on the erythrocyte membranes, the lack of changes in the field of glycerol and carbonyl groups of phospholipids, formation on the surface erythrocyte membranes of the extra shell.

It has been established that under the conditions of the study group xenobiotics for 45 days at a dose of 1/10 DL<sub>50</sub> the hepatocytes survive by 18.21 %, activated by apoptotic hepatocytes, which is confirmed by an increase in the percentage of early-apoptotic hepatocytes (18.98 % on average) and late-apoptotic / necrotic cells ( an average of 9.75 %).

It was established that block-copolymers contribute to the development of hypoproteinemia due to hypoalbuminemia, uremia (the urea content increases by an average of 2,63 times); creatininemia (the creatinine content increased by 91.59 %). Reduced reproductive function of white rats is observed: hypotestosteronemia and hypoestrogenemia. Xenobiotics in doses of 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> cause a disruption of the carbohydrate metabolism: a decrease in the content of lactate, pyruvate in the background of hypoglycemia (glucose content decreased by 53.51 %, p <0.05). Hypoinsulinemia is detected, which may indicate a malformation of the functioning of the pancreas. The evaluation of lipid metabolism monitoring results under the influence of the studied group of xenobiotics at doses of 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> revealed hypercholesterolemia and an increase in the content of triglycerides.

The efficiency of using the drug "Kvertin" for correction of disorders of the structural and functional state of the liver of rats on the background of toxification with block-copolymers at a dose of 1/10 and 1/100 DL<sub>50</sub> has been proved. At 45 days, the activity of AsAT, AlAT decreased by an average of 17 % and 19 %. "Kvertin" promotes the activation of biotransformation of, reduces the intensity of LPO processes and activates the antioxidant system, improves the monitoring parameters of the exchange of proteins, carbohydrates, lipids. On the basis of click-experimental studies, it has been proven that the drug "Kvertin" may be recommended for use in clinical practice by occupational physicians for correcting pathological changes in the structural and

functional state of the liver due to the harmful effects of xenobiotics.

It was revealed that the leading links in the mechanism of biological action of block-copolymers are hepatotoxic, membranotropic, dysgomeostatic effects due to the development of oxidative stress.

**Key words:** block copolymers, hepatotoxicity, oxidative stress, MGMT, membranes, apoptosis, necrosis.