

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БОРЩОВЕЦЬКА ВІРА ЛЕОНІДІВНА

УДК 577.161.1:612.354

ДИСЕРТАЦІЯ
ВПЛИВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РЕТИНОЇДАМИ НА ПРОЦЕСИ
ФУНКЦІОНУВАННЯ БІСФЕНОЛ А-ДЕТОКСИКУЮЧИХ ЕНЗИМІВ

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD).

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

_____ / В. Л. Борщовецька

Науковий керівник Марченко Михайло Маркович
доктор біологічних наук, професор

Чернівці – 2020

АНОТАЦІЯ

Борщовецька В. Л. Вплив різної забезпеченості ретиноїдами на процеси функціонування бісфенол А-детоксикуючих ензимів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD) за спеціальністю 091 – Біологія. – Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню активності бісфенол А-детоксикуючих ензимів в умовах різної забезпеченості ретиноїдами, прооксидантних та обезогенних властивостей даного контамінанта та проведенню превентивної корекції ВРА-індукованого оксидативного пошкодження печінки шляхом попереднього введення високоактивної щодо детоксикації даного ксенобіотика, селективної культури бактерій роду *Lactobacillus*.

У I розділі наведений аналіз літературних даних щодо роботи детоксикаційної системи печінки та особливості її регуляції. Функціонування біотрансформуючих ензимів може змінити біологічні властивості та конвертувати ксенобіотики до реактивних (електрофільних) метаболітів. Тому баланс між активацією та детоксикацією даних сполук біотрансформуючими ензимами часто є ключовим детермінантом токсичності ксенобіотиків. Проведений аналіз наукової літератури з даної тематики дозволив виявити спільні закономірності та припустити, що ретиноїди активно залучені в процеси біотрансформації ксенобіотиків *in vivo*. Очевидно, така взаємодія лежить у площині реалізації ефектів ретиноїдів, опосередкованих їх зв'язуванням з ядерними рецепторами, в першу чергу, за рахунок участі даних есенціальних сполук у регуляції метаболічних шляхів детоксикації ксенобіотиків.

У дисертаційному дослідженні для встановлення ролі ретиноїдів у процесах детоксикації ксенобіотиків та токсичності бісфенолу А

використано трансгенних тварин, які нокаутні за геном лецитин:ретинолацилтрансферази. Даний ензим здійснює етерифікацію ретинолу до його ефірів – основної зберігаючої форми вітаміну А. Отже, ці миші позбавлені запасів даного мікронутрієнта у печінці. Трансгенні тварини люб'язно надані професором У. Бленером з лабораторії біології ретиноїдів Колумбійського університету міста Нью-Йорк (США), та є зручною моделлю для встановлення ролі ефірів ретинолу у підтримці нормальної ретиноїд-залежної функції та попередженні розвитку захворювання печінки. При утриманні тварин на повноцінному харчовому раціоні вони розвиваються нормально і не виявляють явних фенотипічних відмінностей у порівнянні з мишами дикого типу. Однак, у ранньому віці у цих тварин сильно атенуйовані функції паличок та колбочок сітківки.

В якості індуктора детоксикаційної системи печінки у роботі використано синтетичний, персистентний контамінант – бісфенол А, який на сьогодні є однією із найбільш розповсюджених сполук у всьому світі та використовується у виробництві полікарбонатних споживчих товарів. Отримані результати досліджень щодо введення тваринам дикого типу та тваринам, позбавлених запасів ефірів ретинолу у стелатних клітинах печінки, бісфенолу А у дозі 50 мг/кг, що є достатньо високою дозою та відповідає дозі LOAEL, чітко вказують на те, що нормальне функціонування ензимів I та II фаз клітинної системи детоксикації потребує наявності ретиноїдів. Цей висновок підтверджується спостереженнями того, що введення великих пероральних доз ацетату ретинолу супроводжується індукцією ензиматичних активностей обох фаз при введенні ксенобіотика.

Детоксикація бісфенолу А відбувається як оксигеназним, так і трансферазним шляхом. У випадку залучення до біотрансформації даного контамінанту ензимів II фази детоксикаційної системи, утворюються нетоксичні кон'югати із глюкуроновою кислотою. Проте, при надходженні

високих доз бісфенолу А, його метаболізм відбувається за участі ензимів І фази клітинної системи біотрансформації.

Аналіз даних літератури показав, що оксигеназний метаболізм бісфенолу А призводить до утворення потенційно токсичних проміжних сполук, у тому числі високоефективних мета-, орто-ОН-, а також хінонових форм ксенобіотика. Таким чином, ретиноїд-залежне посилення біотрансформації ксенобіотика з метою його детоксикації не завжди виявляється позитивним результатом, оскільки, може служити джерелом утворення більш токсичних інтермедіатів, що в кінцевому випадку лише поглиблює токсичні ефекти. У роботі встановлено, що введення бісфенолу А за умов нормального забезпечення ретиноїдами супроводжувалось індукцією вільнорадикального пошкодження клітинних ліпідів та протеїнів у печінці, причому найбільшого пошкодження зазнавали саме біомолекули мітросомальної та цитозольної фракцій, що ймовірно пов'язано із особливостями детоксикації ВРА. Додаткове пероральне введення надвисоких доз ацетату ретинолу поглиблювало індуковані ксенобіотиком вільнорадикальні процеси. Це підтверджено результатами, отриманими від тварин-нокаутів та експозиції цих тварин надвисокими дозами вітаміну А. Відсутність оксидативного пошкодження печінки та субклітинних фракцій при недостатності печінкових ефірів ретинолу та його поява при нормальних чи надлишкових кількостях вітаміну А свідчить, що забезпеченість ретиноїдами є одним з факторів, який визначає прооксидантні властивості бісфенолу А.

Інтенсивність вільнорадикальних процесів в організмі визначається прооксидантно-антиоксидантним статусом. Надмірне генерування активних форм кисню та азоту, основним джерелом, яких, як відомо, виступають мітохондрії, може індукувати та посилювати оксидативні процеси в печінці. Проте, вільні радикали можуть утворюватися також і в результаті роботи монооксигеназної системи. Показано, що індукована

додатковим введенням ретиноїдів, робота ензиматичних систем біотрансформації виступає додатковим джерелом активних форм кисню та нітрогену, що підтверджено посиленням генеруванням супероксид аніон радикалу та оксиду азоту саме у мікросомальній та цитозольній фракціях. Крім того, при введенні бісфенолу А відбувається і зниження ензиматичних активностей антиоксидатної системи печінки, основна роль яких полягає у знешкодженні вільних радикалів, що виражено зниженням каталазної, супероксиддисмутазної та пероксидазної активностей у цитозольній фракції. Це, в свою чергу, призводить до посилення процесів оксидативного пошкодження клітинних біомолекул вищезазначених субклітинних фракцій. Даний висновок підтверджується результатами досліджень у тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, що отримували ВРА після введення фармакологічної дози 3000 МО ацетату ретинолу.

Пероральне введення ретиноїдів тваринам, позбавлених ендогенно-депонованих ретиноїдів, внаслідок нокауту гена лецитин:ретинолацилтрансферази також має несприятливі наслідки для печінки, прискорюючи оксидативне пошкодження, викликане бісфенолом А, через індукцію активності мікросомальних монооксигеназ. Це, в свою чергу, супроводжується посиленням генеруванням немітохондріальних ROS, зниженою активністю ензиматичної ланки антиоксидантного захисту, що призводить до індукції вільнорадикального пошкодження клітинних біомолекул, вираженого у підвищенні рівня маркерів пероксидного окиснення ліпідів та протеїнів у субклітинних фракціях. Проте найбільші зміни зафіксовано саме у мікросомальній фракції печінки, як місця детоксикації контамінанта.

Таким чином, ступінь оксидативного пошкодження біомолекул печінки, що виникає внаслідок гострої інтоксикації ВРА, безпосередньо модулюється споживанням аліментарних ретиноїдів протягом періоду

експозиції ВРА та наявності запасів печінкових ретиноїдів, накопичених за час життя організму.

Варто зазначити, що у літературі крім відомостей, які вказують на дію бісфенолу А, як ксеноестрогена, згадується, що токсичні ефекти цього контамінанту за умов хронічного споживання низьких доз можуть бути пов'язанні з порушенням обміну основних біополімерів, зокрема ліпідів та вуглеводів. А оскільки, ретиноїди, як уже відомо, є регуляторами генної активності, природно, що у нас виникло питання щодо впливу даного есенціального мікронутрієнта на токсичну дію бісфенолу А, як обезогена (призводить до розвитку ожиріння). У дисертації встановлено, що даний контамінант, за умов нормального надходження ретиноїдів, потрапляючи до організму, порушує транспорт глюкози, що виражалось у підвищених показниках її вмісту й розвитку інтолерантності до даного моносахариду, та порушенні ліпідного профілю сироватки крові. Дані ефекти посилювались за умов додаткового надходження ретиноїдів, що, в першу чергу, зумовлені посиленням дії бісфенолу А опосередкованої сигналінгом ретиноєвої кислоти. В свою чергу, за умов дефіциту ендогенних печінкових запасів ретиноїдів, основні показники ліпідного профілю сироватки крові, глікемічна крива та вміст глюкози у тварин не змінювались із введенням ксенобіотика. Проте, компенсація недостатніх запасів вітаміну А у цих трансгенних тварин, шляхом введення 3000 МО ацетату ретинолу, призводило до розвитку ВРА-індукованих дисліпідемії та порушення транспорту глюкози.

З метою корекції та терапії патологічних уражень печінки на сьогодні використовується широкий спектр препаратів, як синтетичного, так і природного походження. Проте, дуже часто їх застосування може викликати несподівані побічні реакції, що й змушує до пошуків альтернативних безпечних засобів. В аспекті інструментів-модуляторів токсичного ураження печінки, на сьогодні надзвичайної актуальності набули

пробіотики (живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які при введенні в організм природним шляхом та в дозволений кількості, чинять позитивний ефект на організм господаря). Тому інша частина дисертаційного дослідження присвячена превентивній корекції бісфенол А-індукованого оксидативного пошкодження ліпідів та протеїнів печінки шляхом попереднього введення високоактивної щодо детоксикації даного ксенобіотика селективної культури бактерій роду *Lactobacillus*. У рамках виконання даного дослідження розроблено та запатентовано спосіб превентивної корекції бісфенол-А індукованої гепатотоксичності пробіотичними культурами, виділених із фекального біоптату тварин, які зазнавали впливу бісфенолу А. Показано, що колонізація шлунково-кишкового тракту даною пробіотичною культурою призводить до збільшення кількості мікроорганізмів корисної мікрофлори та зменшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів. Застосування розробленого підходу виділення селективної аутохтонної пробіотичної культури тварин, що піддавались контакту із ксенобіотиком та її подальше введення здоровим тваринам, забезпечує попередження оксидативного пошкодження основних біомолекул печінки, індуковане введенням бісфенолу А.

Тому, з огляду на все вищесказане, тематика даного дисертаційного дослідження є актуальною.

Ключові слова: ретиноїди, ретинол, вітамін А, бісфенол А, контамінант, детоксикаційна система, оксидативний стрес, пробіотики, гепатотоксичність, вільнорадикальне пошкодження, дисліпідемія.

ABSTRACT

Borschovetska V. L. The Effect of Different Retinoid Provision on the Processes of Bisphenol A-Detoxifying Enzymes Functioning. – Manuscript.

The thesis for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in speciality 091 – Biology. – Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, 2020.

The thesis is devoted to the investigation of bisphenol A-detoxifying enzymes activities under the conditions of different retinoids supplementation, the prooxidant and obesogenic effect of this contaminant and the conduct of preventive correction of BPA-induced oxidative damage of liver by the previous administration of selective bacteria culture genus *Lactobacillus*, which have highly detoxification potential of this xenobiotics.

A review of the liver detoxification system and the particularities of its regulation is presented in Section I. The work of biotransformation enzymes is aimed at detoxifying xenobiotics but, paradoxically, it can alter their biological properties and convert them to reactive (electrophilic) metabolites. Therefore, the balance between activation and detoxication of these compounds by biotransforming enzymes is often a key determinant of their toxicity. The analysis of the scientific literature on the subject allows uncovering common patterns and suggesting that retinoids are actively involved in the processes of *in vivo* biotransformation of xenobiotics. Obviously, such interaction has to rely on the realization of the genomic effects of retinoids mediated by their nuclear receptors, primarily due to the participation of these essential compounds in the regulation of metabolic pathways of xenobiotics detoxification.

In research, transgenic animals have been used to investigate the role of retinoids in xenobiotics biotransformation and toxicity of BPA. These animals are knockout for lecithin:retinolacyltransferase gene. This enzyme esterifies retinol to its ester form, the main form for the storage of vitamin A. Thus, these mice don't have of this micronutrient in a liver. The transgenic animals were kindly provided by prof. W. Blaner from the Institute of Human Nutrition, Columbia University,

New York (USA) and are revealing model for understanding the role of retinyl esters in maintaining normal retinoid-dependent function and preventing disease. *Lrat*^{-/-} mice, when maintained on a control diet, develop normally and show no obvious phenotypic differences when compared with wild-type mice. However, at an early age these mutant mice show a phenotype of severely attenuated rod and cone visual functions.

In the work, a synthetic, persistent contaminant – bisphenol A, that is one of the highest volume chemicals produced worldwide and used in the production of polycarbonate consumer goods, was used as an inducer of the liver detoxification system. The effect of bisphenol A administration at a dose of 50 mg/kg body weight, corresponding to the lowest observable adverse effect level was conducted in the studies. The results indicate that the normal functioning of the enzymes I and II phases of the cellular detoxification system requires the presence of retinoids. Thus, hepatic BPA-biotransformation is retinoid-dependent. This conclusion is supported by the observation that high oral doses of retinoids allow increasing the enzymatic activities of both phases under the administration of xenobiotic.

The detoxification of this xenobiotic occurs both transferase and oxygenase metabolic pathway. Non-toxic glucuronic acid conjugates are formed when phase II detoxification enzymes are involved in bisphenol A-biotransformation. However, when the high doses of this contaminant are consumed, BPA metabolism occurs with the involvement of the enzymes of the phase I cellular biotransformation system.

Analysis of the literature evidence showed that oxygenase metabolism of BPA leads to the formation of potentially toxic intermediates, including highly efficient meta-, ortho-, OH-BPA, and quinone forms of BPA. Thus, retinoid-dependent enhancement of xenobiotic biotransformation for its detoxification is not always a positive result, since it can serve as the source of formation of more toxic intermediates, which only potentiates the toxic effects. It was found that the bisphenol A administration under the conditions of normal retinoid

supplementation was accompanied by the development of free radical damage of cellular biopolymers, mainly in the hepatic microsomal fraction as the site of detoxification of this contaminant. Additional supplementation with retinoids aggravates the BPA-induced free radical processes. It was confirmed by obtained results of transgenic animals and application of high dose of vitamin A. The absence of oxidative damage in liver and subcellular fractions in case of insufficiency of hepatic retinyl esters and its appearance at normal or excess amounts of vitamin A indicates that retinoid supplementation is one of the factors determining of the bisphenol A prooxidant effect.

The intensity of free radical processes in the body is determined by the prooxidant-antioxidant status. Excessive reactive oxygen and nitrogen species production, the main source of which mitochondria are known, can induce and aggravate hepatotoxic processes. However, free radicals can also be formed as a result of the functioning of the monooxygenase system. It was shown, that the activities of enzymatic biotransformation systems induced by the additional administration of retinoids are an additional source of free radicals, which are confirmed by the increased generation of superoxide anion radical and nitric oxide. However, microsomes and cytosol were the main source of free radicals, as recorded in our studies, but not the electron-transport chain of mitochondria. Additionally, the depletion of the antioxidant system's enzymes of the liver in BPA-exposure animals is observed. The main role of this system is the elimination of free radicals. The decrease in catalase, superoxide dismutase and peroxidase activities in the cytosolic fraction, which has been shown in this research, leads to increased processes of oxidative damage to cell biopolymers of the subcellular fractions. This conclusion is confirmed by the results of studies in BPA-exposure animals with normal retinoid supplementation after pharmacological supplementation of 3000 IU retinyl acetate.

Oral supplementation with retinoids of animals with a lack of retinoids stores also has adverse effects on the liver, aggravation of BPA-induced oxidative

damage, by induction activities of microsomal monooxygenase. These results are accompanied by the enhanced generation of non-mitochondrial ROS, reduced activity of the antioxidant enzymes, which leads to the induction of free radical damage of cellular biopolymers, expressed in increasing levels of markers of lipid and protein peroxidation, mainly in the liver microsomal fraction as the site of detoxification of this contaminant.

Thus, the degree of liver oxidative damage resulting from acute BPA intoxication is directly modulated by the consumption of alimentary retinoids during the BPA exposure period and the hepatic retinoid stores accumulated during the life of the organism.

It should be noted that, in addition to information indicating the action of bisphenol A as xenoestrogen, it is mentioned in the literature that the toxic effects of BPA may be related to its action through non-genomic pathways. Thus, it can lead to a variety of metabolic disorders, including lipid and carbohydrate metabolism. Retinoids are well-known regulators of gene activities. Therefore, the question about the effect of this essential micronutrient on the toxic effect of bisphenol A as an obesogen naturally arose. In the dissertation, it is established that under the conditions of normal intake of retinoids BPA disrupts the transport of glucose and lipids in the body, which was expressed in the increased content and intolerance to this monosaccharide, and impaired of serum lipid profile. These effects are exacerbated under the conditions of the additional retinoid supplementation, which is primarily due to the enhanced of RA-signaling-mediated action of bisphenol A. In contrast, the main indicators of the lipid profile of the blood serum, the blood glucose curve and glucose content did not change with the administration of the xenobiotic under the conditions of endogenous retinoid hepatic stores deficiency. However, the administration of pharmacological doses of retinoids leads to the development of BPA-induced hypercholesterolemia, hypertriacylglycerolemia, and impaired glucose transport.

In order to the correction and treatment of pathological lesions of the liver, a wide range of drugs, both synthetic and natural in origin, are used today. However, very often, the application of these agents can cause unexpected adverse reactions, which leads to the search for alternative safer instruments. Currently, probiotics (living microorganisms and microbial substances, which have a positive effect on the host organism under the administration into the organism by naturally occurring and in the allowed amount) have become extremely relevant as tools-modulators of liver toxicity. Therefore, the last part of the dissertation is devoted to the preventive correction of BPA-induced oxidative damage by the previous administration of a highly active to detoxification of this xenobiotics the selective bacteria culture genus *Lactobacillus*. As part of this study, a method for preventive correction of bisphenol A-induced oxidative damage by probiotic cultures isolated from fecal samples of BPA-exposed animals with toxic liver damage was developed and patented. It was shown that gastrointestinal tract colonization by probiotics leads to an increasing of the number of beneficial microflora microorganism and decreasing the number of conditionally pathogenic microorganisms. The application of the developed approach for the selection of selective autochthonous probiotic bacteria of animals that have been exposed to xenobiotics and their subsequent administration to healthy animals provides prevention of hepatic oxidative damage induced by the administration of bisphenol-A.

In accordance with mentioned above, the topic of this dissertation is relevant.

Keywords: retinoids, retinol, vitamin A, bisphenol A, contaminant, detoxification system, oxidative stress, probiotics, hepatotoxicity, free radical damage, dyslipidemia.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ
Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

Видання, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Shmarakov I. O., Borschovetska V. L., Blaner W. S. Hepatic detoxification of Bisphenol A is retinoid-dependent. *Toxicol. Sci.* 2017. Vol. 157. P. 141–155.
2. Shmarakov I. O., Borschovetska V. L., Ivanishchuk L. P., Marchenko, M. M. Hepatotoxicity of bisphenol A under conditions of differential supplementation with retinoids. *Ukr. Biochem. J.* 2016. Vol. 88. P. 99–105.

Наукові фахові видання:

3. Борщовецька В. Л., Шмараков І. О. Активність ферментативної ланки антиоксидантної системи в печінці при введенні бісфенолу А за відсутності запасів ретиноїдів. *Біол. сист.* 2016. Т. 8. С. 28–34.
4. Borschovetska V., Marchenko M. Lipid profile of blood serum in mice under conditions of bisphenol A administration and vitamin A different supplementation. *Biol. Syst.* 2019. Vol. 11. P. 115–121.

Патенти:

5. Пат. № 115978. А61К35/74. Спосіб пробіотичної превентивної корекції бісфенол А-індукованого токсичного ураження печінки. Шмараков І. О., Борщовецька В. Л., Марченко М. М.; опуб. Бюл. № 9, від 10.05.2017.

Монографія:

6. Біохімічні аспекти функціонування ретиноїдів : монографія. М. М. Марченко, І. О. Шмараков, В. Л. Борщовецька. Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2017. 112 с.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. Борщовецька В. Л., Шмараков І. О., Марченко М. М. Забезпеченість ретиноїдами як фактор, що визначає активацію детоксикаційної системи. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016: Конференція-конкурс робіт молодих учених, Київ, 26 – 27 травня 2016 р.: *Укр. біохім. журн.* 2016. Т. 88, № 4. С. 86.
8. Borschovetska V., Ketsa O., Marchenko M. Functional activity of NADH-dependent reductase system in liver microsomal fraction in rats with Guerin's carcinoma under conditions of essential nutrients administration. International scientific symposium «Fundamental principles of cancer biotherapy», 21-23 May 2018, Kyiv.: *Experimental Oncology*. 2018. Vol. 40, N 2. P. 154-155.
9. Borschovetska V. L., Nahez O. O., Marchenko M. M. Lipid profile of blood serum in mice under the conditions of bisphenol A administration and vitamin A overconsumption. Young scientists conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”, 21-22 March, 2019, Kyiv.: *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91, N 2. P. 73.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	28
1.1. МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ДЕТОКСИКАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ.....	28
1.1.1. Ензиматичні системи I фази біотрансформації ксенобіотиків.....	28
1.1.2. Кон'югуючі трансферази II фази клітинної системи біотрансформації.....	31
1.1.3. Мембранні транспортери III фази детоксикаційної системи печінки.....	33
1.2. РЕТИНОЇДИ ТА РЕТИНОЇД-ЗАЛЕЖНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ ДЕТОКСИКАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ	35
1.2.1. Поняття «вітаміну А» та «ретиноїдів».....	35
1.2.2. Вплив ретиноїдів на активність біотрансформуючих ензимів.....	36
1.2.3. Модуляція ретиноїдами ксенобіотик-індукованої гепатотоксичності.....	38
1.3. МЕТАБОЛІЗМ БІСФЕНОЛУ А У ПЕЧІНЦІ.....	40
1.3.1. Структурно-функціональна характеристика бісфенолу А.....	40
1.3.2. Трансферазний шлях метаболізму бісфенолу А.....	42
1.3.3. Оксигеназний шлях метаболізму бісфенолу А.....	42
1.4. ТОКСИЧНІ ЕФЕКТИ БІСФЕНОЛУ А.....	43
1.4.1. Класичні токсичні ефекти бісфенолу А як ксеноестрогена.....	44
1.4.2. Бісфенол А як індуктор гепатотоксичності.....	45
1.4.3. Інші токсичні ефекти бісфенолу А.....	46
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1.....	47

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
2.1. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА МОДЕЛЬ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ.....	49
2.2. ВИЗНАЧЕННЯ МАРКЕРНИХ АКТИВНОСТЕЙ, КОНЦЕНТРАЦІЙ МЕТАБОЛІТІВ ТА ПРОДУКТІВ ОКСИДАТИВНОГО ПОШКОДЖЕННЯ БІОМОЛЕКУЛ.....	51
2.2.1. Виділення та оцінка ступеня чистоти субклітинних фракцій печінки.....	51
2.2.2. Активність бісфенол А-метаболізуючих ензимів клітинної системи біотрансформації	53
2.2.3. Визначення інтенсивності генерування супероксидного аніон-радикалу та оксиду азоту субклітинними фракціями печінки.....	57
2.2.4. Визначення активностей ензиматичної ланки антиоксидантної системи.....	58
2.2.5. Визначення вмісту продуктів оксидативного пошкодження біомолекул печінки.....	60
2.3. ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ГЛЮКОЗИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПІДНОГО ПРОФІЛЮ СИРОВАТКИ КРОВІ.....	62
2.3.1. Проведення тесту толерантності до глюкози.....	63
2.3.2. Аналіз ліпідного профілю сироватки крові.....	63
2.4. МОДЕЛЬ ПРЕВЕНТИВНОЇ КОРЕКЦІЇ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ.....	65
2.4.1. Отримання високоактивної пробіотичної культури роду <i>Lactobacillus</i>	65
2.4.2. Колонізація кишечника здорових тварин пробіотиками.....	65
2.4.3. Аналіз компонентного складу мікробіоти кишечника.....	66
2.5. СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ.....	67

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	68
3.1. ЛІПІДНИЙ ПРОФІЛЬ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ БІСФЕНОЛУ А ТА РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РЕТИНОЇДАМИ.....	68
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.1.....	78
3.2. ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ БІСФЕНОЛУ А ТА РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РЕТИНОЇДАМИ.....	78
3.2.1. Оксидативне пошкодження біомолекул печінки та окремих субклітинних фракцій за умов введення бісфенолу А та різної забезпеченості ретиноїдами.....	79
3.2.2. Активність бісфенол А-метаболізуючих ензимів клітинної системи біотрансформації.....	91
3.2.3. Інтенсивність генерування супероксидного аніон-радикалу та оксиду азоту субклітинними фракціями печінки	103
3.2.4. Активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту.....	109
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.2.....	115
3.3. ПРЕВЕНТИВНА КОРЕКЦІЯ БІСФЕНОЛ А-ІНДУКОВАНОГО ОКСИДАТИВНОГО ПОШКОДЖЕННЯ БІОМОЛЕКУЛ ПЕЧІНКИ СЕЛЕКТИВНИМИ ПРОБІОТИКАМИ.....	116
3.3.1. Компонентний склад мікробіоти кишечника за умов введення бісфенолу А та пробіотиків.....	116
3.3.2. ВРА-індуковане оксидативне пошкодження ліпідів та протеїнів печінки при введенні різних пробіотиків.....	119
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.3.....	124
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	125
ВИСНОВКИ.....	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	131
ДОДАТКИ	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ABC – АТФ-зв'язуючі касетні транспортери

ATRA – повністю-*транс*-ретиноева кислота

AUC – площа під глікемічною кривою

BPA – бісфенол А

CAT – каталаза

CYP – цитохром P450

ER – рецептор естрогену

FMO – флавінова монооксигеназа

GSHPx – глутатіопероксидаза

GST – глутатіон-S-трансфераза

HDL – ліпопротеїни високої густини

LDL – ліпопротеїни низької густини

LRAT – лецитин:ретинолацилтрансфераза

MPO – мієлопероксидаза

NP – природні пробіотики

RA – ретиноева кислота

Rac – ацетат ретинолу

RAL – ретиналь

RAR – рецептор ретиноевої кислоти

ROL – ретинол

ROS – активні форми кисню

RXR – ретиноїд X рецептор

SOD – супероксиддисмутаза

SP – селективні пробіотики

SULT – сульфотрансфераза

UGT – UDP-глюкуронозилтрансфераза

VA – вітамін А

VLDL – ліпопротеїни дуже низької густини

XD – ксантиндегідрогеназа

XOR – ксантиноксидоредуктаза

XO – ксантинооксидаза

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. На сьогодні надзвичайної актуальності набувають дослідження токсичних ефектів харчових контамінантів на організм людини. До таких сполук належить бісфенол А (2,2-біс (4-гідроксифеніл)-пропан), який широко використовується як мономер у виробництві полікарбонатної продукції. Дана сполука виступає класичним ксеноестрогеном, проявляючи естрогенні ефекти, шляхом зв'язування з ядерними рецепторами [1–3]. Крім того, численними дослідженнями [4] показано, що ВРА за умов хронічної експозиції низькими дозами може проявляти обезогенні властивості, змінюючи енергетичний баланс, індукуючи адипогенез та накопичення ліпідів. Проте який вплив на ліпідний обмін та транспорт глюкози буде здійснювати даний контамінант за умов його гострої інтоксикації високими дозами, на сьогодні залишається нез'ясованим.

Метаболізм ВРА здійснюється в печінці, де основна його частина піддається біотрансформації, що полягає в утворенні інертних кон'югатів, які виводяться з організму [5]. Проте за умов експозиції високими дозами, ВРА підлягає СYP-опосередкованому окисненню, в результаті чого утворюються нестабільні реактивні інтермедіати, що здатні індукувати оксидативне пошкодження та клітинну дисфункцію [6]. Тому регуляція активностей основних ензимів детоксикаційної системи дозволить корегувати розвиток вільнорадикальних процесів та метаболізм ксенобіотиків у цілому.

Активність ензимів біотрансформації знаходиться під контролем ксеносенсорів, які функціонують у формі гетеродимерних комплексів [7, 8], партнерами яких є ядерні рецептори ретиноїдів, лігандом для яких виступає ретиноева кислота [9, 10]. Тому забезпеченість ретиноїдами може виступати фактором, який визначатиме активність компонентів детоксикаційної системи та ефективність біотрансформації ксенобіотиків [11–13].

З одного боку, активація детоксикаційної системи за участі ретиноєвої кислоти буде забезпечувати ефективну біотрансформацію даних сполук, з іншого – посилення роботи системи детоксикації буде призводити до розвитку процесів гепатотоксичності. Проте відомо, що при ураженнях печінки, в тому числі індукованих лікарськими препаратами та харчовими контамінантами, прогресивно втрачаються запаси ефірів ретинолу, причому не лише в самій паренхімі органу, але й у біологічних рідинах організму [14]. Тому, можливо поповнення запасів ретиноїдів шляхом їх додаткового введення, могло б скорегувати та атенувати гепатотоксичні процеси.

Крім втрат запасів ретиноїдів у печінці, експозиція ксенобіотиками може призводити до зниження кількості корисної мікробіоти тонкого кишечника, яка залучена до процесів біотрансформації екзогенних сполук. Тому її відновлення шляхом введення пробіотичних штамів, та залучення цих бактерій до метаболізму ксенобіотиків [15, 16], могло б бути одним із методів корегування токсичності контамінантів.

З огляду на все це видається актуальним дослідження детоксикації бісфенолу А в умовах різної забезпеченості ретиноїдами, його вплив на ліпідний обмін, окисні процеси в печінці та корегуванні останніх шляхом введення пробіотиків, які контактували з досліджуваним ксенобіотиком.

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи* – дослідити функціонування бісфенол А-детоксикуючих ензимів, прооксидантні та обезогенні властивості даного контамінанта в умовах різної забезпеченості ретиноїдами та провести превентивну корекцію ВРА-індукованої гепатотоксичності, шляхом попереднього введення високоактивної щодо детоксикації даного ксенобіотика селективної культури бактерій роду *Lactobacillus*.

Завдання досліджень:

- оцінити обезогенний вплив бісфенолу А за умов введення його високих доз при нормальній забезпеченості ретиноїдами, відсутності печінкових запасів вітаміну А та додаткового введення фармакологічних доз ацетату ретинолу;
- проаналізувати інтенсивність процесів вільнорадикального пошкодження ліпідів та протеїнів печінки та її субклітинних фракцій (на основі рівня ТВА-активних продуктів, протеїнових карбонільних та SH-груп, відновленого глутатіону) при гострій експозиції ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами;
- встановити вплив різної забезпеченості ретиноїдами на активність компонентів клітинної системи детоксикації (ензимів I фази – цитохром Р450, флавінвмісні монооксигенази, ксантинооксидаза та ензимів II фази – UDP-глюкуронозилтрансфераза та глутатіон-S-трансфераза) за умов введення бісфенолу А;
- оцінити інтенсивність генерування супероксидного аніон-радикалу та оксиду азоту у мікросомальній, мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки та ензиматичні активності системи антиоксидантного захисту (каталаза, супероксиддисмутаза та глутатіонпероксидаза) за умов введення бісфенолу А та різної забезпеченості ендогенними та аліментарними ретиноїдами.
- провести превентивну корекцію бісфенол А-індукованого оксидативного пошкодження біомолекул печінки пробіотичними культурами аутохтонної мікрофлори кишечника.

Об'єкт дослідження: прооксидантні та обезогенні властивості бісфенолу А за умов різної забезпеченості ретиноїдами та превентивна пробіотична корекція токсичного ураження печінки, індукованого введенням ксенобіотика.

Предмет дослідження: активність компонентів клітинної системи детоксикації, вільнорадикальні процеси у субклітинних фракціях печінки при введенні бісфенолу А та різної забезпеченості ретиноїдами.

Використані методи дослідження: метод експериментальної патології (індукція гепатотоксичності); диференційного центрифугування (виділення мікросомальної, мітохондріальної та цитозольної фракцій печінки); спектрофотометричні (визначення: маркерних активностей I та II клітинної системи детоксикації; інтенсивності генерування супероксидного аніон-радикалу та оксиду азоту; каталазної, супероксиддисмутазної, глутатіонпероксидазної активностей, продуктів оксидативного пошкодження біомолекул мітохондріальної, мікросомальної та цитозольної фракцій печінки), фотометричні (вмісту глюкози, відновленого глутатіону, загального холестеролу, триацилгліцеролів, холестеролу різних класів ліпопротеїнів); метод експериментального трансгенезу (використання трансгенних ліній тварин – миші *Lrat*^{-/-}, позбавлені запасів ефірів ретинолу у печінці, внаслідок нокауту гена лецитин:ретинолацилтрансферази); мікробіологічні (виділення пробіотичних культур, аналіз компонентного складу мікробіоти кишечника), статистичні методи аналізу (однофакторний дисперсійний аналіз з наступним застосуванням апостеріорного критерію Тьюкі).

Наукова новизна роботи полягає у встановленні молекулярно-біохімічних механізмів залучення ретиноїдів у процеси функціонування детоксикаційної системи, їх ролі у розвитку ВРА-індукованого оксидативного пошкодження та дисліпідемії за умов гострого введення ксенобіотика та проведенні превентивної корекції пробіотичними культурами аутохтонної мікрофлори кишечника вільнорадикального ураження біомолекул печінки, спричиненого введенням бісфенолу А.

Особистий внесок здобувача. Дисертація – самостійна наукова праця, яка виконана під науковим керівництвом доктора біологічних наук,

професора Марченка М. М. Автором здійснено аналіз наукової літератури щодо тематики роботи, проведення експериментів, статистичної обробки даних. Аналіз одержаних результатів та формулювання висновків дисертаційної роботи обговорювались спільно з науковим керівником.

В опублікованих у співавторстві публікаціях автору належать: [1] – визначення монооксигеназних та трансферазних активностей, інтенсивності генерування активних форм кисню та азоту, вміст основних маркерів оксидативного пошкодження біомолекул субклітинних фракцій печінки за умов різної забезпеченості ретиноїдами та введенні бісфенолу А; [2] – аналіз вмісту основних маркерів оксидативного пошкодження біомолекул печінки при різній забезпеченості аліментарними та ендогенними ретиноїдами; [3] – дослідження ензиматичних активностей антиоксидантної системи у печінці тварин дикого типу при введенні ксенобіотика та 3000 МО ацетату ретинолу; [4] – визначення вмісту показників ліпідного профілю сироватки крові при введенні ВРА та введенні фармакологічних доз ретиноїдів, [5] – виділення пробіотичних культур та їх введення, визначення вмісту маркерів оксидативного пошкодження біомолекул печінки; [6] – підготовка розділу IV. «Ретиноїди та захворювання печінки»; [7] – дослідження маркерних монооксигеназних та трансферазних активностей у печінці тварин дикого типу та трансгенних тварин, оформлення тез; [8] – визначення інтенсивності генерування супероксидного радикалу у мікросомальній фракції за умов введення 3000 МО ацетату ретинолу, оформлення тез; [9] – аналіз ліпідного профілю сироватки крові при додатковій експозиції ретиноїдами та за умов відсутності їх запасів у печінці, оформила тези.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження були оприлюднені на: Конференції-конкурсу робіт молодих учених: «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 2016): Міжнародний науковий симпозіум «Фундаментальні принципи біотерапії

раку» (Київ, 2018), Конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 2019 р.).

Публікації: результати дисертаційного дослідження висвітлені у 10 публікаціях, з них 1 стаття у міжнародному виданні, що входить до науково-метричної бази даних Scopus та належить до першого квартиля відповідно до класифікації SCImago Journal & Country Rank (зараховується як 2 публікації), 1 стаття в українському фаховому виданні, що входить до науково-метричної бази даних Scopus, 2 статті, що належать до переліку фахових видань України (категорія Б), 3 тез доповідей на конференціях, отримано патент на корисну модель та здобувач є співавтором монографії.

Структура та обсяг дисертації. Кваліфікаційна робота складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, трьох розділів, узагальнення результатів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Повний обсяг роботи –163 сторінки, обсяг основного тексту дисертації – 111 сторінок. Дисертація містить 29 рисунків, а список використаних джерел викладений на 27 сторінках і містить 210 найменувань.

У *вступі* наведена загальна характеристика роботи, зокрема, зазначено актуальність дисертаційного дослідження, визначено мету, об'єкт та предмет дослідження, сформовані завдання та зазначені методи, які використовувались у роботі, вказано у чому полягає новизна отриманих результатів, їх практичне значення. Наведено особистий внесок дисертанта та конференції, на яких було апробовані результати роботи.

Розділ 1 присвячений аналізу літератури та складається із 5 пунктів, у яких розглянуто питання, що безпосередньо стосуються теми кваліфікаційної роботи. Зокрема, наведено характеристику системи біотрансформації ксенобіотиків, розглянуті поняття «вітаміну А» та «ретиноїдів». Розкрито роль цих сполук у процесах регуляції активності цитохромів – основних детоксикуючих ензимів, та участь останніх у

метаболізмі ретиноєвої кислоти – основної транскрипційно-активної форми вищезазначеного мікронутрієнта, та проаналізовано результати науковців, щодо можливої ролі вітаміну А як модулятора гепатопатологічних процесів. У двох останніх підрозділах наведено загальну характеристику бісфенолу А, його класичних токсичних ефектів як ксеноестрогена, та розкрито особливості його метаболізму.

У розділі 2 наведені усі методи досліджень, що використовувались для досягнення мети роботи. Детально описана модель експерименту, методики визначення маркерних ензиматичних активностей, концентрацій метаболітів та продуктів пошкодження біомолекул, схема виділення пробіотичних високоактивних культур щодо бісфенолу А та схема корекції ними процесів гепатотоксичності.

У 3 розділі, який складається із 3 підрозділів, зазначені усі результати дослідження. Спочатку наведені результати щодо дії бісфенолу А, як обезогену, за умов різної забезпеченості ретиноїдами. У п. 3.2. описані результати щодо особливостей розвитку процесів гепатотоксичності, викликані введенням бісфенолу А, його детоксикації, стану прооксидантної та антиоксидантної систем, ступеню оксидативного пошкодження окремих субклітинних фракції печінки тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, відсутністю ендогенних запасів вітаміну А та стану гіпервітамінозу. В останньому підрозділі наведено результати щодо корекції ВРА-гепатотоксичних ефектів пробіотичними культурами роду *Lactobacillus*, виділені з фекального біоптату інтактних тварин та тих, які отримували ксенобіотик.

Практичне значення отриманих результатів. У дисертаційній роботі встановлено молекулярні механізми залучення ретиноїдів у процесі функціонування детоксикаційної системи, що дозволить розробити нові підходи у корекції токсичного ураження печінки. Крім того, розроблений спосіб превентивної корекції бісфенол А-індукованого оксидативного

пошкодження біомолекул печінки пробіотичними культурами, виділених із фекального біоптату тварин, які зазнавали оксидативного ураження печінки при введенні бісфенолу А.

Результати роботи впроваджені у навчальний процес в курсах спеціальних дисциплін «Біохімія есенціальних нутрієнтів», «Цитотоксичний скринінг» в Інституті біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тема дисертаційної роботи відповідає науковій тематиці кафедри біохімії та біотехнології в рамках кафедральної теми: «Біохімічні механізми метаболічної адаптації про- та еукаріот як основа для розробки біологічних технологій» (номер державної реєстрації 0116U006151, 2016 – 2020 рр.) держбюджетної теми «Біохімічні аспекти респонсивної інтеграції метаболізму есенціальних нутрієнтів» (номер державної реєстрації 0115U003231, 2015 – 2017 рр.) та «Біохімічні та лазерно-поляриметричні параметри комплексного прогнозування метаболічних порушень» (номер державної реєстрації 0119U100717, 2019 – 2021 рр.).

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ДЕТОКСИКАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ ПЕЧІНКИ

1.1.1. Ензиматичні системи I фази біотрансформації ксенобіотиків

Біотрансформація ксенобіотиків – це процес перетворення ліпофільних сполук, які швидко абсорбуються з шлунково-кишкового тракту на гідрофільні (водорозчинні) та екскретуються в сечу чи жовч і виводяться із організму. Основним органом, де відбувається біотрансформація різноманітних ксенобіотиків є печінка, що активно бере участь у метаболізмі та детоксикації як ендогенних, так і різноманітних екзогенних сполук [7, 17].

Детоксикаційна система печінки представлена ензиматичними реакціями 3 фаз: I – окиснення, II – кон'югація, III – активний транспорт [17]. До реакцій I фази належать реакції перетворення вихідних ліпофільних сполук до більш полярних метаболітів шляхом гідролізу, відновлення, окиснення чи утворення *de novo* функціональних груп (наприклад: -ОН, -NH₂, -SH чи -COOH). Ці реакції включають *N*- та *O*-деалкілування, аліфатичне та ароматичне гідроксилування, *N*- і *S*-окиснення, та деамінування. До основних ензимів даної фази клітинної системи біотрансформації належать: цитохром P450 (EC 1.14., CYP), флавінові монооксигенази (EC 1.14.13.8, FMO), ксантиноксидоредуктаза (EC 1.1. XOR) та епоксид гідролаза (EC 3.3.2.9.) [7, 18].

CYPs. Ензимами першої фази, які використовуються організмом для біотрансформації різноманітних контамінантів, стероїдних гормонів і фармацевтичних препаратів, є надродина ензимів цитохрому P450. CYP – це гемопротеїни, які складаються з одного поліпептидного ланцюга, довжиною 400–550 амінокислотних залишків та є високо універсальними окисно-відновними ензимами, що метаболізують широкий спектр субстратів шляхом складних метаболічних перетворень. Основна функція даних ензимів –

окиснення субстратів за допомогою O_2 , до гідроксильованих продуктів. Для проходження монооксигеназних реакцій необхідні два електрони, які зазвичай переносяться на СYP від протеїну партнера, роль якого найчастіше відіграють феридоксин (залізо-сірчаний протеїн) чи флавопротеїни [19, 20].

Система СYP та його партнерів також відома як мікросомальна монооксигеназна система, локалізована на ендоплазматичному ретикулумі в більшості тваринних тканинах та містить 2 ензими – СYP оксидоредуктазу та власне СYP. Дана система метаболізує широку різноманітність субстратів, оскільки складається з різних СYP форм, що відрізняються субстратною специфічністю. На сьогодні виявлено 57 генів СYP у людини і 103 у мишей, ідентифікованих шляхом секвенування геному [5]. Основними ізоформами, важливими для метаболізму ксенобіотиків, є СYP1A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 та 3A4 [21], серед яких 60% усіх СYP в печінці припадає на СYP3A4, що знешкоджує 70% усіх ксенобіотиків [7, 17].

ФМО. Дані FAD-вмісні монооксигенази діють як електрофільні оксигенуючі каталізатори, які відрізняються цим від більшості інших флавінових оксидаз і монооксигеназ. Вони складаються з двох висококонсервативних, збагачених гліцином динуклеотид-зв'язуючих доменів, 1 з яких зв'язує 1 молекулу FAD біля активного центру ензиму, до якого приєднується 2 домен, що зв'язує NADPH, є донором електронів [7, 22]. Мікросомальні FMOs функціонують як сульфур, нітроген, фосфор та селенові оксигенази, та можуть каталізувати тотожні реакції, що каталізують СYP [22].

Флавінові монооксигенази метаболізують широкий спектр субстратів, що містять атоми нітрогену (третинні аміни до N-оксидів, вторинні аміни до гідроксил амінів, первинні аміни до гідроксиламінів), сульфур чи фосфору (тіоли, тіоестери та тіокарбамати до S- та P-оксидів), включаючи терапевтичні агенти, різноманітні контамінанти та ендогенні сполуки [7, 23].

Під час окиснення FMO деяких сульфур-вмісних ксенобіотиків (тіоли, тіоаміди, 2-меркаптоїмідазоли, тіокарбамати і тіокарбаміди) можуть утворюватись електрофільні реактивні інтермедіати, хоча вони не інактивують FMO, але можуть ковалентно зв'язуватись і інактивувати інші протеїни, в тому числі і CYP. Причому, деякі з таких ксенобіотиків є субстратами для останніх, проте їхня оксигенація до електрофільних метаболітів призводить до інактивації ензиму, процесу відомого як метаболізм-залежне інгібування або «суїцидальна інактивація» [7].

XOR. Даний ензим належить до родини молібденових гідролаз, які містять дві ідентичні ~150 kDa субодиниці, кожна з яких містить FAD, атом Мо у формі птеринмолібденового кофактору та 2 залізо-сірчані кластери. Ксантиндегідрогеназа (XD) і ксантиноксидаза (XO) – це дві форми ксантиноксидоредуктази, що відрізняються акцептором електронів на фінальному етапі каталізу: у випадку XD – це NAD⁺ (дегідрогеназна активність), а для XO – кисень (оксидазна активність), результатом чого є утворення супероксид аніон радикалу та гідроген пероксиду. Конвертація XD форми в XO відбувається через окиснення цистеїнових залишків (Cys₉₉₃ та Cys₁₃₂₆ ензиму у людини) і/чи протеолітичного розщеплення та є зворотнім процесом [7, 22, 24].

Типовими реакціями, що каталізує XOR, є перший етап елімінації деяких пуринових дериватів, хемотерапевтичних агентів та важливі фізіологічні реакції, зокрема перетворення гіпоксантину до ксантину та сечової кислоти [7].

Таким чином, утворені ензимами I фази гідрофільні метаболіти далі підлягають дії кон'югуючих ензимів II фази.

1.1.2. Кон'югуючі трансферази II фази клітинної системи біотрансформації

Реакції II фази представлені реакціями кон'югації, а саме сульфування, метилювання та глюкуронування, які спрямовані на підвищення розчинності окиснених метаболітів [17].

Метаболізуючі ензими II фази детоксикації представлені: UDP-глюкуронозилтрансферазою (EC 2.4.1.17, UGT), сульфотрансферазою (EC 2.8.2.1, SULT), N-ацетилтрансферазою (EC 2.3), глутатіон S-трансферазою (EC 2.5.1.18, GST) та різними метилтрансферазами (EC 2.1) [18].

UGTs. Утворення глюкуронідних кон'югатів – це найважливіший метаболічний шлях II фази. Приблизно 40–70% всіх клінічних препаратів підлягають біотрансформації за допомогою цих ензимів [18]. UGTs є родиною мембранно-зв'язаних ензимів, що каталізують утворення хімічних зв'язків між нуклеофільними O-, N-, S-, чи C-атомами з уридин-5'-дифосфо- α -D-глюкуроною кислотою. Ця реакція призводить до утворення відповідних β -D-глюкуронів, які в подальшому легко виводяться з жовчю або сечею. Домінуючою реакцією є утворення O-зв'язаних глюкуронідів шляхом кон'югації уридин-5'-дифосфо- α -D-глюкуроною кислотою з аліфатичними спиртами, фенолами, карбоновими кислотами, тіолами та амінами [18, 25].

На даний час відомо, що до суперродини UGT ензимів у ссавців належить 117 представників. У людини ідентифіковано чотири родини UGT: UGT1, UGT2, UGT3 і UGT8. Основними ізоформами UGT, які залучені до метаболізму ксенобіотиків, вважаються ензими UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7 та 2B15, більшість з яких широко розповсюджені по всіх органах, але основне місце їх локалізації – печінка. Окремі UGT ізоформи, зокрема UGT1A7, 1A8 і 1A10, експресуються, головним чином, у шлунково-кишковому тракті та мають особливе значення на першому етапі метаболізму харчових контамінантів та лікарських препаратів [18].

SULTs. Сульфотрансферази є великою родиною ензимів, які каталізують транспорт сульфурильної групи з універсального донора - 3'-фосфоаденозин 5'-фосфосульфату, що синтезується всіма тканинами організму, на O-, N- або S-акцепторну групу ендogenous чи екзогенних сполук. Домінуючою клітинною реакцією є O-сульфування, водночас N-сульфування є ключовою реакцією в модифікації вуглеводневих ланцюгів в макромолекулах, таких як гепарин і гепарансульфат, та залучене до метаболізму ксенобіотиків, таких як хінолони і амінопрепарати [18, 26].

SULTs поширені по всьому організму (дані ензими ідентифіковані в печінці, мозку, молочній залозі, кишечнику, тонкій кишці, легенях, наднирниках, нирках, простаті, яєчках, яєчниках) проте найвищий рівень її експресії (крім SULT1A3) зафіксований саме в печінці [18].

SULTs здатні перетворювати широкий спектр субстратів, в тому числі феноли, первинні та вторинні спирти, N-гідроксиламіни, N-гідроксигетероциклічні аміни, бензилові спирти поліциклічних ароматичних вуглеводів, фенольні та аліциклічні гідроксистероїди та йодотироніни. Така широка субстратна специфічність, в першу чергу, пов'язана з існуванням багатьох форм цих ензимів та пластичністю сайтів зв'язування деяких ізоформ [27].

На сьогодні виявлено два широких класи сульфотрансфераз: мембранно-зв'язані SULT, локалізовані в апараті Гольджі і відповідають за сульфування пептидів, протеїнів, ліпідів, глікозаміногліканів та цитозольні SULT, які каталізують сульфування ксенобіотиків і невеликих ендogenous субстратів, таких як стероїди, жовчеві кислоти та нейротрансмітери [18, 27].

GSTs. Це – родина ензимів, які беруть участь у метаболізмі ксенобіотиків і відіграють важливу роль у захисті клітин від оксидативного стресу. GSTs – це родина ензимів, які каталізують утворення тіоефірних кон'югатів між глутатіоном і ксенобіотиками. Дані ензими можуть каталізувати велику кількість реакцій, зокрема нуклеофільне ароматичне заміщення, реакції

Міхаеля (нуклеофільне додавання карбаніона або іншого нуклеофіла до α , β -ненасиченої карбонільної сполуки), реакції ізомеризації та відновлення гідропероксидів, кон'югацію багатьох гідрофобних і електрофільних сполук із відновленим глутатіоном [7, 18].

GSTs відіграють важливу роль у детоксикації епоксидів, отриманих з поліциклічних ароматичних вуглеводнів і α - β -ненасичених кетонів, та метаболізмі простагландинів і стероїдів. Дані ензими розповсюджені по всьому організму в печінці, нирках, мозку, підшлунковій залозі, яєчках, в серці, легеннях, тонкому кишечнику, скелетних м'язах, простаті та селезінці [18].

Описано дві окремих підродини GST: одна з них включає цитозольні, розчинні димерні ензими, які беруть участь у біотрансформації токсичних ксенобіотиків і ендобіотиків, інша – мікросомальні тримерні ензими, відомі як мембранно-асоційовані протеїни в метаболізмі ейкозаноїдів та глутатіону (MAPEG), що в першу чергу залучені в метаболізм арахідонової кислоти. На основі первинної структури цитозольна GST підродина містить щонайменше 16 генів, що поділяються на вісім окремих класів позначених α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), θ (GSTT), T(GSTZ), σ (GSTS), ω (GSTO) та κ (GSTK), кожна з яких містить один або декілька гомодимерних чи гетеродимерних ізоформ [7].

Утворені водорозчинні кон'югати ксенобіотиків секретуються через транспортери III фази, розташовані на мембранах гепатоцитів, ентероцитів, нефронів та інших клітин.

1.1.3. Мембранні транспортери III фази детоксикаційної системи печінки

Мембранні транспортери ксенобіотиків визнані як ключові учасники процесів абсорбції, метаболізму, елімінації ендо- і екзосполук та контролюють доступ до цих сполук метаболізуючих ензимів клітинної

системи біотрансформації. У людини і тварини вони найбільш експресуються в печінці, проте також наявні в позапечінкових тканинах, таких як нирки, наднирники і легені [28–30].

Транспортери, залучені до поглинання ксенобіотиків, є членами надродини транспортерів розчинених речовин, які розташовані на синусоїдальній (базолатеральній) плазматичній мембрані. Пізніше цей процес поглинання був названий "0 фазою" біотрансформації [29]. Члени цієї суперродини, як правило, переносять органічні аніони типу I, катіони і цвіттеріони [28, 29].

В свою чергу, транспортери, відповідальні за екскрецію лікарських препаратів і метаболітів ксенобіотиків з гепатоцитів, належать до суперродини АТФ-зв'язувальних касетних транспортерів (ABC) і розташовані на біліарній апікальній плазматичній мембрані для виведення лікарських речовин в жовч, або на синусоїдальній мембрані, де вони опосередковують їх витік назад в кровоплин. Члени цієї надродини використовують АТФ як джерело енергії для викачування субстратів проти градієнта концентрації та складаються з 4 доменів: 2 нуклеотидозв'язувальні та 2 трансмембранні домени. Перші – зв'язують та гідролізують АТФ, в той час як другі – впізнають та транспортують субстрат [28, 29, 31, 32]

На сьогодні відомі 48 ABC транспортерів, які поділені на 7 підродин (A – G), серед яких до транспорту ендо- та ксенобіотиків залучені 20 членів, зокрема Р-глікопротеїн (Pgp, ABCB1), експортна помпа жовчевих кислот (BSEP, ABCB11), споріднений білок множинної лікарської резистентності (MRP1-6, ABCC1-6), білок множинної лікарської резистентності (MDR3, ABCB4) та білок резистентності до раку молочної залози (BCRP, ABCG2) [28, 29].

1.2. РЕТИНОЇДИ ТА РЕТИНОЇД-ЗАЛЕЖНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ ДЕТОКСИКАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ

1.2.1. Поняття «вітаміну А» та «ретиноїдів»

Термін «вітамін А» (VA) відноситься до групи сполук – ретиноїдів, що включає ретинол (вітамін A₁, ROL) і сполуки з схожою структурою з біологічними характеристиками ретинолу [33]. Термін «ретиноїди», який запроваджений у 1976 році *Sporn et al.*, Міжнародним союзом фундаментальної та прикладної хімії – Міжнародної спілки біохіміків (IUPAC-IUB), визначений як "сполуки, що складаються з чотирьох ізопреноїдних одиниць, з'єднаних у формі голова-до-хвоста; всі ретиноїди можуть бути формально отримані з моноциклічної первинної сполуки, що містить п'ять подвійних зв'язків С-С та функціональну термінальну групу на кінці ациклічної частини." За цим визначенням ретиноїди об'єднують як природні, так і синтетичні сполуки, що мають структурну схожість з повністю-*транс*-ретинолом, з/без біологічної активності вітаміну [34, 35].

В організмі людини наявні різні форми ретиноїдів, які генеруються шляхом модифікацій термінальних полярних груп в молекулі. ROL є транспортною формою, при додаванні ацильної групи до гідроксильної групи останнього формується ефір ретинолу – форма зберігання VA. Ретиналь відіграє роль в процесі забезпечення зору очак², де 11-*цис*-ретиналь необхідний для формування зорового пігменту. Ретиноєва кислота (RA) відіграє унікальну роль в онтогенезі та гомеостазі багатьох клітинних систем ссавців. Біологічні ефекти RA опосередковуються шляхом зв'язування з двома класами ядерних рецепторів – рецептором ретиноєвої кислоти (RAR (α, β, γ)) і ретиноїд X рецептором (RXR (α, β, γ)). RAR:RXR гетеродимери контролюють експресію типових генів мішеней ретиноїдів, проте RXR є обов'язковим гетеродимерним партнером для багатьох інших ядерних рецепторів, в тому числі PPAR, VDR, ThR, FXR, LXR, що вважаються ключовими транскрипційними сенсорами нутрієнтів і метаболітів [36, 37].

1.2.2. Вплив ретиноїдів на активність біотрансформуючих ензимів

Оскільки гідроксилування ксенобіотиків ензимами I фази детоксикації у печінці може призводити до утворення більш токсичних метаболітів, то підвищення активності даних ензимів може супроводжуватись метаболічною активацією пре-канцерогенів і препаратів, які можуть здійснювати токсичний або канцерогенний ефект [17, 21]. Тому регуляція активностей біотрансформуючих ензимів є одним із шляхів контролю процесів активації ксенобіотиків.

Окремі ксенобіотикобіотрансформуючі ензими є індукцйбельними, тобто їх експресія може підвищуватися, зазвичай, у відповідь на експозицію високих концентрацій ксенобіотиків. Таке індукування здійснюється на транскрипційному рівні та опосередковане ліганд-активуючими рецепторами (ксеносенсори), що активуються ксенобіотиками (лігандами) та посилено регулюють транскрипцію різноманітних генів, які кодують ксенобіотикометаболізуючі ензими, зокрема CYP [7, 21]. Ключовими сенсорами для ксенобіотиків виступають: арилгідрокарбоний рецептор (AhR), що індукує CYP1A1, 1A2 і 2S1 ензими, конститутивний андростановий рецептор (CAR), прегнановий X рецептор (PXR), які індукують цитохроми родин CYP2B6, 2C9, 3A4 і CYP2C9, 3A4, та α -рецептор активований проліфератором пероксисом (PPAR α), що індукує цитохроми родини CYP4 [7, 21, 38].

На сьогодні встановлена однозначність ролі ретиноїдів в індукції CYP. Рецептори даних сполук відіграють важливу роль у сигналінгу ядерних рецепторів та виступають партнерами для основних ксеносенсорів: CAR – RXR α , PXR – RXR α , PPAR α – RXR α [7–10].

Нещодавно встановлено, що експресія CYP26 регулюється RA. *Miranda et al.* продемонстрували, що внаслідок 7-тижневої ROL-дефіцитної дієти, спостерігається зниження каталітичної активності CYP2E1 і CYP3A. *Siddik et al.* продемонстрували значне зниження загального вмісту CYP за умов 8-

тижневої депривації ROL. Інші дослідження також демонструють, що рівень CYP2C7 може регулюватися концентрацією RA. Зокрема, за умов культивування гепатоцитів у VA-дефіцитному середовищі спостерігається значне зниження експресії CYP2C7 та відновлення його рівня при введенні RA [36, 39]. Крім того, показано, що рекомбінантні та частково очищені CYP2C9 у мишей (гомологічний щурам CYP2C7) регулюються *in vivo* арильним вуглеводневим рецептором та TCDD, а також проявляють активність RA-4-гідроксилази. Таким чином, різні RA-регульовані або RA-каталізуючі CYP активності потенційно можуть брати участь у ретиноїдному гомеостазі [36].

Оскільки, як дефіцит RA, так і їх надлишок мають негативні наслідки, у організмів існують механізми зворотного зв'язку для контролю рівня ретиноїдів. Отже, тканинні рівні RA відображають баланс між її біосинтезом та інактивацією, яка відбувається переважно за дії цитохромів родини CYP26, до якої належать 3 ізоформи: 26A1, B1 та C1 [40–43].

Дані CYP є основними RA гідроксилазами та здатні конвертувати цей вид ретиноїдів до первинних окиснених продуктів: 4-OH, 4-окси, 18-OH- та 16-OH-RA й більш полярних вторинних метаболітів, в тому числі діюли і 4-оксо-спирти. Рівні експресії даних ензимів корелюють з харчовим поглинанням VA. Окиснені метаболіти RA, в тому числі 4-OH-RA, 4-оксо-RA, 18-OH-RA і RA-5,6-епоксид проявляють біологічну активність та інгібують клітинну проліферацію в *in vitro* моделях. Таким чином, хоча очікується, що інгібування ферментів CYP26 призведе до підвищення концентрації ATRA, одночасне зниження концентрації її метаболітів може потенційно зменшити чистий фармакологічний ефект інгібування CYP26 [42–45].

Інші ізоформи CYP, які можуть сприяти метаболізму RA, включають CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 3A4-7 і 4A11 [36]. Зокрема 1A2 і 3A6 каталізують перетворення ретиналю до RA, а 2B1 та 2C8 метаболізують останню до більш полярних продуктів, в основному до 4-OH-RA, яка може додатково

окислюватись до 4-оксо-РА. Також встановлено, що 2С9, 2С22, 2С39, 2Е1, 2S1 та 3А4 залучені до метаболізму ретиноєвої кислоти *in vitro* [36, 42].

Хоча роль СYP2С та 3А у печінковому кліренсі РА може бути меншою, ніж 2ВА1, дані СYP можуть мати вплив на метаболізм РА. Оскільки ізоформи СYP2С та 3А мають, очевидно, більш широку специфічність в метаболізмі ксенобіотиків, важливим питанням є те, чи може одночасне застосування РА під час терапії з деякими препаратами викликати певний тип ксенобіотик-РА взаємодій. Зокрема, СYP2С8 бере участь у біотрансформації декількох широко використовуваних препаратів, таких як таксол, толбутамід та варфарин, а РА виявився потужним інгібітором цієї реакції. Підродина СYP3А бере участь у біотрансформації тамоксифену, поширеного протипухлинного препарату. Ізоензими СYP3А високо індуковані РА, що може викликати посилений катаболізм препарату [42].

Таким чином, РА-регулююча або РА-каталізуюча СYP активність потенційно може відігравати роль в підтриманні ретиноїдного гомеостазу.

1.2.3. Модуляція ретиноїдами індукованої ксенобіотиками гепатотоксичності

Біотрансформація ксенобіотиків може змінити біологічні властивості даних сполук, тобто вони можуть втратити фармакологічну активність, вона може не змінитись або підвищитись. В переважній більшості токсичність ксенобіотиків зумовлена вихідною сполукою (та сполука яка абсорбувалась). У такому випадку біотрансформація відіграє роль детоксикуючого механізму. Проте, ксенобіотикотрансформуючі ензими можуть конвертувати численні токсини у реактивні (електрофільні) метаболіти, і цей процес активації відіграє важливу роль у токсичності та мутагенності/канцерогенності хімічних сполук. Тому баланс між активацією та детоксикацією ксенобіотиків біотрансформуючими ензимами часто є ключовою детермінантою їх токсичності. Оскільки більш токсичні

інтермедіати здатні слугувати тригерами патологічних змін, а печінка виступає основним метаболічним і детоксикуючим органом, що першим контактує і знешкоджує ксенобіотики, то вона в першу чергу підлягає дії даних реакційно-здатних інтермедіатів [7, 46–48].

Гостре пошкодження печінки ініціює регенеративну відповідь, що призводить до відновлення органу та повернення його до нормального функціонування. Одним з елементів каскаду процесів, спрямованих на відновлення ураженої паренхіми печінки, виявляється активація стелатних клітин печінки, що є непаренхімними клітинами та основним депо VA, що зберігається у формі ефірів ретинолу у вигляді цитоплазматичних ліпідних крапель. Морфологічно це проявляється у зміні ліпоцитного фенотипу на міофібробластний, основною ознакою чого служить втрата запасів VA. Водночас надмірне споживання ретиноїдів призводить до ураження печінки та розвитку фіброзу, що теж супроводжується переходом стелатних клітин печінки в активований фіброгенний стан та повною втратою ними ліпідних крапель [49, 50].

З поглибленням патологічного ураження печінки надзвичайно різко знижується рівень ретиноїдів не лише в самій паренхімі органу, але й у біологічних рідинах організму [14]. Проте, спроба поповнити запаси ретиноїдів, як засіб мінімізації ураження тканини печінки, як правило, не була успішною. Більшість спроб, що були проведені з використанням ксенобіотик-індукованої моделі токсичного ураження печінки, не призвели до відновленого гомеостазу ретиноїдів і часто супроводжувалось потенціюванням ксенобіотичної токсичності. У дослідженнях CCl₄-індукованого пошкодження печінки [51, 52] попередня терапія щурів відносно великими (фармакологічними) дозами ROL до ксенобіотичного впливу потенціювала пошкодження печінки. Ідентичний висновок був досягнутий, коли тваринам для індукції гепатотоксичності вводили [39, 53, 54] алліловий спирт, ацетамінофен або галактозамін. Дослідження, у яких

щурі перебували на дієті, що містила високий рівень ретинолу (щоденна доза становила 250 000 МО/кг маси тіла) протягом різних періодів часу до одноразового введення CCl_4 показали, що введення ксенобіотика не залежно від часу отримання VA призводило до розвитку гепатотоксичності. Хоча було встановлено, що введення ретинолу підвищує його концентрації в печінці, лінійна кореляція між концентраціями пальмітату ретинолу та ступенем CCl_4 гепатотоксичності не спостерігається. Також встановлено, що ROL потенціює гепатотоксичність навіть мінімально токсичних доз ацетамінофену, алілового спирту та ендотоксину. Оскільки кожен із цих агентів індукував пошкодження печінки за допомогою різних механізмів, зроблено висновок, що ROL потенціює пошкодження печінки шляхом зміни спільного процесу, необхідного для прогресування гепатоцелюлярного ураження [55].

1.3. МЕТАБОЛІЗМ БІСФЕНОЛУ А У ПЕЧІНЦІ

1.3.1. Структурно-функціональна характеристика бісфенолу А.

Бісфенол А (бісфенол, 2,2-біс(4-гідроксифеніл)пропан; $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$, ВРА) являє собою органічну ліпофільну сполуку, з молекулярною масою – 228 Да, що складається з двох фенольних кілець з'єднаних метильним містком, до якого приєднані дві метильні функціональні групи (рис. 1.1) [56, 57].

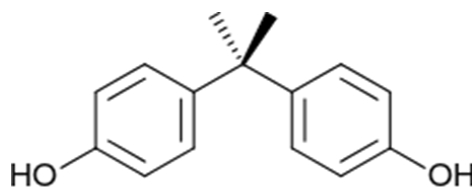


Рис. 1.1 Хімічна структура бісфенолу А

Дана сполука є синтетичним персистентним контамінантом, що виступає мономером у виробництві полікарбонатних, поліакрилових,

поліестерових пластиків, епоксидних та фенольних смол, фунгіцидів, ретардантів, барвників, зв'язуючих матеріалів, стоматологічних пломб та герметиків для забезпечення прозорості, пластичності, ударостійкості та міцності [2, 4, 57–59]. Крім того ВРА використовується як добавка для антипіренів та гальмівних рідин [56].

ВРА був вперше відкритий російським хіміком *Aleksandr Dianin* в 1891 і синтезований *Zincke* в 1905 шляхом конденсації ацетону з двома фенольними кільцями. Проте інтерес до його фізіологічних та токсологічних наслідків впливу виник згодом, у 1930 – коли і були вперше ідентифіковані естрогенні властивості ВРА [60, 61].

Даний ксенобіотик є однією з найбільш широко використовуваних синтетичних сполук на планеті. До 1970 виробництво ВРА в США досягло півмільярда фунтів. Проте на сьогодні, за даними [62] >8 більйонів (1 більйон – 10^{12}) фунтів (~4 мільярди тон) ВРА виробляється щорічно і ~100 тон вивільняється в атмосферу кожного року [60].

Ефірні зв'язки, якими з'єднані між собою мономерні молекули ВРА, нестабільні, та піддаються гідролізу, який пришвидшується зі зростанням температури в кислому або лужному середовищі. Тому основною небезпекою є те, що ВРА здатний потрапляти зі споживчих товарів, які виробляються з використанням даного контамінанту в повітря, воду та їжу [61, 63, 64]. Таким чином внаслідок багаторазового промивання (з використанням миючих засобів) чи під впливом тепла, полікарбонатних продуктів відбувається значне вилуговування ВРА. Крім того, експозиція даним контамінантом відбувається і через шкіру, при контакті з термопапером, який використовується у виробництві квитанцій касових апаратів. А, оскільки, попит на ВРА-вмісні споживчі товари постійно зростає, існує потенційна можливість безперервного впливу низьких доз даного ксенобіотика на організм, що викликає занепокоєння у науковців всього світу [56, 63, 65, 66].

1.3.2. Трансферазний шлях метаболізму бісфенолу А

Метаболізм ВРА, в основному, здійснюється ензимами кон'югації II фази детоксикаційної системи печінки. У людей та щурів поширенішим метаболітом є моноглюкуронідний кон'югат, який становить понад 90% усіх інтермедіатів ВРА [67].

Кон'югація з глюкуроновою кислотою являє собою основний шлях детоксикації, оскільки, глюкуроніди, на відміну від вільного ВРА, не володіють естрогенними властивостями. Серед низки ізоформ UGT, які беруть участь у глюкуронізації ВРА (UGT1A1, 1A3, 1A9, 2B4, 2B7 і 2B15), найвищою активністю по відношенню до ВРА володіє UGT2B15, що було встановлено у системі *in vitro* з використанням мікросом печінки людини та рекомбінантних UGTs. У печінці щурів основною ізоформою UGT, відповідальною за глюкуронування ВРА виступає UGT2B1, яка є гомологічною до UGT2B7/B17 [67].

До метаболізму ВРА також залучаються SULT та GST, за дії яких утворюються мінорні метаболіти даного ксенобіотика: ВРА-сульфат та глутатіоновий кон'югат ВРА [52, 65]. Серед SULT детоксикація ВРА здійснюється простою фенольною (P)- формою сульфотрансферази (SULT1A1) та термостабільною фенол сульфотрансферазою (SULT1A3) [52, 64].

Утворені кон'югати ВРА виводяться з гепатоцитів шляхом активного транспорту за участі ABC транспортерів III фази детоксикаційної системи печінки. Дослідженнями *Mazur et al.* встановлено, що найвищою афінністю зв'язування з кон'югованими метаболітами ВРА володіють MRP2 (у щура) і MRP3 (у людини) транспортери [68].

1.3.3. Оксигеназний шлях метаболізму бісфенолу А

За умов надлишкової експозиції ВРА, даний контамінант може підлягати метаболічній активації у мікросомах печінки, основному джерелі

ензимів I фази біотрансформації [67]. Це доведено *Yoshihara et al.*, які використовуючи інгібітор CYP SKF 525-A, інгібували цей метаболічний шлях і, таким чином, встановили участь даних ензимів у метаболізмі ВРА [69].

Даний контамінант метаболізується у печінці переважно за дії цитохромів підродина CYP2C, серед яких найбільшою ефективністю володіють CYP2C18, 2C19 та 2C9. Проте у процесах детоксикації ВРА також можуть брати участь CYP1A1, 2B6, та 2C8 ізоформи, але вони володіють значно нижчою активністю, ніж вищезазначені ензими [70].

У дослідженнях *Atkinson and Roy* встановлено, що CYP-ензиматична система може метаболізувати ВРА до його реакційно-здатних метаболітів [57, 61]. У реакціях гідроксилування утворюються гідроксильовані похідні даного контамінанту, зокрема орто-гідроксильований ВРА (*o*-ОН-ВРА) [71]. Даний інтермедіат в подальшому окислюється до орто-хінону ВРА (ВРА 3,4-хінон), який ковалентно зв'язується з глутатіоном та виводиться з організму [71]. Іншим продуктом CYP-опосередкованого метаболізму ВРА є хіноловий проміжний інтермедіат, що утворюється в результаті реакції *ipso*-додавання. Утворена сполука є дуже нестійкою та швидко перетворюється на карбокатионний проміжний продукт (*ipso*-заміщення), який виводиться з організму у вигляді кон'югату з глутатіоном. Окрім того, даний кон'югований метаболіт може утворюватись через проміжну сполуку арен епоксидного інтермедіату, його комплексу з глутатіоном та наступним виведенням H₂O (реароматизація кільця) [71].

1.4. ТОКСИЧНІ ЕФЕКТИ БІСФЕНОЛУ А

1.4.1. Класичні токсичні ефекти бісфенолу А як ксеноестрогена

На сьогодні ВРА вважається класичним ксеноестрогеном через його здатність проявляти естрогенподібну активність. Це, насамперед, зумовлено його структурною подібністю із 17- β естрадіолом (два фенольних кільця

(імітують А- і D-кільця естрогену) та два (4, 40) -ОН замісники, які надають можливість приєднатися до ER-зв'язуючої структури) (рис. 1.2) та здатністю зв'язуватись з ядерними естрогеновими рецепторами (ER): класичними (ER α та ER β) та неklasичними мембранними естрогеновими рецепторами (ER γ), 7 трансмембранними G-білок-спряженими рецепторами 30 (GPR30). Залежно від тканини-мішені, ВРА може імітувати, посилювати або інгібувати дії ендogenous естрогену [1–3, 66, 72].

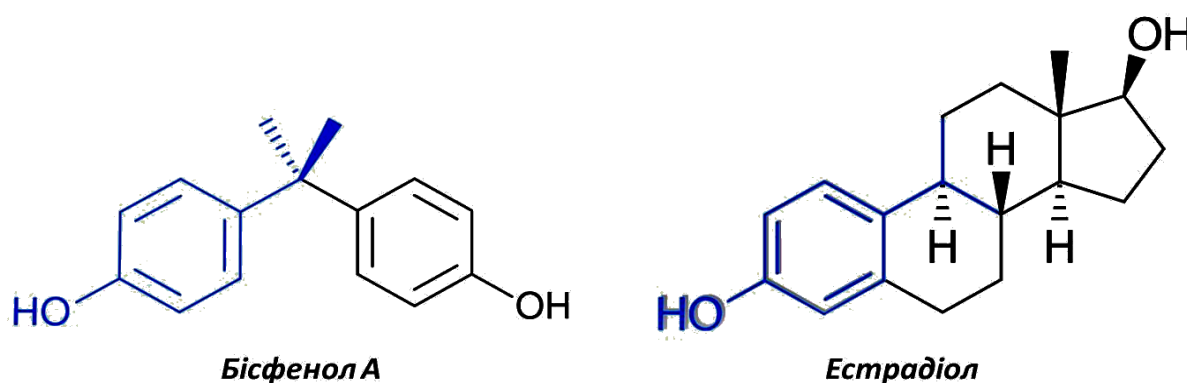


Рис. 1.2. Структурна подібність ВРА та естрадіолу

Примітка: синім кольором відображена схожість у структурі ВРА та естрогену

Як один із класичних ендокринних пошкоджуючих чинників, ВРА діє як метаболічний деструктор, викликає репродуктивну й ембріональну токсичність та може порушувати природний гормональний баланс у чоловіків і жінок. Зокрема, ВРА відіграє роль у патогенезі декількох ендокринних порушень, в тому числі безпліддя жінок та чоловіків, передчасне статеве дозрівання, гормонозалежні пухлини, такі як рак молочної залози, передміхурової залози та кілька метаболічних порушень, в тому числі синдром полікістозу яєчників [73]. Окрім того, даний контамінант володіє й антиандрогенними ефектами, впливаючи на нормальну репродуктивну функцію та організацію нейроендокринних ланцюгів, які координують специфіку статевої фізіології та поведінки [56, 74–76].

1.4.2. Бісфенол А як індуктор гепатотоксичності

На сьогодні, все більшу увагу привертають дослідження токсичного впливу ВРА на печінку. Були проведені два великі мультигенераційні дослідження на щурах і мишах, які полягали в харчовому введенні ВРА у широкому діапазоні доз (1 або 3 мкг/кг, до 500 чи 600 мг/кг ваги), для оцінки дозо-респонсивної залежності, та продемонстрували вплив на печінку, нирки та масу тіла у дозі 50 мг/кг ваги і вище [77].

Показано, що ВРА індукує оксидативний стрес та часткову інфільтрацію жиру й інгібує ізоформи СYP у печінці щурів. Інші експериментальні дослідження *in vivo* показали, що експозиція ВРА, за умов ембріонального розвитку, спричинює захворювання печінки, в тому числі печінковий стеатоз, пухлини печінки та метаболічний синдром. *Moon et al.* повідомили, що ВРА може посилювати експресію протизапальних цитокінів, зокрема інтерлейкін-6 (IL-6) та фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α), індукуючи пероксидацію ліпідів у печінці та погіршуючи функцію мітохондрій [63].

Іншими дослідженнями вказано, що оксидативні пошкодження можуть бути індуковані вільними радикалами, утвореними в метаболічному окисно-відновному циклі між хіноною та гідрохіноною формами ВРА. Крім того, ВРА може індукувати оксидативний стрес, порушуючи окислювально-відновний статус у клітинах. Зокрема, авторами показано, що введення ВРА не лише підвищує формування вільних радикалів, але й знижує здатність організму до детоксикації ROS. У дослідженнях продемонстровано, що в щурів, яким вводили бісфенол А, зафіксована дисфункція яєчок, пов'язана із виснаженням ензимів антиоксидантної системи та розвитком оксидативного стресу [78–80].

1.4.3. Інші токсичні ефекти бісфенолу А

Окрім класичної ядерної рецепторної геномної сигналізації, ВРА може викликати швидкі реакції в клітинах через негеномний сигналінг без участі в процесах транскрипції, завдяки активації клітинних сигнальних систем, пов'язаних з рецепторами, які не розташовані в ядрі клітини, і, натомість, можуть бути асоційовані з клітинною мембраною. Ці дії дуже швидкі, порівняно із геномною сигналізацією, опосередкованою ядерними рецепторами, які тривають довше, та дозволяють ліганду у дуже низьких концентраціях впливати на кінцеві протеїнові мішені та змінювати функції клітин [66, 81]. Показано, що за рахунок вищевказаних позаядерно-ініціюючих сигнальних метаболічних шляхів ВРА може впливати на стан ендокринної системи через зміну кіназної активності та активності іонних каналів.

Наукові дані підтверджують, що ВРА-залежна естрогенна активність посилює сигналізацію Ca^{2+} та вивільнення інсуліну β -клітинами підшлункової залози. Велика кількість клітинних досліджень продемонстрували, що ВРА модулює активність каналів K_{ATP} , що є ключовим у процесі стимуло-секретуючому зв'язуванні, який завершується секрецією інсуліну. У дослідженнях, які проводились *in vitro* на острівцях підшлункової залози, ВРА спровокував швидке закриття каналу K_{ATP} і згодом, це призводило до збільшення вивільнення інсуліну. Ця дія, в першу чергу, була опосередкована позаядерною активацією бета-рецептора естрогену (ER β). Крім того, ВРА може посилювати глюкозо-індукований біосинтез інсуліну шляхом зв'язування з поза ядерним ER α та активацією ERK/MAP метаболічних шляхів [82, 83].

Останнім часом все більшу увагу науковців привертає можлива роль ВРА у розвитку метаболічних порушень, пов'язаних з ожирінням. Дослідженнями [4, 84] показано, що експозиція ВРА (0,5, 5, 50, 500 і 5000 мкг/кг/добу) у гризунів протягом 4 тижнів, 8 та 10 місяців призводило до

порушення ліпідного метаболізму у печінці. Зокрема, тварини у даних дослідженнях страждали від ожиріння, інтолерантності до глюкози, дисліпідемії. У цих тварин також зафіксовано печінкову акумуляцію триацилгліцеролів і холестеролу після тривалого впливу ВРА. Дослідження профілю експресії генів, що пов'язані з метаболізмом ліпідів, показало, що механізми, які потенційно лежать в основі аберантного печінкового ліпідного обміну і пов'язаної з ним дисліпідемії, полягають у збільшенні синтезу жирних кислот і холестеролу, порушенні транспорту триацилгліцеролів та холестеролу, а також окисленні жирних кислот. Зокрема у тварин, яким вводили ВРА, зафіксоване зростання рівнів синтази жирних кислот, стероїл-КоА-десатурази, 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктази та сквален еоксидази. Ці дані свідчать про те, що активація синтезу жирних кислот і холестеролу може бути важливим механізмом, що лежить в основі аберантного обміну ліпідів при експозиції ВРА [84, 85].

Проте, усі дослідження, що проводяться стосовно токсичного впливу ВРА на організм людини, спрямовані в переважній більшості на з'ясування наслідків довготривалої експозиції даним контамінантом й у низьких дозах. Однак особливості впливу ВРА та молекулярні механізми його дії при надходженні до організму у високих концентраціях на сьогодні маловивчені та потребують детальних досліджень.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1.

Між ретиноїдами та ксенобіотиками існують тісні метаболічні взаємодії. В організмі перші впливають на метаболізм лікарських препаратів та контамінантів, зокрема регулюючи активність ензимів клітинної системи біотрансформації. З одного боку, індукція детоксикаційної системи за участі ретиноевої кислоти буде забезпечувати ефективну біотрансформацію ксенобіотиків, з іншого – посилення роботи системи детоксикації буде призводити до розвитку процесів гепатотоксичності, через перетворення

численних токсинів у реактивні (електрофільні) метаболіти. Зокрема, СУР-опосередкована детоксикація ВРА, персистентного контамінанта, що діє як ксеноестроген та може порушувати обмін основних біомолекул, призводить до утворення потенційно токсичних проміжних сполук, у тому числі високоефективних мета-, орто-ОН-ВРА, а також хінонових форм ВРА, які здатні індукувати внутрішньоклітинний оксидативний стрес. Водночас, і ксенобіотики впливають на метаболізм та гомеостаз ретиноїдів. Зокрема при розвитку процесів токсичного ураження печінки прогресивно втрачаються запаси вітаміну А з стелатних клітин печінки. Тому розуміння взаємозв'язків між дією ретиноїдів та ксенобіотиками є важливими для встановлення молекулярних механізмів впливу токсичних сполук та можливості його корегування.

Основні положення що стосуються ролі ретиноїдів у процесах гепатотоксичності представлені у монографії [86].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. ОБ'ЄКТ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА МОДЕЛЬ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

Досліди проводили на мишах лінії C57BL/6J (дикий тип), віком 2,5-3 місяці, масою 20-25 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 Першим Українським національним конгресом з біоетики, та з урахуванням положень, викладених у *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [87].

Бісфенол А, попередньо розчинений в кукурудзяній олії (використаної у цьому дослідженні як носій), вводили *per os* щоденно протягом 3 діб у дозі 50 мг/кг, що відповідає *LOAEL* – найнижчій дозі, при якій спостерігається несприятливий ефект (від *англ. Lowest observable adverse effect level*) [88].

Стани різної забезпеченості ретиноїдами в експерименті моделювали, використовуючи наступні методичні підходи:

- відсутність печінкових запасів VA (у формі ефірів ретинолу) моделювали, використовуючи трансгенних мишей лінії C57BL/6J, позбавлених здатності накопичувати ефіри ретинолу внаслідок нокауту гена лецитин:ретинолацилтрансферази (ЕС 2.3.1.135, LRAT), фенотипові особливості цих тварин детально охарактеризовані у літературі [37]. Тварини люб'язно надані професором У. Бленером з лабораторії біології ретиноїдів Колумбійського університету міста Нью-Йорк (США).

- стан надлишкового надходження ВА моделювали шляхом додаткового перорального введення тваринам 3000 МО ацетату ретинолу (Rac) через 12-годинні інтервали протягом 3 діб; використана доза є надвисокою фармакологічною дозою ВА, враховуючи, що фізіологічна становить 30 МО [89].

На початку експерименту тварин розділили на групи (по 5-6 тварин у кожній групі):

- група I (контрольна група I) – тварини дикого типу, яким вводили лише носій;
- група II (дослідна група I) – тварини дикого типу, яким вводили *per os* 50 мг/кг ВРА;
- група III (дослідна група II) – тварини дикого типу, яким вводили *per os* 50 мг/кг ВРА та 3000 МО Rac;
- група IV (контрольна група II) – трансгенні тварини (*Lrat^{-/-}*), яким вводили лише носій;
- група V (дослідна група III) – трансгенні тварини, яким вводили *per os* 50 мг/кг ВРА;
- група VI (дослідна група IV) – трансгенні тварини, яким вводили *per os* 50 мг/кг ВРА та 3000 МО Rac.

Біохімічну оцінку токсичного ураження ВРА проводили через 72 години після початку експерименту. Тварин піддавали анестезії під легким ефірним наркозом [90], проводили забір крові через нижню порожнисту вену та видаляли печінку. Сироватку крові отримували шляхом центрифугування при 1500 g протягом 15 хв.

2.2. ВИЗНАЧЕННЯ МАРКЕРНИХ АКТИВНОСТЕЙ, КОНЦЕНТРАЦІЙ МЕТАБОЛІТІВ ТА ПРОДУКТІВ ОКСИДАТИВНОГО ПОШКОДЖЕННЯ БІОМОЛЕКУЛ

2.2.1. Виділення та оцінка ступеня чистоти субклітинних фракцій печінки

Виділення мікросомної фракції проводили за методом [91], принцип якого полягає у тому, що мікросоми, будучи високозарядженими частинками, утворюють агрегати при додаванні іонів двовалентних металів, після чого можуть бути осаджені центрифугуванням. Гомогенізацію тканин проводили у скляному гомогенізаторі Поттера в 0,25 М розчині сахарози. Гомогенат фільтрували через чотири шари марлі та центрифугували при 12000 g протягом 15 хв. До 9 об'ємів надосадової рідини додавали 1 об'єм 80 мМ розчину хлориду кальцію та 1 об'єм 160 мМ розчину хлориду магнію у 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4). Проби перемішували протягом 10 хв при 4°C (при цьому вони значно мутніли) та центрифугували 15 хв при 9000 g при 4°C. Отриманий осад мікросомної фракції двічі промивали 0,25 М сахарозою.

Супернатант, отриманий після виділення мікросомної фракції, відбирали та використовували у дослідженнях як *постмікросомну фракцію* [91].

Мітохондріальну фракцію клітин печінки отримували методом *Kitagawa* та *Sugimoto* [92]. Для цього печінку гомогенізували у скляному гомогенізаторі Поттера в буфері, що містив 0,25 М сахарози, 1 мМ EDTA, 10 мМ трис-НСІ (рН 7,4). Отриманий тканинний гомогенат фільтрували, ядра та уламки клітин осаджували центрифугуванням (при 4°C) при 700 g протягом 10 хв. Фракцію мітохондрій із супернатанту осаджували при 10000 g (при 4°C) протягом 10 хв. Отриманий осад промивали двічі середовищем виділення без EDTA.

Чистоту кожної субклітинної фракції оцінювали шляхом визначення маркерних ензиматичних активностей різних субклітинних фракцій, як

описано в [93]. Для встановлення рівня забруднення виділеної мікросомної фракції домішками інших мембран було визначено Na^+/K^+ -АТФ-азну активність, як специфічного маркера плазматичних мембран, сукцинатдегідрогеназну активність, як специфічного маркера внутрішньої мембрани мітохондрій та глюкозо-6-фосфатазну активність, як специфічного маркера для мембран ендоплазматичного ретикулуму.

Для визначення Na^+/K^+ -АТФ-азної активності (ЕС 3.6.1.37.) до 50 мкг протеїну мікросомної чи цитозольної фракції додавали на холоді 0,5 мл 50 мМ трис-НСІ буфера (рН 7,4), що містив 0,1 М NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ EDTA, 0,5 мкМ SDS. Одна серія проб містила 0,1 мМ інгібітор Na^+/K^+ -АТФ-азної активності убаїн. Реакцію ініціювали додаванням 5 мМ АТФ, та інкубували протягом 10 хв при 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 28% ТСА (кінцева концентрація становила 10%). Кількість неорганічного фосфору, що утворився в ході ферментативної реакції, визначали методом *Fiske, Subarrow* [94]. Na^+/K^+ -АТФ-азну активність виражали в нмоль P_i /хв/мг протеїну.

Сукцинатдегідрогеназну активність (ЕС 1.2.99.1.) визначали методом, який заснований на використанні штучного акцептора електронів – фериціаніду калію [95]. Інкубаційну суміш, що містила 50 мкг протеїну мікросомної фракції, 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,8), 10 мМ сукцинату та 20 мМ EDTA, інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв. В дослідні проби додавали 2 мМ фериціаніду калію і знову інкубували протягом 10 хв при температурі 30°C. Реакцію зупиняли шляхом додавання 20% ТСА і поміщали на лід (до охолодження). В контрольні проби, які містили всі компоненти інкубаційного середовища, ТСА додавали перед суспензією мікросом. Усі проби центрифугували при 1500g протягом 15 хв. Супернатант дослідних проб спектрофотометрували при 420 нм проти контрольних. Сукцинатдегідрогеназну активність виражали в нмоль/хв/мг протеїну, враховуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Глюкозо-6-фосфатазну активність (ЕС 3.1.3.9) визначали за методом [96], принцип якого базується на реєстрації кількості звільненого неорганічного фосфату внаслідок гідролізу глюкозо-6-фосфату. Для цього до інкубаційної суміші загальним об'ємом 0,45 мл (містить 17,5 мМ гістидин, 20 мМ глюкозо-6-фосфат та 1 мМ Na-EDTA) додавали 0,05 мл цитозольної фракції. В контрольну пробу замість протеїну додавали бідистильовану воду. Дослідні проби і контроль інкубували при 37°C протягом 15хв. Реакцію зупиняли додаванням 2,5 мл 8% ТСА. Кількість неорганічного фосфору, що утворився внаслідок ферментативної реакції, визначали методом *Fiske, Subarrow* [94]. Глюкозо-6-фосфатазну активність виражали у нмоль P_i/хв/мг протеїну.

Для всіх досліджень використовували субклітинні фракції, в яких активності маркерних ензимів не перевищував 10% від загальної активності, вимірюної в гомогенаті печінки, який використовувався для виділення субклітинних фракцій.

2.2.2. Активність бісфенол А-метаболізуючих ензимів клітинної системи біотрансформації

Оцінку активності компонентів I фази детоксикації проводили на основі визначення маркерних монооксигеназних активностей: *p*-гідроксилазної, N-деметилазної та N-оксигеназної.

Визначення *p*-гідроксилазної активності CYP проводили за швидкістю NADPH-залежного *p*-гідроксилювання аніліну; утворений при цьому *p*-амінофенол виявляли у присутності Na₂CO₃, кількість якого розраховували за калібрувальним графіком, побудованим з використанням стандартних розчинів *p*-амінофенолу [97]. Інкубаційна суміш об'ємом 1 мл містила: 40 мМ трис-НСl буфер (рН 7,3), 16 мМ MgCl₂, 3 мМ NADPH і 2 мг протеїну мікросом. Реакцію індукували додаванням аніліну до 3 мМ кінцевої концентрації. В контрольні проби NADPH вносили після зупинки

реакції. Інкубацію проводили при 37°C протягом 20 хв при постійному струшуванні. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 15% ТСА та центрифугували при 3500 g протягом 10 хв. До 1 мл супернатанту додавали 0,5 мл 10% розчину Na_2CO_3 і 1,5 мл 2% розчину фенолу в 0,2 н розчині NaOH та для розвитку забарвлення витримували на водяній бані при 37°C протягом 30 хв. Вимірювали абсорбцію при $\lambda=630$ нм та виражали *p*-гідроксилазну активність у нмоль/хв/мг протеїну.

Визначення *N*-деметилазної активності проводили на основі швидкості NADPH-залежного деметилювання диметиланіліну, встановленої за кількістю утвореного формальдегіду [98]. Інкубаційна суміш об'ємом 1 мл містила: 40 мМ трис- HCl (рН 7,6), 16 мМ MgCl_2 , 3 мМ NADPH і 1,5 мг мікросомального протеїну. Реакцію індукували, додаючи диметиланілін до 6 мМ концентрації (вихідний 60 мМ розчин диметиланіліну готували на 0,05 н розчині HCl). Дослідні та контрольні (що не містили NADPH) проби інкубували при 37°C протягом 20 хв при інтенсивному струшуванні. Реакцію зупиняли додаванням 0,25 мл суміші рівних об'ємів 25% розчину ZnSO_4 та насиченого розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Для осадження білків проби центрифугували при 3500 g протягом 10 хв. Вміст формальдегіду в супернатанті визначали за допомогою кольорової реакції, яка запропонована Наш. Для цього до 0,5 мл супернатанту додавали 2 мл реактиву Наша, до складу якого входили: 2 М розчин ацетат амонію, 0,05 М розчин льодяної оцтової кислоти і 0,02 М розчин ацетилацетону. Для розвитку забарвлення проби витримували на водяній бані при 37°C протягом 45 хв, після чого вимірювали абсорбцію при $\lambda=412$ нм. *N*-деметилазну активність розраховували за калібрувальним графіком, побудованим з використанням стандартних розчинів формальдегіду та виражали у нмоль/хв/мг протеїну.

Визначення *N*-оксигеназної активності проводили на основі швидкості NADPH-залежного окиснення диметиланіліну [99], встановленої

за кількістю утвореної забарвленої сполуки *n*-нітрозодиметиланіліну. Вміст компонентів інкубаційної суміші та етапи визначення до моменту зупинки реакції такі ж, як і у випадку визначення деметилазної активності. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 0,9 н HClO_4 та центрифугували при 3500 g протягом 10 хв. До 1 мл супернатанту додавали 0,33 мл 1 н розчину NaOH для доведення рН до 9,4 і по краплях додавали 0,05 н розчину NaOH до блідо-рожевого забарвлення, при використанні в якості індикатора фенолфталеїн. Для видалення неокисленого диметиланіліну проби тричі екстрагували 5 мл діетиловим ефіром, який видаляли під водоструминним насосом. Після третьої екстракції проби протягом 20 хв залишали відкритими для випаровування ефіру, після чого доводили рН середовища до 2,4 шляхом додавання 5% ТСА. Потім в проби вносили 0,2 мл 0,1 М розчину NaNO_2 і доводили об'єм до 3 мл цитратним буфером (рН 2,4). Для розвитку забарвлення проби 5 хв інкубували при 60°C, після чого вимірювали абсорбцію при $\lambda=420$ нм. N-оксигеназну активність обраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції *n*-нітрозодиметиланіліну ($\epsilon=8,2 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) та виражали у нмоль/хв/мг протеїну.

Оцінку активності компонентів II фази клітинної системи біотрансформації здійснювали на основі визначення UDP-глюкуронозилтрансферазної та глутатіон-S-трансферазної активностей.

Визначення *UDP-глюкуронозилтрансферазної активності* проводили за методом *Burchell* та *Weatherill* [100] шляхом встановлення швидкості утворення глюкуроніду *p*-амінофенолу. Реакційна суміш містила 0,39 мг мікросомного протеїну, 1 мМ UDP-глюкуронову кислоту, 0,4 мМ 4-нітрофенол, 5 мМ MgCl_2 і 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5) у загальному об'ємі 0,25 мл. Інкубацію проводили протягом 20 хв при 25°C та зупиняли реакцію шляхом занурення пробірок в киплячу воду протягом 2 хв. Проби

центрифугували при 12000 g протягом 5 хв та відбирали супернатант, який розводили у 10 разів 20 мМ фосфатним буфером (рН 7,5) і вимірювали абсорбцію при $\lambda=405$ нм. Ферментативну активність розраховували за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами *p*-амінофенолу. Досліджену активність виражали у нмоль/хв/мг протеїну.

Визначення *глутатіон-S-трансферазної активності* проводили за методом [101], що ґрунтується на накопичені глутатіонового кон'югату з 1-Cl-2,4-динітробензолом. Реакційна суміш містила 1,68 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН=6,5), 0,1 мл цитозольної чи мікросомної фракції, 0,2 мл 10 мМ відновленого глутатіону, 20 мкл 0,1 М 1-Cl-2,4-динітробензолу. Оптичну густину вимірювали кожну хвилину протягом 3 хв при $\lambda=346$ нм. Досліджену активність виражали у мкмоль/хв/мг протеїну.

Ксантиндегідрогеназну/оксидазну (EC 1.17.1.4/EC 1.17.3.2) активність визначали за методом [102], принцип якого полягає у визначенні кількості сечової кислоти, утвореної в ксантинооксидазній реакції з гіпоксантину. Загальну ксантинооксидазну активність визначали за кількістю сечової кислоти (нмоль), що утворюється за 1 хв інкубації. При визначенні активності D-форми ензиму до субстратної суміші додатково вводили 0,15 мМ NAD^+ . Активність O-форми розраховували як різницю між загальною ксантинооксидазною активністю та активністю її D-форми і виражали у мкмоль/хв/мг протеїну. Для визначення ксантиндегідрогеназної/оксидазної активності печінку гомогенізували у двократному об'ємі буферу, який містив 0,1 М трис-HCl, 2 мМ EDTA, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду (рН 8,2) та центрифугували при 5000 g протягом 15 хв. До 0,1 мл супернатанту (17 мкг в перерахунку на протеїн) додавали 0,7 мл буфера, який містив 4 мМ розчину ксантину у 0,01 М NaOH і 0,2 мл 0,1 М трис-HCl, 2 мМ EDTA, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду, та проводили інкубацію протягом 60 хв при 40°C. Реакцію зупиняли додаванням 20% розчину TCA та нейтралізували насиченим розчином

Na₂CO₃. Кількість сечової кислоти встановлювали уніфікованим методом Фоліна.

2.2.3. Визначення інтенсивності генерування супероксидного радикалу та оксиду азоту субклітинними фракціями печінки та O-формою ксантинооксидази.

Визначення *інтенсивності генерування супероксидного радикалу* мікросомною та мітохондріальною фракціями реєстрували за допомогою тесту з нітросинім тетразолієм (NBT) [103], принцип якого полягає у здатності NBT в присутності супероксидного радикалу відновлюватися до гідразинтетразолію з максимумом поглинання при довжині хвилі $\lambda=540$ нм. До суспензії відповідної субклітинної фракції (1,5 мг протеїну) в ізотонічному фосфатному буфері (рН 7,4) додавали або 3% NADH (для мітохондрій), або 0,2 мМ NADPH (для мікросом). У контрольну пробу замість субклітинної фракції вносили відповідний об'єм буферу. Розчин в пробах перемішували та інкубували 10 хв при 37°C, після чого додавали 0,2% розчин NBT у трис-НСІ буфері (рН 7,4), перемішували та інкубували 5 хв при 37°C. До проб додавали 2 мл розчинника (хлороформ:диметилсульфоксид у співвідношенні 1:2 за об'ємом), інтенсивно перемішували протягом 1 хв, після чого центрифугували 5 хв при 1500 об/хв. Відбирали супернатант та визначали абсорбцію при $\lambda=540$ нм проти відповідного контролю. Визначення кількості утвореного супероксидного радикалу проводили за калібрувальним графіком, побудованим з використанням розчинів різної концентрації диформагану, отриманих при окисленні NBT. Для цього відбирали 0,01; 0,02; 0,05; 0,07; 0,1 і 0,2 мл 0,2 % розчину NBT, додавали 0,1 мл 0,1 М КОН та 0,1 мл 10 мМ розчину аскорбінової кислоти, після чого перемішували та інкубували протягом 10 хв при 37°C. У кожену пробу додавали 2 мл суміші диметилсульфоксид:хлороформ для елюювання диформагану, та визначали

абсорбцію. Інтенсивність генерування супероксидного радикалу виражали у нмоль/хв/мг протеїну.

Визначення рівня генерування оксиду азоту визначали за модифікованим методом [104] шляхом реєстрації вмісту нітрит-аніону (NO_2^-), утвореного в NO-синтазній реакції. Реакційна суміш для визначення містила 0,1 М трис-НСІ (рН 7,4), 10 мМ EDTA, 32 мМ L-аргініну як субстрат та 1 мМ NADPH. Контролем слугували проби, в які замість NADPH вносили бідистиллят. Зразки інкубували 10 хв при 37°C, після чого додавали 2 М HClO_4 та центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. Рівень NO_2^- фіксували за інтенсивністю забарвлення фіолетово-червоного азокомплексу, що утворюється в результаті реакції між сульфаніловою кислотою, NO_2^- і α -нафтилетиламіном (реактив Гріса) спектрофотометрично при довжині хвилі $\lambda = 548$ нм. Калібрувальну криву для визначення кількості NO_2^- будували за стандартними розчинами NaNO_2 різної концентрації в 20 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,4) при додаванні реактиву Гріса. Інтенсивність генерування оксиду азоту виражали у нмоль/хв/мг протеїну.

Визначення вмісту оксиду азоту в печінці проводили за методом *Green et al.* [105]. Рівень NO_2^- фіксували за абсорбцією фіолетово-червоного азокомплексу, що утворюється внаслідок реакції між сульфаніловою кислотою, NO_2^- і α -нафтилетиламіном (реактив Гріса) спектрофотометрично, при довжині хвилі $\lambda = 548$ нм. Вміст оксиду азоту виражали у нмоль/г тканини.

2.2.4. Визначення активностей ензиматичної ланки антиоксидантної системи

Оцінку ензиматичних активностей антиоксидантної системи проводили на основі визначення супероксиддисмутазної, каталазної та глутатіонпероксидазної активностей у цитозольній та мітохондріальній фракціях печінки.

Визначення *супероксиддисмутазної активності* (SOD, EC 1.15.1.1) у субклітинних фракціях печінки проводили за методом [106], який ґрунтується на здатності SOD інгібувати аутоокислення адреналіну. Для цього у кювету до 2,5 мл 0,2 М карбонатного буфера (pH=10,65) додавали 0,01 мл відповідної фракції та 0,1 мл 0,1 % розчину адреналіну, ретельно і швидко перемішували. Вимірювали величину абсорбції при довжині хвилі $\lambda=347$ нм проти карбонатного буфера кожні 60 с протягом 3 хв від моменту внесення адреналіну.

SOD активність виражали в УО/мг протеїну та розраховували за формулою:

$$A = \frac{Г\%}{100\% - Г\%} \times \frac{2N}{a}, \text{ де}$$

$Г\%$ - відсоток гальмування,

N – розведення,

a – концентрація протеїну в нерозведеному біологічному матеріалі.

Каталазну активність (CAT, EC 1.11.16) визначали за методом *Goth* [107], принцип якого полягає в утворенні стійкого забарвленого комплексу гідроген пероксиду з молібдатом амонію. Для аналізу в дослідну і холосту проби додавали по 2 мл 0,03% розчину H_2O_2 , в дослідну – 0,1 мл відповідної субклітинної фракції печінки, в холосту – 0,1 мл дистильованої води. Проби витримували при кімнатній температурі 10 хв, після чого в кожну пробу додавали 1 мл 4 % розчину молібдату амонію і вимірювали абсорбцію при $\lambda=410$ нм проти 0,05 М трис-НСІ-буфера (pH=7,8). Результат розраховували за ступенем інгібування утворення кінцевих продуктів пероксидів молібдату. Каталазну активність виражали у ммоль/хв/мг протеїну.

Глутатіонпероксидазну активність (GSHPx, EC 1.11.1.9) визначали за методом *Paglia* та *Valentine* [108], принцип якого ґрунтується на неензиматичному окисненні глутатіону. До складу реакційної суміші входили:

1 мл 0,3 М фосфатного буфера (рН 7,4); 12 мМ азид натрію; 6 мМ EDTA, 0,2 мл відповідної субклітинної фракції. Реакцію запускали додаванням 0,5 мл 1,8 мМ H_2O_2 та зупиняли через 2 хв додаванням 1 мл 10 % ТСА. Проби центрифугували 15 хв при 1000 g та визначали абсорбцію супернатанту при $\lambda=260$ нм. Активність GSHPx виражали у нмоль/хв/мг протеїну.

2.2.5. Визначення вмісту продуктів оксидативного пошкодження біомолекул печінки

Оцінку *оксидативної деструкції біомолекул* в клітинах проводили на основі визначення рівня відновленого глутатіону, вмісту ТВА-активних сполук, протеїнових карбонільних груп та протеїнових SH груп як у тканині печінки, так і у відповідних субклітинних фракціях.

Визначення *вмісту ТВА-активних сполук* проводили за методом [109], принцип якого полягає у взаємодії продуктів пероксидного окислення ліпідів з тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого комплексу. Для визначення вмісту ТВА-активних сполук до 0,1 мл пробі додавали 2,5 мл 25 мМ трис-НСІ-буфера (рН 7,4), який містив 0,175 М КСІ та 1 мл 17% ТСА. Зразки центрифугували 10 хв при 4000 g, та до 2 мл супернатанту додавали 1 мл 0,8% розчину тіобарбітурової кислоти. Проби поміщали на 10 хв у киплячу водяну баню, та після появи рожевого забарвлення колориметрували проти контролю при $\lambda=532$ нм. Вміст ТВА-активних сполук розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $\varepsilon=1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, та виражали у нмоль/мг протеїну.

Вміст *протеїнових карбонільних груп* визначали за методом [110], що полягає у взаємодії альдегідних і кетонних похідних амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням забарвленої сполуки. Для цього у центрифужні скляні пробірки додавали 0,1 мл пробі та 1 мл 20% ТСА. У дослідні проби додавали 1 мл 0,1 М динітрофенілгідразин, а до контрольних проб – 1 мл 2 М НСІ. Проби інкубували 1,5 год при 37°C та центрифугували 10

хв при 1000 g, отриманий осад промивали 3 рази 1 мл розчину етанол-етилацетату (1:1). До осаду додавали 3 мл 8 М сечовини і витримували на водяній бані до розчинення та вимірювали абсорбцію при $\lambda=370$ нм. Вміст карбонільних груп розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $\epsilon=21 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$, та виражали у нмоль/мг протеїну.

Вміст *протеїнових SH-груп* визначали за методом [111], принцип якого полягає у взаємодії реактиву Елмана (2-нітро-6-меркаптобензойна кислота) з протеїновими SH-групами з утворенням забарвленої сполуки. Для цього до 0,1 мл проби додавали 1 мл 20 % ТСА та центрифугували 10 хв при 1000 g. До осаду додавали 2 мл 5 мМ EDTA в 0,3 М HClO₄ та центрифугували 10 хв при 1000 g. До осаду додавали 5 мл 8 М сечовини та 3 мл 5 мМ EDTA в 50 мМ KН₂РO₄, (рН 7,4), та інкубували на киплячій водяній бані до розчинення з наступним центрифугуванням 10 хв при 1000 g. До супернатанту у дослідні проби додавали 0,02 мл реактиву Елмана, у контрольні – 0,02 мл дистильованої води. Через 30 хв вимірювали абсорбцію дослідних проб проти контрольних при $\lambda=412$ нм. Вміст протеїнових SH-груп розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $\epsilon=3,02 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$, та виражали у нмоль/мг протеїну.

Визначення вмісту *відновленого глутатіону* проводили за методом Батлера, принцип якого полягає у взаємодії відновленого глутатіону з реактивом Елмана (5,5-дітібіос-2-нітробензойна кислота) з утворенням сполуки (2-нітро-6-меркаптобензойна кислота) жовтого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту глутатіону [112]. Для цього до 20 мл гомогенату чи субклітинної фракції додавали 3 мл осаджуючого реактиву, що містив 0,2 М метафосфорної кислоти, 6 мМ EDTA та 5 М NaCl, перемішували, витримували 5 хв при кімнатній температурі та центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. До 2 мл супернатанту додавали 8 мл 0,3 моль/л Na₂НРО₄ та 1 мл реактиву Елмана. Витримували 5 хв та колориметрували дослідну пробу при $\lambda=420$ нм проти

холостої (замість фільтрату додавали дистильовану воду). Вміст відновленого глутатіону визначали за калібрувальною кривою, яку будували шляхом введення в методику замість гомогенату, робочих розчинів відновленого глутатіону (від 0,1 ммоль/л до 5 ммоль/л) та виражали в мкмоль/мг протеїну.

2.3. ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ГЛЮКОЗИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПІДНОГО ПРОФІЛЮ СИРОВАТКИ КРОВІ

2.3.1. Проведення тесту толерантності до глюкози

Тест толерантності до глюкози використовували для оцінки впливу ВРА на транспорт глюкози. Для цього у тварин після 12 годинного обмеження доступу до їжі визначали рівень глюкози в крові, величина якого слугувала в подальшому референтною. Тваринам вводили *per os* розчин глюкози концентрацією 0,5 г/мл з розрахунком 3 мкл/г маси та проводили визначення рівня глюкози через 15, 30, 60, 90 та 120 хв.

Визначення вмісту *глюкози* у сироватці крові проводили за глюкозооксидазним методом [113], принцип якого полягає у окисненні глюкози глюкооксидазою до глюконової кислоти та пероксиду водню, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, кількість якого визначали спектрометрично. У дослідну пробу додавали 20 мкл сироватки крові, 1 мл 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН 7,3), що містив 2 мМ розчин фенолу. До проби також додавали 1 мл розчину ензимів (2200 U/л пероксидази, 18000 U/л β , D-глюкооксидази та 110 мг/л 4-амінофеназону). У калібрувальну пробу замість сироватки крові додавали 0,02 мл 10 мМ розчин глюкози, у контрольну – 0,02 мл фізіологічного розчину. Рідину у пробірках перемішували та інкубували 12 хв при температурі 37°C. Вимірювали оптичну щільність дослідної та калібрувальної проби проти холостої при 525 нм. Вміст глюкози розраховували за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times K \times 10,$$

де, $E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби,

$E_{\text{кал.}}$ – оптична щільність калібрувальної проби,

K – коефіцієнт розведення,

та виражали у ммоль/л.

На основі отриманих результатів будували криві толерантності до глюкози. Величину AUC (від *англ. area under the curve*) розраховували за формулою трапецієподібного методу [114]:

$$AUC = \frac{C_0 + C_{15} \times 2 + C_{30} \times 2 + C_{60} \times 2 + C_{90} \times 2 + C_{120}}{5}$$

де, C – концентрація глюкози, ммоль/л,

5 – кількість трапецій (відрізків часу).

2.3.2. Аналіз ліпідного профілю сироватки крові

Визначення вмісту *загального холестеролу* в сироватці крові проводили ензиматичним методом [115], принцип якого полягає у тому, що за дії холестеролестерази з етерифікованого холестеролу утворюється вільний холестерол, який холестеролоксидазою окиснюється до 4-холестенону з побічним утворенням молекули гідроген пероксиду. Остання вступає в реакцію з 4-амінофеназоном та фенолом утворюючи сполуку червоного кольору, інтенсивність якої прямо пропорційна концентрації загального холестеролу. Для аналізу до 0,02 мл сироватки крові (дослідна проба) додавали 2 мл 0,1М фосфатний буфер (рН 6,8), який містив 6мМ натрій фенолят, 0,3 мМ 4-амінофеназон та суміш ензимів (6,6 мкат/л холестеролестерази, 3,3 мкат/л холестеролоксидази, 20 мкат/л пероксидази). У стандартну пробу замість сироватки крові додавали 0,02 мл 6,5 мМ холестерол, у холосту – воду. Вміст пробірок перемішували, інкубували 10 хв при 37°C та колориметрували при 515 нм.

Розрахунок здійснювали за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{станд.}}} \times 6,5,$$

де, $E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби,

$E_{\text{кал.}}$ - оптична щільність дослідної проби,

та виражали вміст загального холестеролу у ммоль/л.

Визначення *вмісту триацилгліцеролів* у сироватці крові проводили за методом [116], принцип якого полягає у гідролізі триацилгліцеролів до гліцеролу, вміст якого визначали ензиматично за концентрацією хіноніміну. Для аналізу до 0,01 мл сироватки крові (дослідна проба) додавали 1 мл буферного розчину (рН 7,5) що містив 40 мМ PIPES, 5 мМ 4-хлорфенол, 1 мМ $MgSO_4$, 0,5мМ 4-амінофеназон та суміш ензимів (1500 МО/л ліпази, 200 МО/л гліцерокінази, 100 МО/л гліцерофосфатоксидази та 250 МО/л пероксидази). У калібрувальну пробу замість сироватки крові додавали 0,01 мл 2,26 мМ триацилгліцеролів, у холосту – воду. Розчин в пробірці перемішували та інкубували 10 хв при 37°C та вимірювали оптичну щільність дослідної та калібрувальної проб при 520 нм.

Розрахунок здійснювали за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 2,26,$$

де, $E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби,

$E_{\text{кал.}}$ - оптична щільність дослідної проби,

та виражали вміст триацилгліцеролів у ммоль/л.

Визначення холестеролу ліпопротеїнів дуже низької густини (VLDL) та ліпопротеїнів низької густини (LDL) у сироватці крові проводили розрахунковим методом використовуючи формули Фрідевальда (Friedewald) [117]:

$$Chol-VLDL = \frac{TG}{5} \times 2,29, \text{ де}$$

TG – вміст триацилгліцеролів

$$Chol-LDL = Total Chol - (Chol-VLDL + Chol-HDL)$$

та виражали у ммоль/л.

2.4. МОДЕЛЬ ПРЕВЕНТИВНОЇ КОРЕКЦІЇ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

2.4.1. Отримання високоактивної пробіотичної культури роду *Lactobacillus*

З фекального біоптату тварин, яким вводили ксенобіотик, та тварин контрольної групи, яким вводили лише носій, ізолювали селективні (бактерії, що контактували із ксенобіотиком) чи природні (бактерії, що не контактували з бісфенолом А) пробіотичні культури роду *Lactobacillus*.

Селективну або природну пробіотичну культуру виділяли з фекальних зразків шляхом нанесення 0,1 мл серійного розведення біологічного матеріалу на поверхню чашок Петрі, що містили агар MRS (HIMEDIA, Індія), та інкубували при 37°C протягом 48 год. Після інкубації проводили збір культури, яку розводили у стерильному фізіологічному розчині.

2.4.2. Колонізація кишечника здорових тварин пробіотиками

Для колонізації кишечника здорових мишей пробіотиками, інтактним тваринам проводили пероральне введення по 100 мкл суспензії отриманих культур *Lactobacillus*, що містила $3 \cdot 10^7$ КУО пробіотиків щодня протягом 4 днів. Через 24 години після введення пробіотиків, тваринам вводили 50 мг/кг ВРА за схемою, що описана у розділі 2.1. (рис. 2.1).

Через 24 години після останнього введення ксенобіотика (для проведення аналізу компонентного складу мікробіоти кишечника) від тварин обох груп отримували фекальний біоптат [118], з подальшою евтаназією [90]. Для дослідження впливу пробіотиків на вільнорадикальні процеси індуковані ВРА від тварин відбирали печінку та проводили визначення продуктів вільнорадикального пошкодження клітинних біомолекул (розділ 2.2.5.).

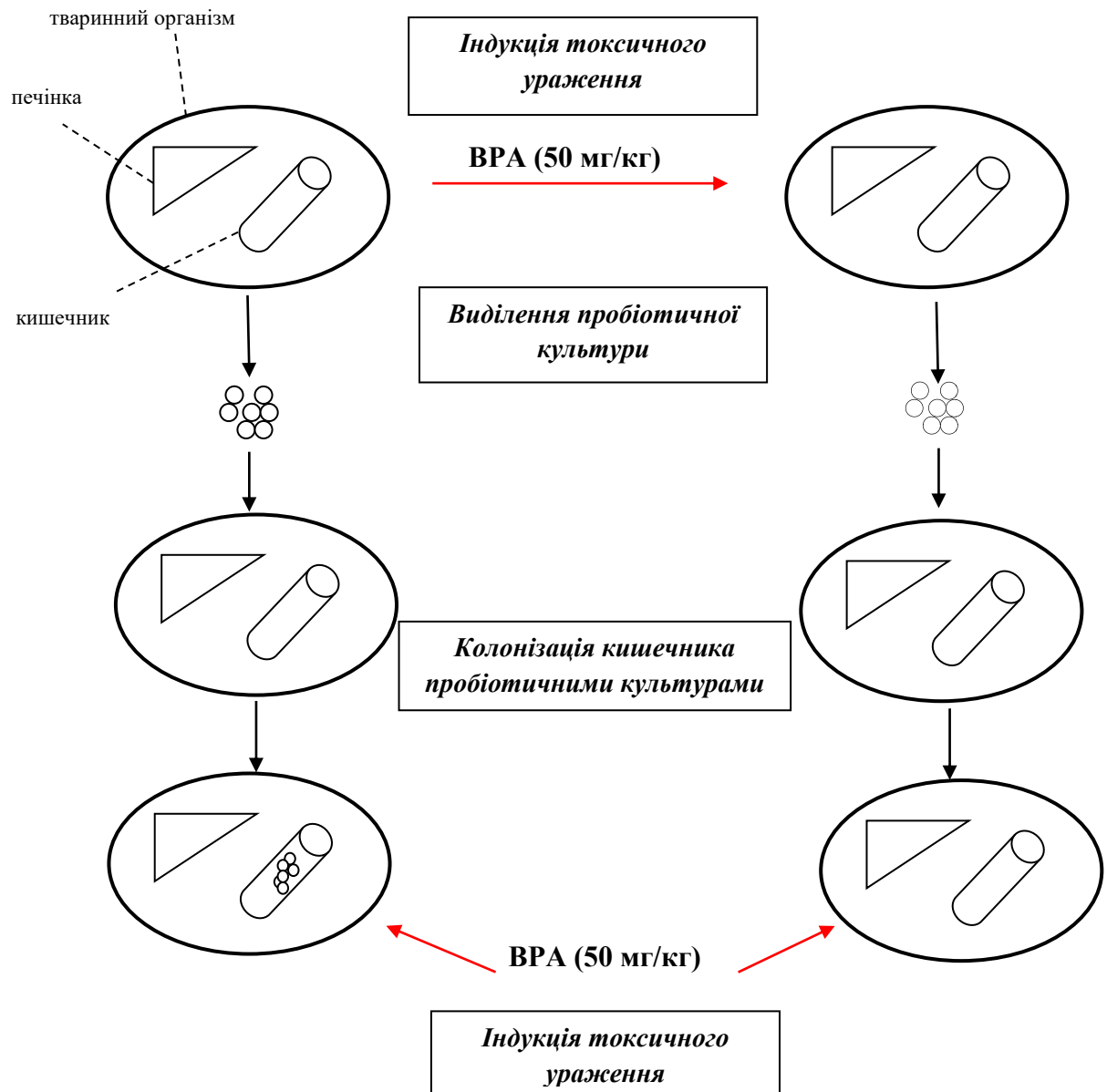


Рис. 2.1. Схема способу пробіотичної превентивної корекції індукованого бісфенол-А вільнорадикального ураження печінки

2.4.3. Аналіз компонентного складу мікробіоти кишечника

0,1 г фекального біоптату поміщали у стерильні пробірки типу Erendorff та додали 0,9 мл фізіологічного розчину. Суміш перемішували на вортексі на низькій швидкості протягом 2 – 4 хв, для досягнення однорідної текстури. Серійне розведення (10^{-1} - 10^{-8}) зразків бактерій (0,1 мл)

розповсюджували на поверхні чашок Петрі, які містили селективні культивацийні середовища та інкубували при 37°C:

- використовували Ендоагар для культивування *E. coli* протягом 24 год;
- використовували MRS агар для культивування *Lactobacillus* протягом 48 год;
- використовували агар *Bifidium* для культивування *Bifidobacterium* протягом 48 год [119].

Підраховували кількість колоній на кожній чашці Петрі та розраховували кількість бактерій (КУО) на г зразку:

$$КУО/г = \frac{C \times D}{m}$$

де, C – кількість колоній,

D – ступінь розведення,

m – маса зразку.

Результати виражали як lg КУО/г фекалій.

2.5. СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА ДАНИХ

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми *BioStat*, використовуючи однофакторний дисперсійний аналіз (*one-way ANOVA*) з наступним застосуванням апостеріорного критерію Тьюкі (*Tukey's HSD post hoc test*). Нормальність розподілу перевіряли використовуючи тест Шапіра-Уїлка, рівність дисперсій – використовуючи тест Фішера.

Вірогідними вважали відмінності між групами при $P \leq 0,05$. На графіках величини позначені різними буквеними індексами (*a*, *b*, *c*) статистично вірогідно відрізняються; зокрема величини позначені буквою *a* статистично вірогідно відрізняються як від величин, позначених буквою *b*, так і буквою *c*; між величинами позначеними однаковими буквеними індексами статистично вірогідної різниці немає.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. ЛІПІДНИЙ ПРОФІЛЬ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ БІСФЕНОЛУ А ТА УМОВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РЕТИНОЇДАМИ

На сьогодні відомо, що ВРА діє як ксеноестроген, основним механізмом якого є зв'язування із класичними рецепторами естрогену, імітуючи дію даного гормону. Проте, він може зв'язуватись із некласичними мембранними рецепторами, які задіяні у регулюванні ліпідного та вуглеводного метаболізму. Оскільки РА, як активна транскрипційна форма ретиноїдів, діє як прогормон, через взаємодію із ядерними рецепторами то, ймовірно, дана сполука може впливати на дію ВРА. Тому у дисертаційному дослідженні проведено аналіз ліпідного профілю сироватки крові при введенні ВРА за різної забезпеченості ретиноїдами [120].

Результати досліджень показали, що 3-добове введення тваринам дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами 50 мг/кг ВРА призвело до збільшення на 39% вмісту триацилгліцеролів у сироватці крові, порівняно із контрольною групою тварин (рис. 3.1 А) [121]. Поряд зі збільшенням вмісту триацилгліцеролів у сироватці крові тварин, яким вводили ксенобіотик, нами також зафіксовано зростання у 2,2 рази вмісту загального холестеролу, порівняно із відповідним показником контрольної групи тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами (рис. 3.1 Б). Отримані результати, ймовірно, зумовлені дією ВРА як обезогену, що в першу чергу, пов'язані із його здатністю зв'язуватися з некласичним мембранним рецептором естрогенів, а також з G-білковим рецептором 30, підвищуючи експресію генів, продукти яких залучені у метаболізм ліпідів [84, 85].

Виявлено, що гіперхолестеролемія та триацилгліцеролемія у тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, при введенні ВРА, супроводжувались порушенням основних класів ліпопротеїнів.

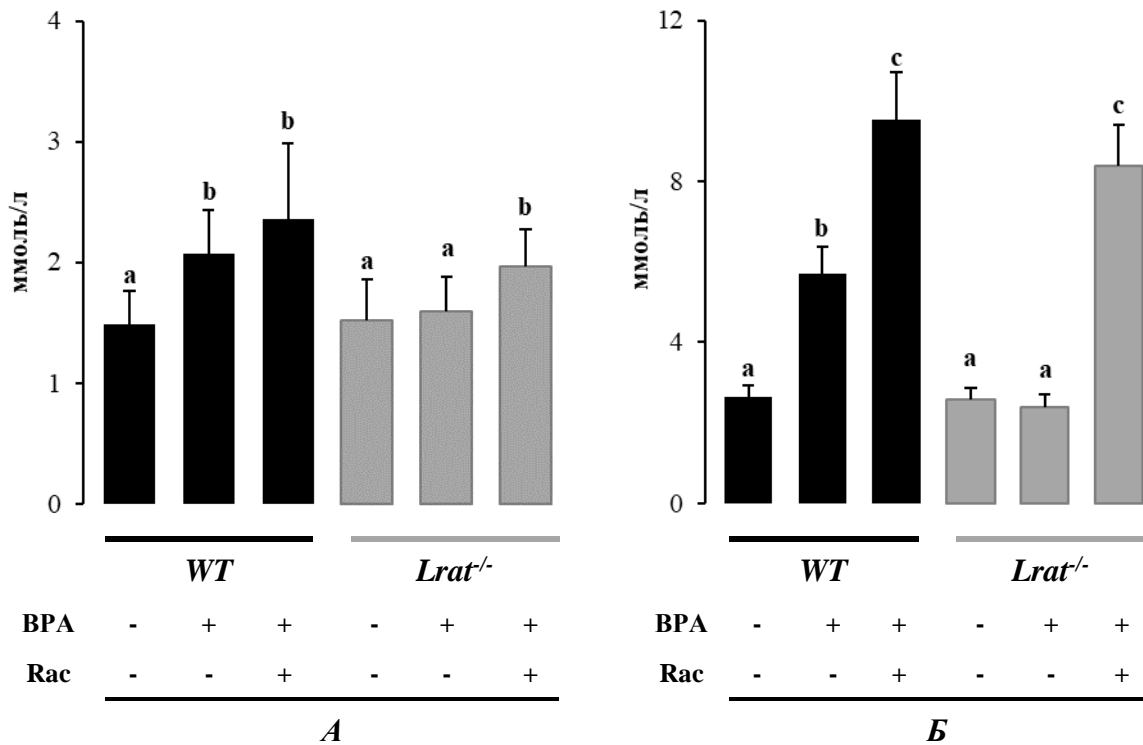


Рис. 3.1. Вміст триацилгліцеролів (А) та загального холестеролу (Б) у сироватці крові тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat^{-/-}* – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Зокрема, у тварин даної групи показник вмісту атерогенного холестеролу (LDL) у 2,8-разів перевищував відповідний показник групи тварин, яким вводили носій (рис. 3.2 А). Серед усіх ліпопротеїнів саме цей клас містять найбільшу кількість холестеролу (70 %) і їм відводять провідну роль у транспорті останнього з печінки до периферичних тканин.

При введенні ВРА тваринам дикого типу зафіксовано також зростання вмісту холестеролу VLDL, показник якого на 40% перевищував відповідний показник у контрольній групі тварин даного генотипу (рис. 3.2 Б). Даний клас ліпопротеїнів формується в печінці та є головною транспортною формою ендогенних триацилгліцеролів, вміст яких у складі VLDL складає 65 %.

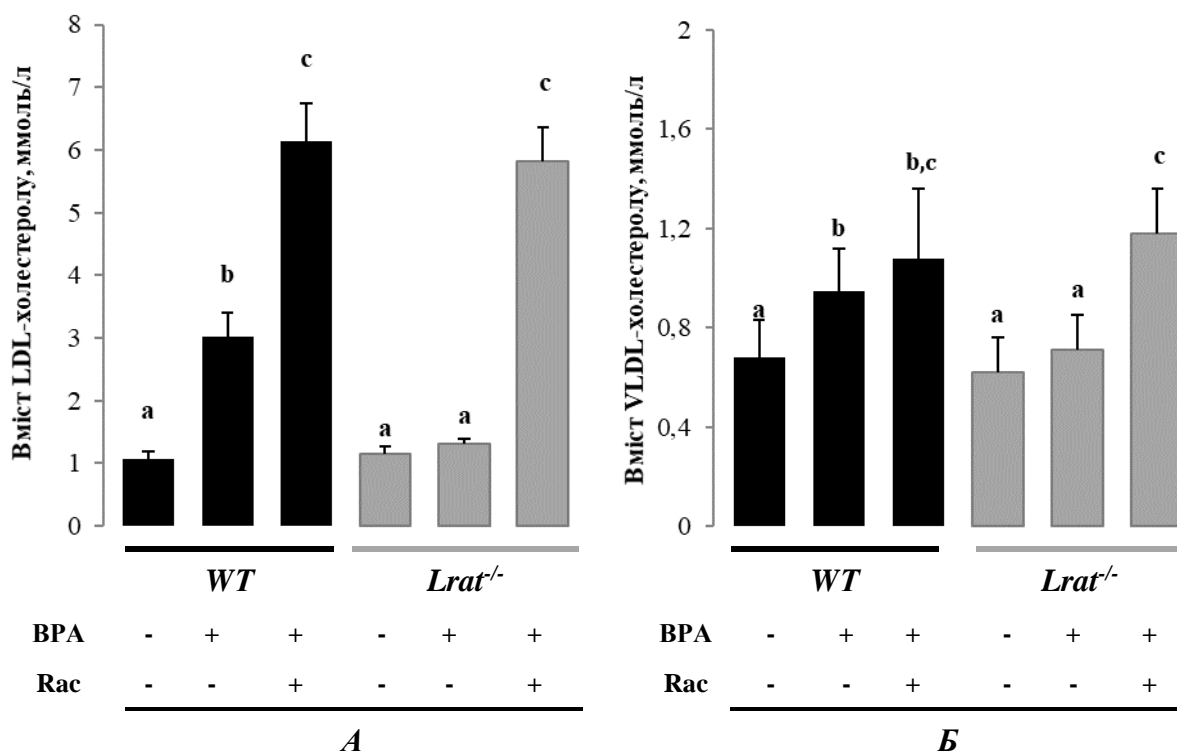


Рис. 3.2. Вміст холестеролу ліпопротеїнів низької (А) та дуже низької густини (Б) у сироватці крові тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat^{-/-}* – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Схожі результати були отримані у дослідженнях ліпідного обміну за умов хронічного введення низьких доз ВРА. Зокрема *Ke et al.* [84] показано, що після тривалої експозиції даним ксенобіотиком експериментальні тварини страждали від ожиріння та дисліпідемії. Дослідники з'ясували, що механізми, які потенційно лежать в основі аберантного печінкового ліпідного обміну і пов'язаної з ним дисліпідемії при введенні ВРА, полягають у збільшенні синтезу жирних кислот і холестеролу, порушенні транспорту триацилгліцеролів і холестеролу.

Крім цього, у літературі показано, що хронічне введення низьких доз ВРА супроводжувалось розвитком інсулінорезистентності. Зокрема, у дослідженнях [122], які полягали у вивченні впливу низьких доз ВРА на чутливі до інсуліну периферичні тканини та метаболізм у всьому організмі дорослих тварин, встановлено, що хронічне введення низьких доз ВРА призводило до порушення сигналізації інсуліну в скелетних м'язах і печінці, розвитку інсулінорезистентності та збільшення глюкозостимульованого вивільнення даного гормону. Основними механізмами, згідно з якими ВРА може індукувати інсулінорезистентність, є дефекти у фосфорилуванні як рецепторів інсуліну, так і Akt, або шляхом активації ER. Дія ВРА, за умов його хронічного введення, через ER α збільшує експресію гена інсуліну у β -клітинах підшлункової залози із наступним підвищенням рівня даного гормону, тоді як через ER β – блокує канали K_{ATP}, що викликає швидке збільшення вивільнення інсуліну [123, 124]. У дослідженнях *Yildiz et al.*, поряд зі зниженням експресії рецепторів даного гормону, протеїнкінази B (Akt), фосфо-Akt, введення ВРА супроводжувалось зниженням окислення глюкози та зниженням синтезу глікогену [125].

Проте у літературі не має відомостей, чи впливає досліджуваний контамінант за умов гострої експозиції його високими дозами на процеси транспорту глюкози.

Результатами наших досліджень встановлено, що гіперхолестеролемія, гіпертриацилгліцеролемія та дисбаланс вмісту основних класів ліпопротеїнів, що фіксувались при короткочасному введенні дослідним тваринам дикого типу 50 мг/кг ВРА, супроводжувалось порушенням транспорту глюкози, що виражалось у вірогідно вищих показниках її рівня (рис. 3.3) та сповільненні темпів кліренсу (рис. 3.4). Зокрема, вміст глюкози у сироватці крові тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами за умов експозиції ВРА у 2,4 рази перевищував відповідний показник контрольної групи тварин дикого типу.

У тварин даної групи також відмічено значне порушення толерантності до глюкози, зокрема зафіксовано значно вищу площу під кривою (AUC), порівняно з контрольною групою після тестового введення глюкози. Даний показник у тварин дикого типу після введення ВРА на 34% перевищував відповідний показник AUC у групі тварин, яким вводили носій. Пік глікемічної кривої після тестового введення глюкози, зафіксований на 15 хвилині, як і у тварин контрольної групи, проте її концентрація на 25% вища, ніж у тварин дикого типу і, навіть, не знижувалась на 90 хвилині до вихідних показників (рис. 3.4).

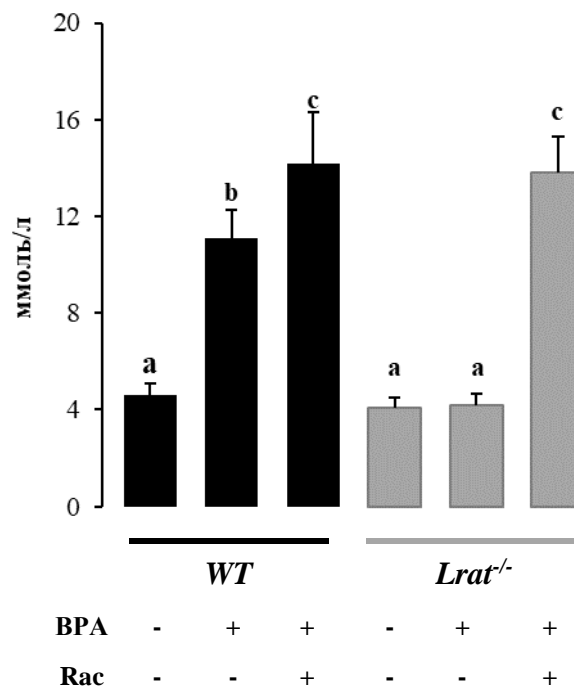


Рис. 3.3. Вміст глюкози у сироватці крові у тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами.

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, Lrat^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, P < 0,05.

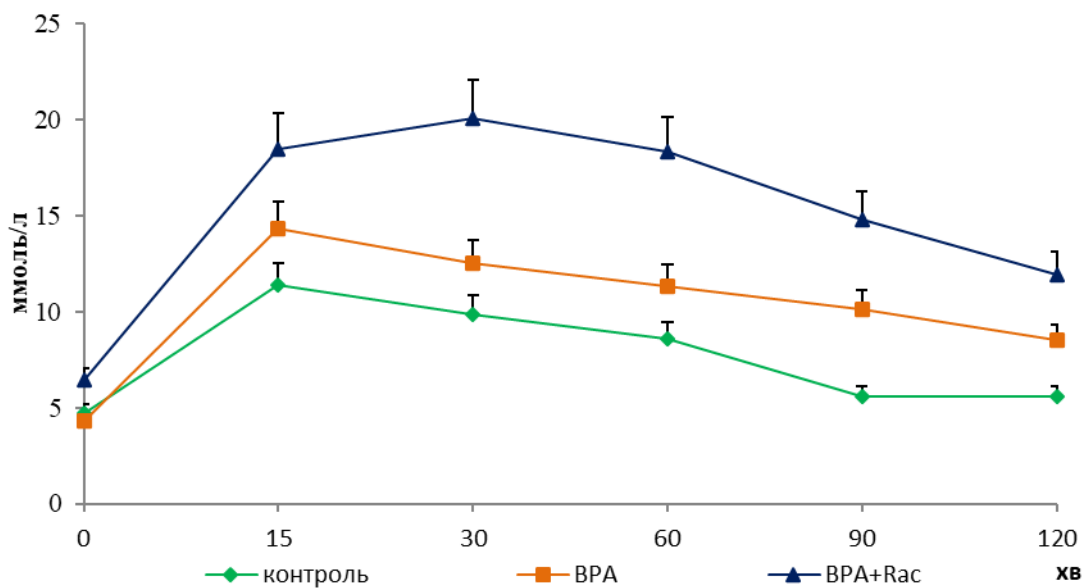


Рис. 3.4. Глікемічна крива у тварин дикого типу за умов введення ВРА та 3000 МО ацетату ретинолу

Примітка: ВРА – бісфенол А, Рас – ацетат ретинолу

Однією з ймовірних причин порушеного транспорту глюкози за гострої дії бісфенолу А може бути пошкодження клітин підшлункової залози, та як наслідок – знижене продукування інсуліну. Зокрема, у дослідженнях *Lin et al.*, показано, що ВРА індукує апоптоз β -клітин підшлункової залози, і таким чином знижує стимульоване глюкозою продукування інсуліну, причому дані ефекти є дозозалежними [126].

Таким чином, короточасне введення високих доз ВРА тваринам дикого типу супроводжується розвитком гіпертриацилгліцеролемії, гіперхолестеролемії, дисбалансу вмісту основних класів ліпопротеїнів та порушенням транспорту глюкози.

На сьогодні відомо, що ретиноїди залучені у регуляцію як ліпідного, так і вуглеводного обміну, тому вони можуть впливати на обезогенні ефекти ВРА. Результати наших досліджень показали, що додаткова експозиція 3000 МО Рас, одночасно з введенням 50 мг/кг ВРА, підвищувала ліпогенний ефект даного ксенобіотика у тварин дикого типу. Зокрема, у цих мишей зафіксовано вірогідне зростання рівня загального холестеролу у 1,3 разів

порівняно із групою тварин, яким вводили ксенобіотик та у 3,6 разів порівняно із групою, яким вводили лише носій (рис. 3.1). Також зафіксоване зростання рівня триацилгліцеролів, показник якого на 14% перевищував відповідний показник групи тварин, яким вводили ВРА, та на 58% – групи тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами.

Встановлене зростання гіперхолестеролемії та триацилгліцеролемії супроводжувалось підвищенням рівня холестеролу-LDL у 2 та 5,7 разів проти групи тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, яким вводили ВРА, та контрольної групи тварин цього ж генотипу відповідно. Введення ретиноїдів призводило також до незначного зростання рівнів холестеролу VLDL у сироватці крові тварин даної групи (рис. 3.2).

Крім того, у тварин цієї групи при введенні фармакологічних доз ретиноїдів також спостерігалось посилення порушення транспорту глюкози, що виражалось у вірогідно вищих показниках рівня глюкози та AUC (рис. 3.3 та 3.4). Зокрема, у даних тварин проведений тест толерантності до глюкози показав, що пік глікемічної кривої зафіксований на 30 хвилину після тестового введення глюкози. Крім того, глікемічна крива характеризується розлогішим характером, а вміст глюкози на останньому терміні вимірювання так і не досягав вихідних показників, що свідчить про явне порушення кліренсу даного моносахариду. AUC у цій групі тварин перевищував у 2 рази відповідний показник у тварин, яким вводили ВРА та у 1,5 рази у контрольній групі тварин. Таким чином введення аліментарних ретиноїдів посилювало обезогенні ефекти ВРА (рис. 3.3 та 3.4).

Для підтвердження залежності даних ефектів ВРА від забезпеченості організму вітаміном А, у дослідженні були використані трансгенні тварини, які не здатні накопичувати ефіри ретинолу у печінці. Результати показали, що при введенні 50 мг/кг ВРА тваринам-нокаутам, досліджувані показники, як ліпідного профілю, так і показники рівня глюкози та темпів її кліренсу статистично-вірогідно не відрізнялись від тотожних показників контрольної

групи, які отримували лише носій (рис. 3.1-3.3 та 3.5). Водночас додаткова експозиція 3000 МО Рас цим тваринам, (позбавлених ендогенно-депонованих ретиноїдів) за умов введення ВРА, індукувала розвиток гіперхолестеролемії, триацилгліцеролемії, дисбалансу вмісту основних класів ліпопротеїнів, порушення транспорту глюкози, що виражалось у значному зростанні відповідних показників. Варто зазначити, що всі досліджувані показники досягали відповідних величин групи тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, яким вводили ацетат ретинолу та ВРА, та не було відмічено статистичної різниці між цими групами.

Найбільш значні зміни зафіксовано стосовно вмісту загального холестеролу та холестеролу LDL, які у 3,2 й 5 разів перевищували відповідні показники у групі тварин-нокаутів, яким вводили носій. Крім того, при додатковому введенні тваринам *Lrat*^{-/-} фармакологічних доз ретиноїдів зафіксовано 2-разове зростання AUC, порівняно із контрольною групою тварин, що свідчить про порушення транспорту глюкози (рис. 3.5).

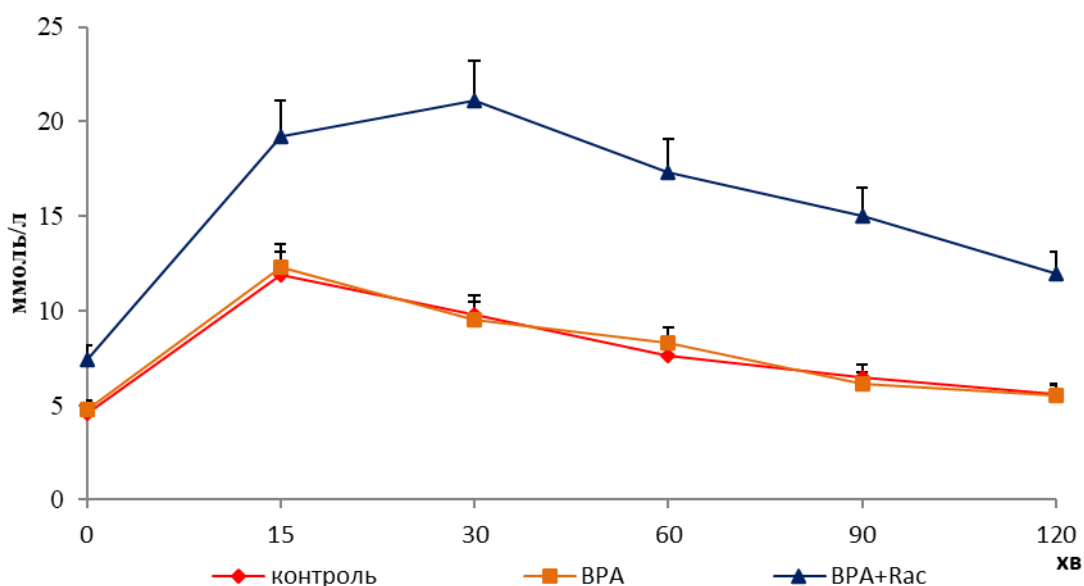


Рис. 3.5. Глікемічна крива у тварин-нокаутів за умов введення ВРА та 3000 МО ретинолу ацетат

Примітка: ВРА – бісфенол А, Рас – ацетат ретинолу

Зміну ВРА-індукованого аберантного ліпідного обміну, за умов різної забезпеченості ретиноїдами, в першу чергу, можна пояснити участю даних сполук у регуляції метаболізму ліпідів. Деривати вітаміну А, а саме ретиноева кислота, можуть здійснювати цей вплив через їх взаємодію як з RAR, так і з RXR. Одним із гетеродимерних партнерів останніх виступають PPAR – ліпідно-активовані ядерні рецептори, що задіяні у контролі енергетичного балансу, обміну ліпідів та вуглеводів [127, 128].

У літературі показано, що дефіцит VA викликає частковий гіполіпідемічний ефект. Зокрема, у щурів з дефіцитом даного мікронутрієнту спостерігалось зниження вмісту фосфоліпідів у печінці, триацилгліцеролів, холестеролу та основних класів ліпопротеїнів у сироватці крові. Проте, незмінними залишалися рівні триацилгліцеролів та холестеролу в печінці [129]. Частковий гіполіпідемічний ефект дефіциту даного вітаміну у гризунів може бути викликаний зниженням активності синтезу жирних кислот в печінці та порушенням синтезу холестеролу з мевалонату. Змінена експресія цих генів у печінці може бути пов'язана із зниженою транскрипцією гена PPAR α у печінці.

Водночас, додаткове введення високих доз пероральних ретиноїдів, включаючи 13-*cis*-ретиноеву кислоту та АТРА, які використовують для лікування гострої промієлоцитарної лейкемії, акне та псоріазу індукує гіпертриацилгліцеролемію та гіперхолестеролемію як побічні ефекти. Основним механізмом індукованої ретиноїдами дисліпідемії є порушення кліренсу триацилгліцеролів, опосередковане, принаймні частково, активацією RAR, шляхом якої відбувається дозозалежне підвищення концентрації триацилгліцеролів і VLDL, та перерозподіл холестеролу HDL у холестерол LDL [130–133].

Крім того, дисрегульований рівень ліпідів у плазмі крові може бути пов'язаний із RA-індукованою експресією аполіпопротеїну С-III, опосередкованою активацією LXR:RXR. Висока концентрація Apo C-III

(аполіпропротеїн плазми крові, який входить до складу VLDL і HDL) на поверхні ліпопротеїнів пригнічує активність ліпопротеїнової ліпази [129, 132, 133]. Збільшення експресії гену Апо С-III може пояснюватись також ретиноїд-залежною FOXO1 (фактор транскрипції, який відіграє важливу роль у регуляції глюконеогенезу та глікогенолізу за участі інсуліну), що призводить до вивільнення VLDL з печінки з одночасним уповільненням цитоплазматичної деградації триацилгліцеролів через інгібування ліпопротеїнліпази. Проте невідомо, чи така дія лежить у площині взаємодії FOXO1 з RAR або RXR [132].

У інших дослідженнях, довготривала експозиція високими дозами пальмітату ретинолу чи іншими препаратами на основі RA, супроводжувалась не лише розвитком гіперхолестеролемії, гіпертриацилгліцеролемії, а й зафіксоване значне зростання рівня LDL та жирних кислот у сироватці крові [129]. Синтез жирних кислот в печінці регулюється розподілом ліпогенних генів, включаючи ацетил-СоА карбоксилазу та FA синтазу. Транскрипція генів даних ензимів у печінці контролюється фактором транскрипції, який називається зв'язуючий протеїн 1с стерол-респонсивного елементу (SREBP-1с).

Встановлено, що RA індукує експресію SREBP-1с в клітинах HepG2, ймовірно за рахунок посилення активності гетеродимерів LXR:RXR [128]. В свою чергу, активація SREBP-1с, супроводжується індукцією синтезу *de novo* вільних жирних кислот та триацилгліцеролів, чистий результат – скупчення останніх у печінці [127, 129]. Оскільки відомо, що ВРА також активує даний транскрипційний фактор та призводить до розвитку аберантного ліпідного обміну, додаткове введення ретиноїдів лише посилює дію даного контамінанту.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.1.

Отже, за умов нормального надходження ретиноїдів, гостра експозиція високими дозами ВРА супроводжується порушенням транспорту глюкози та ліпідного обміну, що виражалось у гіперглікемії, гіперхолестеролемії, гіпертриацилгіцеролемії та розвитком дисбалансу вмісту основних ліпопротеїнів. Встановлені ефекти даного ксенобіотика посилювалися за умов додаткового надходження фармакологічних доз ретиноїдів. Залежність обезогенних ефектів бісфенолу А від забезпеченості вітаміну А підтверджено результатами, отриманими від нокаутних тварин, позбавлених запасів даного мікронутрієнта у печінці.

Результати цього розділу висвітлені у публікаціях [120, 121].

3.2. ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ БІСФЕНОЛУ А ТА РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РЕТИНОЇДАМИ

3.2.1. Оксидативне пошкодження біомолекул печінки та окремих субклітинних фракцій за умов введення бісфенолу А та різної забезпеченості ретиноїдами

Більшість ксенобіотиків метаболізуються ендogenousними ензимами в інактивні форми. Проте деякі з екзогенних сполук або через їх дозу, або у зв'язку з тривалою експозицією можуть метаболізуватись у вільнорадикальні токсичні форми, що викликають оксидативний стрес та пошкодження тканини печінки [134]. Тому у даній роботі було проведено визначення продуктів оксидативного пошкодження печінки тварин за умов введення високих доз бісфенолу А.

Результати досліджень показали, що введення 50 мг/кг ксенобіотика протягом 3 діб тваринам дикого типу супроводжувалось глибоким оксидативним пошкодженням ліпідних і протеїнових компонентів печінки, що може виникати як результат дії токсичних радикалів бісфенолу А, так і індукованої ВРА активації вільнорадикальних процесів [63]. Найсуттєвіші

зміни виявлялись щодо рівнів ТВА-активних продуктів, що є маркером пероксидного окислення ліпідів, до вторинних продуктів якого належить малоновий диальдегід – реактивний альдегід, утворений в результаті деградації нестабільних пероксидів поліненасичених жирних кислот [120]. Даний показник у тварин з нормальною забезпеченістю ретиноїдами, при введенні ВРА зростав у 2,8 разів порівняно із групою тварин, яким вводили носій (рис. 3.6).

Найбільш загальним часто використовуваним маркером оксидативного пошкодження протеїнів є вміст карбонільних груп (альдегіди та кетони), які утворюються при окисленні бічних протеїнових ланцюгів (зокрема Pro, Arg, Lys, і Thr) та є стійкими, що і зумовило вибір карбонільних груп у якості маркера [137].

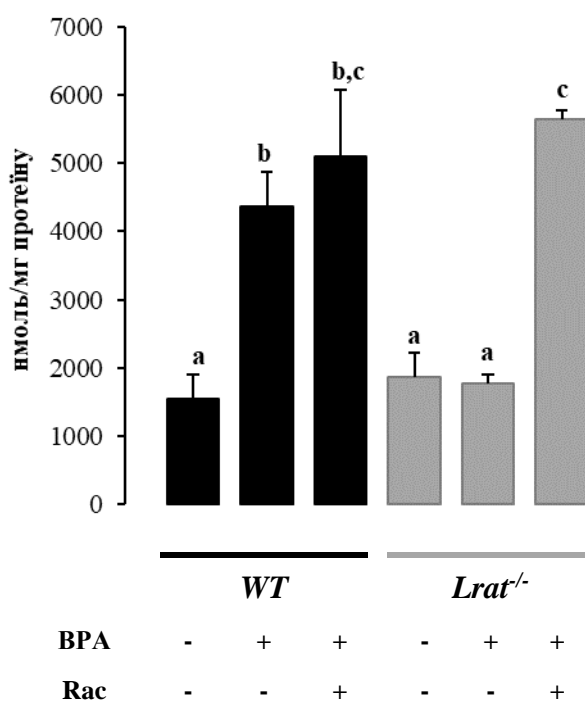


Рис. 3.6. Вміст ТВА-активних продуктів у печінці тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами.

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, Lrat^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, P < 0,05.

Нами зафіксоване зростання вмісту останніх, показник яких при введенні ВРА тваринам дикого типу перевищував відповідні величини контрольної групи у 1,5 рази (рис. 3.7 А).

Більшість протеїнів у своєму бічному ланцюзі містять тиольні групи, які переважно представлені цистеїновими залишками, і їхня протонна лабільність робить їх хімічно-активною мішенню не лише для широкого спектру біохімічних взаємодій, а й для дії вільних радикалів [138, 139].

У роботі, при введенні ВРА тваринам із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, зафіксовано зниження рівнів протеїнових SH-груп на 41 % у печінці порівняно з відповідними показниками у тварин контрольної групи (рис. 3.7 Б). Це пов'язано з тим, що, ймовірно, відбувається окислення SH-груп з утворенням дисульфідних зв'язків, що супроводжується зміною тиол-дисульфідного статусу, наслідком чого є накопичення оксидативно-модифікованих протеїнів, які вже не можуть виконувати свої функції.

Непротеїнові тиоли є першою лінією захисту від оксидативного стресу, діючи через SH-групи як клітинний відновник і протектор проти більшості неорганічних полютантів. До них належить трипептид – глутатіон, який часто описують як некритичний клітинний нуклеофіл, кон'югацією з яким редукується і елімінується токсичність і потенційна канцерогенність електрофільних метаболітів, що продукується СYP та іншими ксенобіотик-біотрансформуючими ензимами [7, 18].

Рівень відновленого глутатіону може бути підвищений при незначному оксидативному стресі за рахунок збільшення його синтезу через функціонування 2 транскрипційних факторів: KEAP-1 та Nrf2. Ці протеїни виступають ксеносенсорами та індукують синтез глутамат-цистеїн лігази, ензиму, що каталізує лімітуючу реакцію в синтезі глутатіону; проте посилене генерування вільних радикалів може знизити його рівень [7, 140].

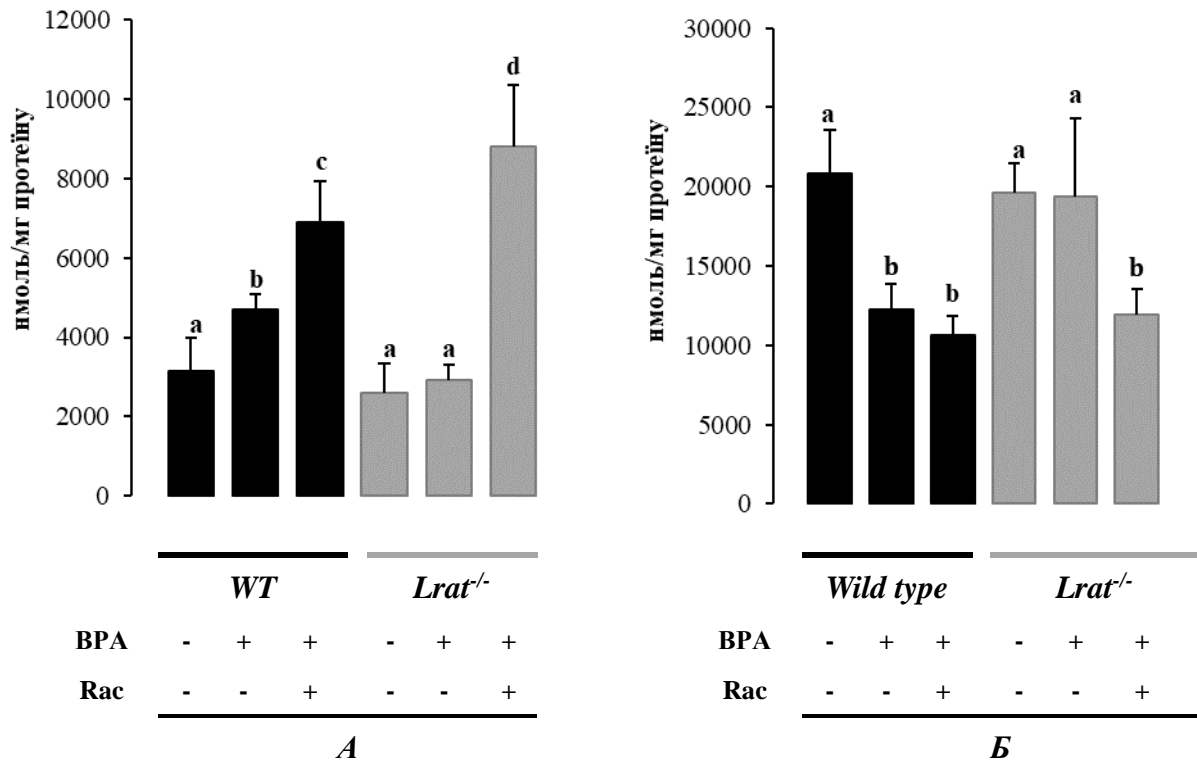


Рис. 3.7. Вміст протеїнових карбонільних (А) та SH-груп (Б) у печінці тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами.

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat^{-/-}* – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Зокрема, при експозиції ВРА нами зафіксоване зниження на 66 % рівня відновленого глутатіону у печінці тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами порівняно із тваринами контрольної групи (рис. 3.8), що, ймовірно, свідчить про інтенсивне вільнорадикальне пошкодження гепатоцитів метаболітами даного контамінанта, або про використання даного трипептиду глутатіонзалежними ензимами, зокрема GST, яка каталізує біотрансформацію бісфенолу А до його окиснених метаболітів.

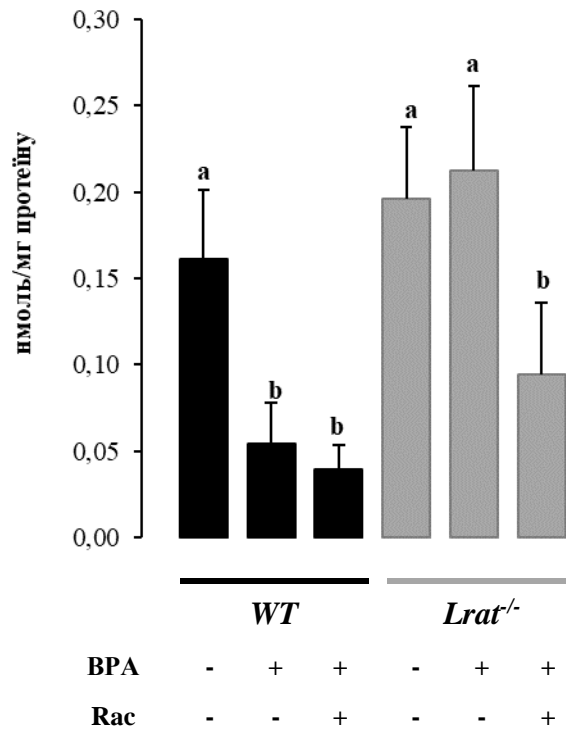


Рис. 3.8. Вміст непротеїнових SH-груп у печінці тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами.

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендogenous запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (а, b, с), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Таким чином, нами встановлено, що гостра експозиція ВРА у тварин дикого типу супроводжується оксидативним пошкодженням клітинних біополімерів у печінці. Проте, перед нами постало питання, які з компартментів клітини найбільше страждають від прооксидантної дії ВРА. Тому у роботі проведено визначення вмісту ТВА-активних продуктів, протеїнових карбонільних та SH-груп у мікросомальній, мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки за умов введення ксенобіотика.

Результати наших досліджень показали, що введення *LOAEL* дози ВРА тваринам дикого типу призвело до збільшення вмісту продуктів

оксидативного пошкодження клітинних біомолекул в мікросомальній, мітохондріальній та цитозольній фракціях.

Зокрема, нами зафіксовано значне підвищення рівня ТВА-активних продуктів у всіх досліджуваних фракціях, показники яких у 2,8 разів перевищували відповідні величини групи тварин дикого типу, яким вводили носій (рис. 3.9). Отримані результати, чітко вказують на індукцію процесів пероксидного окислення ліпідів, індукованого введенням ВРА у всіх досліджуваних фракціях.

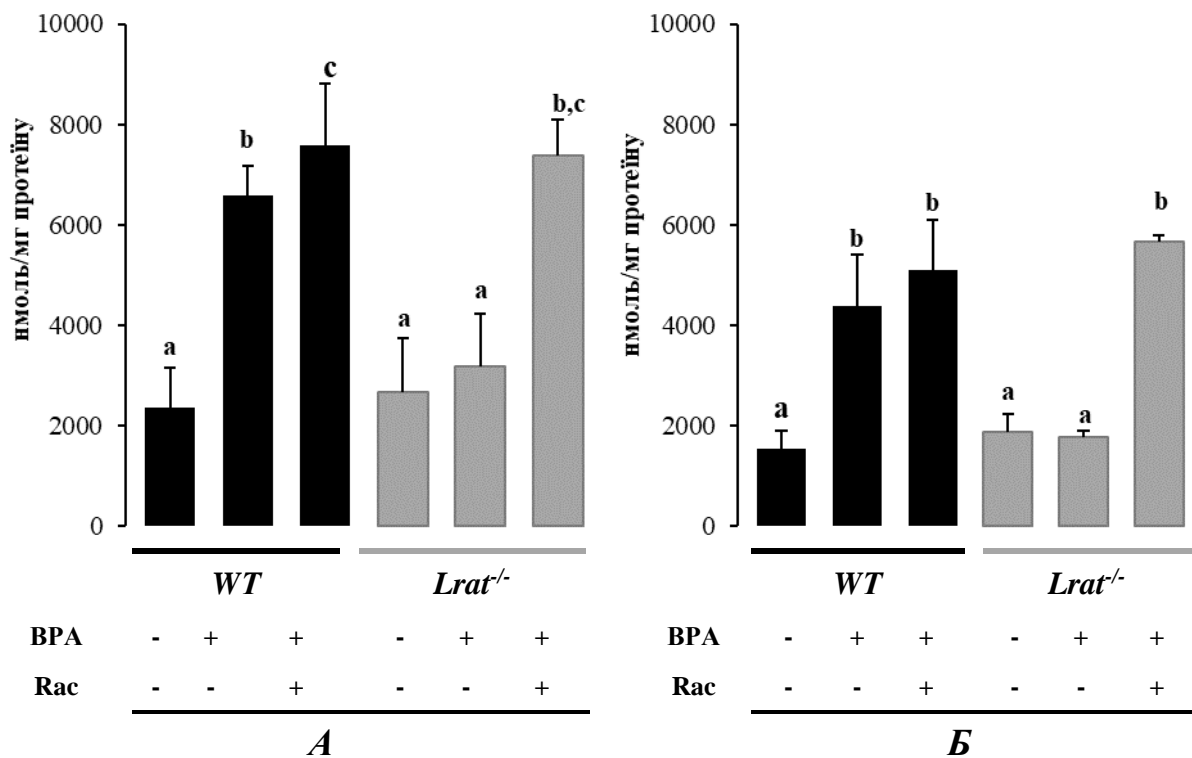


Рис. 3.9. Вміст ТВА-активних продуктів у мікросомальній (А) та мітохондріальній (Б) фракціях печінки тварин за умов введення ВРА та різної саплементації ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Проте зростання вмісту карбонільних груп, що вказує на оксидативне пошкодження протеїнів, при введенні ксенобіотика зафіксовано лише у мікросомальній та цитозольній фракції печінки. Зокрема, даний показник зростав у 3,1 та 2,6 разів у мікросомах та цитозолі, порівняно із величинами у контрольній групі тварин (рис. 3.10 А та 3.11 А). Проте, у мітохондріальній фракції даний показник статистично вірогідно не відрізнявся від показників групи тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами у печінці, яким не вводили даний контамінант (рис. 3.12 А).

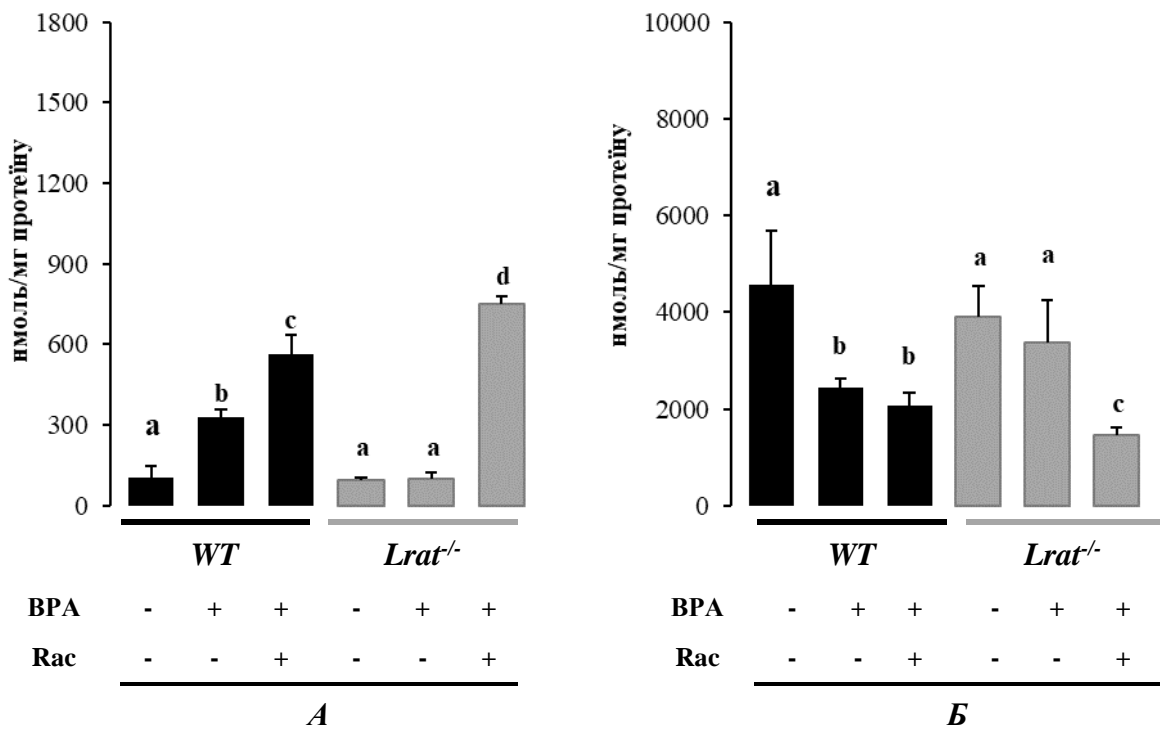


Рис. 3.10. Рівень протеїнових карбонільних груп (А) та SH-груп (Б) у мікросомальній фракції печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat^{-/-}* – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Водночас вміст SH-груп за дії ВРА знижується у всіх досліджуваних фракціях, ймовірно, у зв'язку з тим, що вони є первинною мішенню дії вільних радикалів. Зокрема, вміст тіольних груп знижується у 1,8 рази у мікросомальній фракції (рис. 3.10 Б), та у 1,3 рази – у мітохондріальній (рис. 3.12 Б) та цитозольній (рис. 3.11 Б), порівняно з контрольною групою тварин.

Таким чином, при введенні ВРА відбувається пошкодження всіх субклітинних фракцій печінки, проте найбільші зміни зафіксовані саме в мікросомальній та цитозольній. Отримані результати можуть бути пов'язані з особливостями метаболізму ВРА, який відбувається в ендоплазматичному ретикулумі гепатоцитів.

З літератури відомо [71], що детоксикація ВРА призводить до утворення потенційно токсичних проміжних сполук, у тому числі високоефективних мета-, орто-ОН-ВРА, а також хінонових форм ВРА, які здатні індукувати внутрішньоклітинний оксидативний стрес. Тому ймовірно, за дії ВРА найбільше страждають саме мікросомальна та цитозольна фракції.

Відомо, що при ураженнях печінки, в тому числі індукованих ксенобіотиками, прогресивно втрачаються запаси ефірів ретинолу. Проте поповнення запасів ретиноїдів шляхом їх додаткового введення, не принесло позитивних результатів, а навпаки, зачасту призводило до ще більшого пошкодження печінки.

Аналогічні результати ми отримали при одночасному введенні тваринам дикого типу надвисоких доз Раc та 50 мг/кг ВРА. У цих мишей нами зафіксовано ще більш інтенсивне оксидативне пошкодження протеїнових та ліпідних компонентів печінки. Про це свідчить зростання вмісту ТВА-активних продуктів та протеїнових карбонільних груп у печінці тварин даної групи у 3,3 та 2,2 разів порівняно із контрольною групою мишей дикого типу, та 1,2 і 1,5 разів перевищували відповідні показники тварин даного генотипу, яким вводили ВРА (рис. 3.6 та 3.7 А). Проте введення фармакологічних доз ретиноїдів не знижувало рівень протеїнових та

непротеїнових тіолів, які залишались на рівні величин у групі тварин, яким вводили ВРА та були нижчими в 2 та 4 рази порівняно з величинами контрольної групи, відповідно (рис. 3.7 Б та 3.8).

У мишей даного генотипу введення 3000 МО вітаміну А посилювало оксидативне пошкодження біомолекул лише мікросомальної та цитозольної фракцій. Основні зміни зафіксовано саме стосовно вмісту ТВА-активних продуктів, показники яких у мікросомальній фракції після введення вітаміну А та ВРА у 3,2 рази був вищий за відповідну величину у контрольній групі тварин (рис. 3.9 А). При введенні 3000 МО вітаміну А також зафіксовано підвищення вмісту карбонільних груп у мікросомальній та цитозольній фракціях печінки ВРА-експозиційних тварин. Даний показник був вищим у 1,7 та 1,3 рази порівняно з відповідними величинами у групі тварин, яким вводили ксенобіотик та у 5,3 і 3,3 рази – порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 3.10 А та 3.11 А).

Проте, додаткове введення вітаміну А тваринам дикого типу, не посилювало оксидативні процеси у мітохондріях, індуковані введенням ВРА. Вміст ТВА-активних продуктів, протеїнових карбонільних та тіольних груп статистично-вірогідно не відрізнявся від показників групи тварин дикого типу, яким вводили ксенобіотик (рис. 3.9 А та 3.12).

Таким чином, додаткове введення ретиноїдів супроводжується посиленням оксидативних процесів у печінці, проте збільшення маркерів оксидативного пошкодження ліпідів та протеїнів зафіксовано лише у мікросомальній та цитозольній фракціях. Отримані результати, ймовірно пов'язанні з тим, що ретиноїди, залучені саме у ті ВРА-індуковані процеси, які відбуваються у мікросомальній та цитозольній фракціях, та посилюють пошкодження, викликане введенням ксенобіотику.

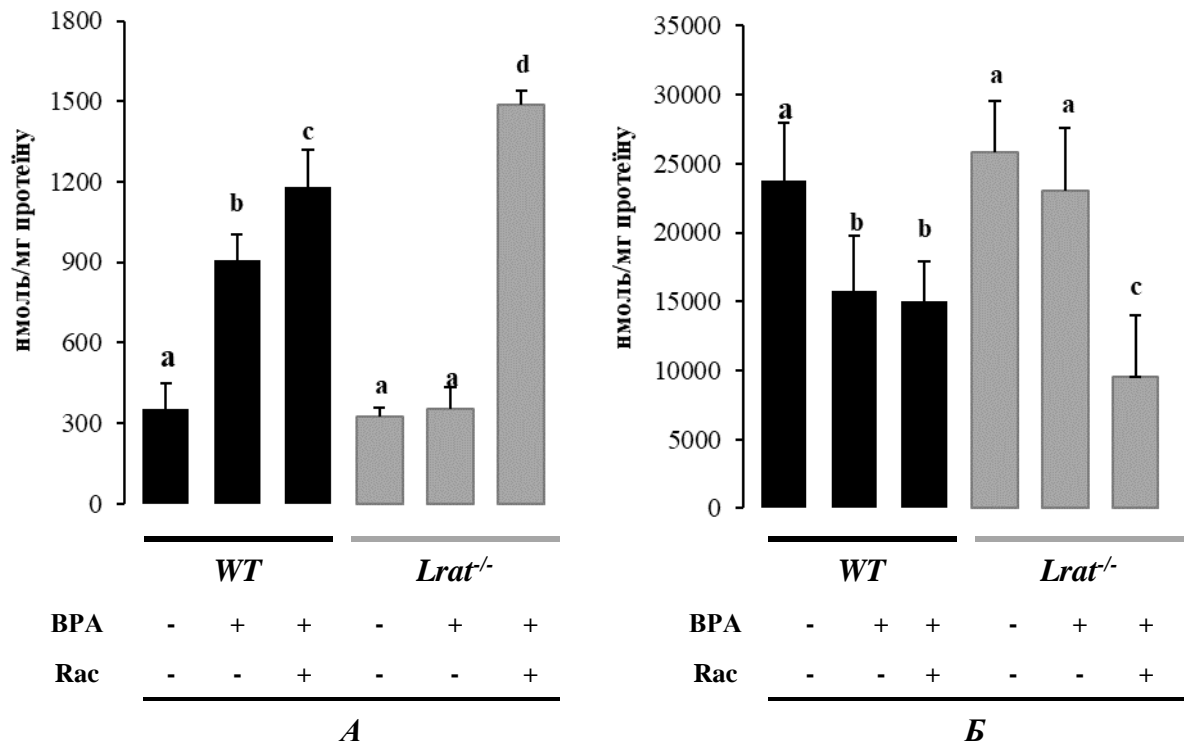


Рис. 3.11. Рівень протеїнових карбонільних груп (А) та SH-груп (Б) у цитозольній фракції печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat^{-/-}* – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Для підтвердження залежності ВРА-прооксидантних ефектів від наявності ретиноїдів у дисертаційній роботі використовували трансгенних тварин, які не мають запасів вітаміну А в печінці, внаслідок нокауту гена лецитин:ретинолацилтрансферази, ензиму, відповідального за етерифікацію ретинолу. У роботі показано, що гостра експозиція цих тварин високими дозами ВРА не супроводжувалась змінами досліджуваних показників у печінці. Вміст рівня ТВА-активних продуктів та карбонільних груп протеїнів, протеїнових та непротеїнових SH груп статистично вірогідно не відрізнялись від показників контрольної групи та знаходились на рівні показників тварин дикого типу, які не отримували ВРА (рис. 3.6-3.8.).

Незмінність показників вмісту маркерів оксидативного пошкодження клітинних біомолекул у печінці трансгенних тварин при введенні ВРА підтверджувалось відсутністю статистичної різниці між вмістом ТВА-активних продуктів, протеїнових карбонільних та SH груп у всіх субклітинних фракціях печінки ВРА-експозиційних тварин та контрольної групи (рис. 3.9-3.12).

Таким чином, отримані результати свідчать, що ретиноїди залучені у процеси вільнорадикального пошкодження клітинних біополімерів у печінці індукованих ВРА. Даний висновок підтверджувався результатами, отриманими після введення трансгенним тваринам надвисоких фармакологічних доз ретиноїдів.

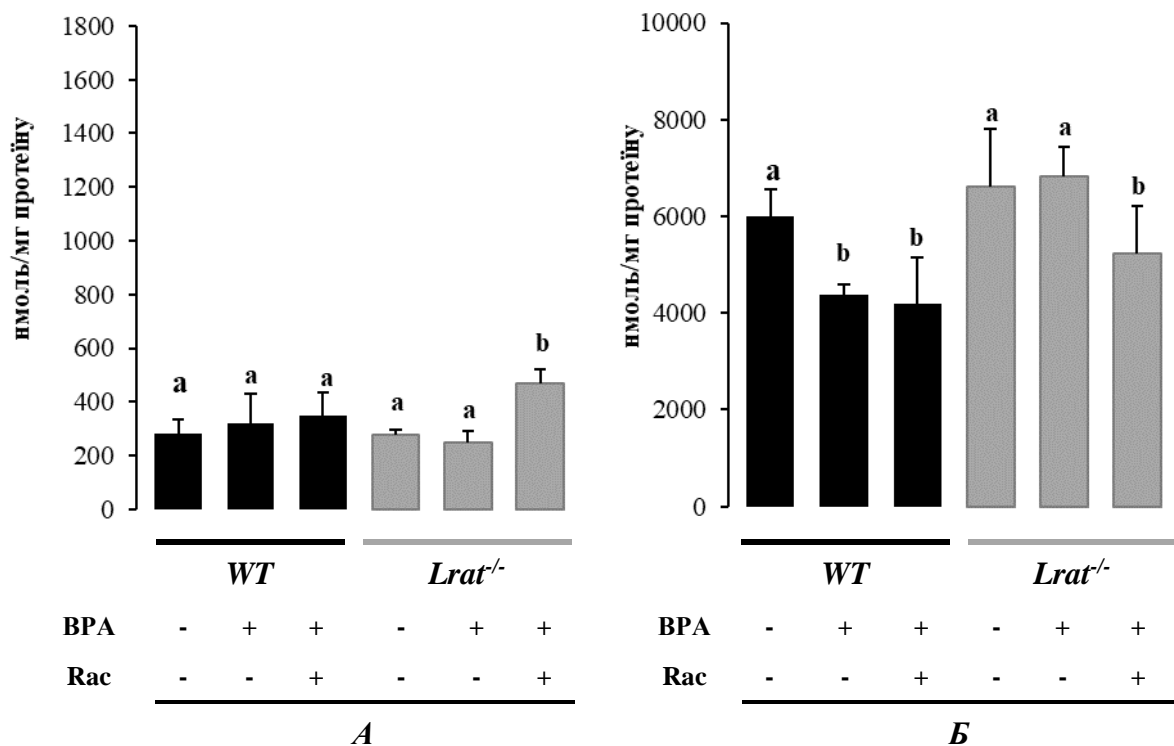


Рис. 3.12. Рівень протеїнових карбонільних груп (А) та SH-груп (Б) у мітохондріальній фракції печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, Lrat^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, P < 0,05.

Зокрема, нами зафіксовано зростання вмісту ТВА-активних продуктів у 3,2 рази порівняно із групою тварин, яким вводили ксенобіотик, та у 3 рази – порівняно із групою контролю (рис. 3.6). Показники вмісту протеїнових карбонільних та SH-груп у паренхімі печінки тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами та ВРА-індукованими вільнорадикальними процесами при введенні фармакологічних доз Рас перевищували у 3 рази й були нижчими у 1,6 разів від показників групи тварин даного генотипу, яким вводили лише ксенобіотик (рис. 3.7). У цієї групи також зафіксоване зниження вмісту непротеїнових SH-груп у тканині печінки (рис. 3.8).

Щодо пошкоджень окремих субклітинних фракцій, то додаткове введення Рас тваринам *Lrat*^{-/-} призвело до збільшення рівнів продуктів окислення ліпідів та протеїнів у всіх субклітинних фракціях печінки тварин цієї групи (рис. 3.9-3.12). Рівні маркерів окисдатовного пошкодження ліпідів та протеїнів у субклітинних фракціях мишей *Lrat*^{-/-}, яким вводили як ВРА, так і Рас, досягали рівнів, які спостерігались у тварин дикого типу після застосування ВРА, а у деяких випадках, навіть перевищували їх.

Зокрема, у цій групі тварин найбільш значні зміни рівня карбонільних груп та протеїнових тіолів, як основних показників окисдатовної модифікації протеїнів, спостерігались у мікросомальній фракції печінки (рис. 3.10). Вміст карбонільних груп збільшився в 7,6 разів, тоді як рівень протеїнових тіолів знизився у 2,3 рази порівняно з відповідними показниками мишей *Lrat*^{-/-}, які отримували лише ВРА. У даній групі тварин зафіксовано також і окисдатовне пошкодження протеїнів цитоплазматичної фракції печінки. Вміст протеїнових карбонільних груп збільшився у 4,2 рази та вміст тіольних – зменшився у 2,4 рази, порівняно з групою трансгенних тварин, яким вводили ксенобіотик (рис. 3. 11).

Менш виражені зміни при введенні 3000 МО Рас ВРА-експозиційним тваринам-нокаутам зафіксовано у мітохондріальній фракції. Зокрема, у останній зафіксовано незначне окисдатовне пошкодження протеїнів, що

виражалось у зростанні у 1,9 разів вмісту карбонільних груп та зменшенні у 1,5 разів вмісту SH груп порівняно з групою трансгенних тварин, яким вводили ксенобіотик (рис. 3.12).

Таким чином, отримані результати, очевидно, свідчать про залежність індукції вільнорадикального пошкодження клітинних біомолекул печінки, за дії ВРА від наявності/доступності ретиноїдів.

Отримані результати підтверджуються численними дослідженнями, які продемонстрували можливість модуляції гепатотоксичності ліків та хімічних токсичних сполук шляхом додаткового введення вітаміну А. Зокрема дослідження *Banger et al.* показали, що введення ретинолу потенціює CCl_4 -індуковану гепатотоксичність, зокрема спостерігалось значне зростання рівня CYP2E1, ALT активності, посилене генерування супероксидного радикалу. Дослідження *Bray* показали, що при додатковому введенні ретиноїдів при ацетоамінофен-індукованій гепатотоксичності спостерігалось зростання рівня CYP, виснаження запасів глутатіону та більш високий ступінь пошкодження печінки [54]. Таким чином ретинол ініціював біоактивацію даних ксенобіотиків через індукцію CYP2E1 та прогресування пошкодження гепатоцитів [141, 142]. Також *Yang et al.* проводили дослідження впливу ретиноїдів на метаболізм 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-діоксину. В результаті даного експерименту фіксувалось зростання відносної маси печінки при введенні даного ксенобіотика та значне збільшення даного показника при додатковому введенні ефірів ретинолу. Інші наші дослідження [143], показали, що 4-разове пероральне введення мишам вітаміну А у формі 3000 MO Rac через 12-годинні інтервали після введення гепатотоксину тіоацетаміду сприяло посиленню гострої гепатотоксичності.

Отже, короткотривале введення 50 мг/кг бісфенолу А супроводжується індукцією вільнорадикального пошкодження клітинних біомолекул у печінці, причому найбільше накопичення продуктів оксидативного

пошкодження біомолекул печінки зафіксовано у мікросомальній та цитозольній фракції, що ймовірно пов'язано із особливостями детоксикації ВРА. Додаткове пероральне введення надвисоких доз ацетату ретинолу поглиблювало ВРА-індуковані вільнорадикальні процеси. Це підтверджено результатами, отриманими від тварин-нокаутів та застосуванні надвисоких доз вітаміну А цим тваринам [86].

Виявлені ефекти, ймовірно, пов'язані зі здатністю ретиноїдів впливати на активність компонентів детоксикаційної системи печінки (див. розділ 1.3.), особливо СYP – ключового ензиму I фази детоксикації. Тому нами було проведено дослідження ензиматичних активностей I та II фаз детоксикаційної системи печінки за умов різної забезпеченості ретиноїдами [144].

3.2.2. Активність бісфенол А-метаболізуючих ензимів клітинної системи біотрансформації

Печінка є головним органом метаболізму бісфенолу А, де основна частина даного ксенобіотика піддається біотрансформації, що полягає в утворенні інертних метаболітів. Метаболізм ВРА відбувається переважно за трансферазним шляхом у мікросомах печінки, наслідком чого є утворення неактивних, інертних кон'югатів, що виводяться з організму з жовчю [5]. До даного процесу залучена UGT-глюкуронозилтрансфераза, сульфотрансфераза та глутатіон-S-трансфераза, що каталізують утворення водорозчинних метаболітів ВРА: ВРА-глюкороніду, ВРА-сульфату та конюгату ВРА з глутатіоном [71, 145, 146].

За умов надходження в організм високих доз, ВРА підлягає СYP-опосередкованому окисненню, в результаті чого утворюються окремі стабільні гідроксильовані метаболіти, зокрема 5-гідрокси-ВРА, 3-гідрокси-бісфенол А та 4-метил-2,4-біс (4-гідроксифеніл)пент-1-ен [6]. СYP-опосередковані модифікації ВРА можуть призвести до утворення нестабільних реактивних інтермедіатів та радикальних фрагментів, що

здатні до індукції оксидативного пошкодження та клітинної дисфункції. Особливості метаболізму ВРА підсумовані нами у схемі (рис. 3.13).

У джерелах літератури вказано, що метаболізм бісфенолу А є індукцибельним [67], в тому числі транскрипційний контроль ВРА-метаболізуючих ензимів з наступною взаємодією ВРА та активацією лігандзалежних ядерних рецепторів [64, 147, 148].

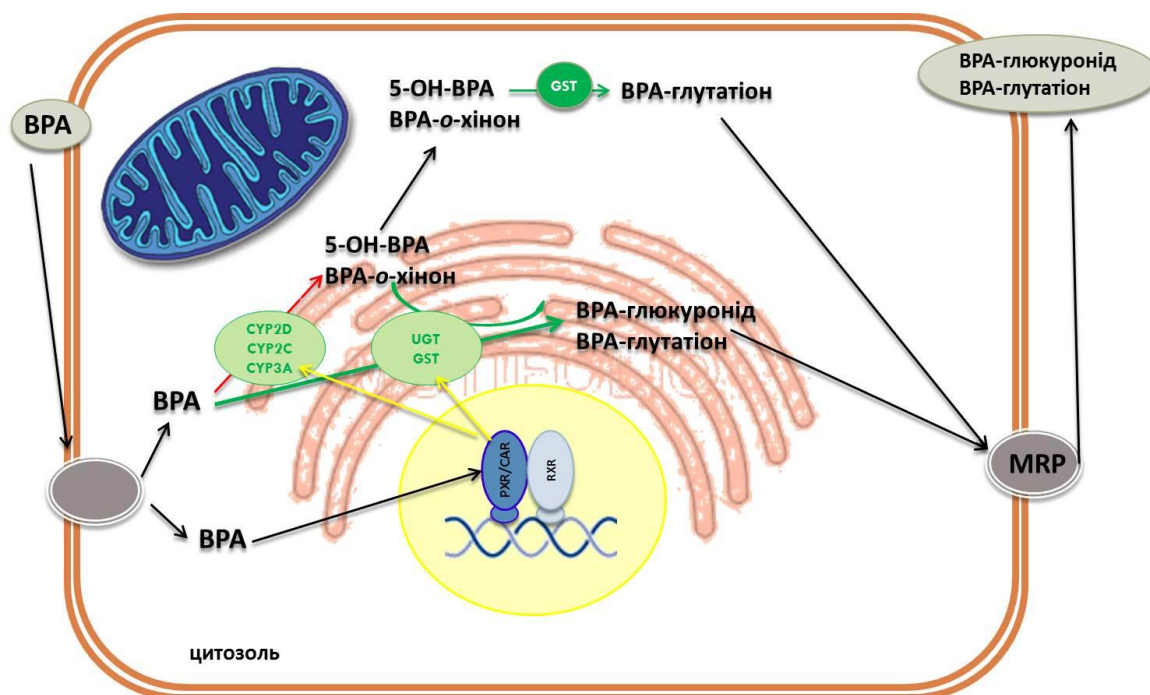


Рис. 3.13. Загальна схема метаболізму ВРА в гепатоциті

Результати проведених досліджень показали, що введення 50 мг/кг бісфенолу А тваринам із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, на 72 годину експерименту призводить до індукції СYP активності, дія яких зводиться до гідроксилювання ВРА [70]. Зокрема, мікросомальна анілін *p*-гідроксилазна та диметиланілін *N*-деметилазна активності I фази були значно збільшені (в 2 та 2,3 рази) порівняно з тваринами дикого типу, яким вводили лише носій (рис. 3.14), причому найбільші показники фіксувались для *p*-гідроксилазної активності. *N*-оксигеназна активність також була підвищена в 1,4 рази порівняно з відповідними величинами у контрольних тварин (рис. 3.15).

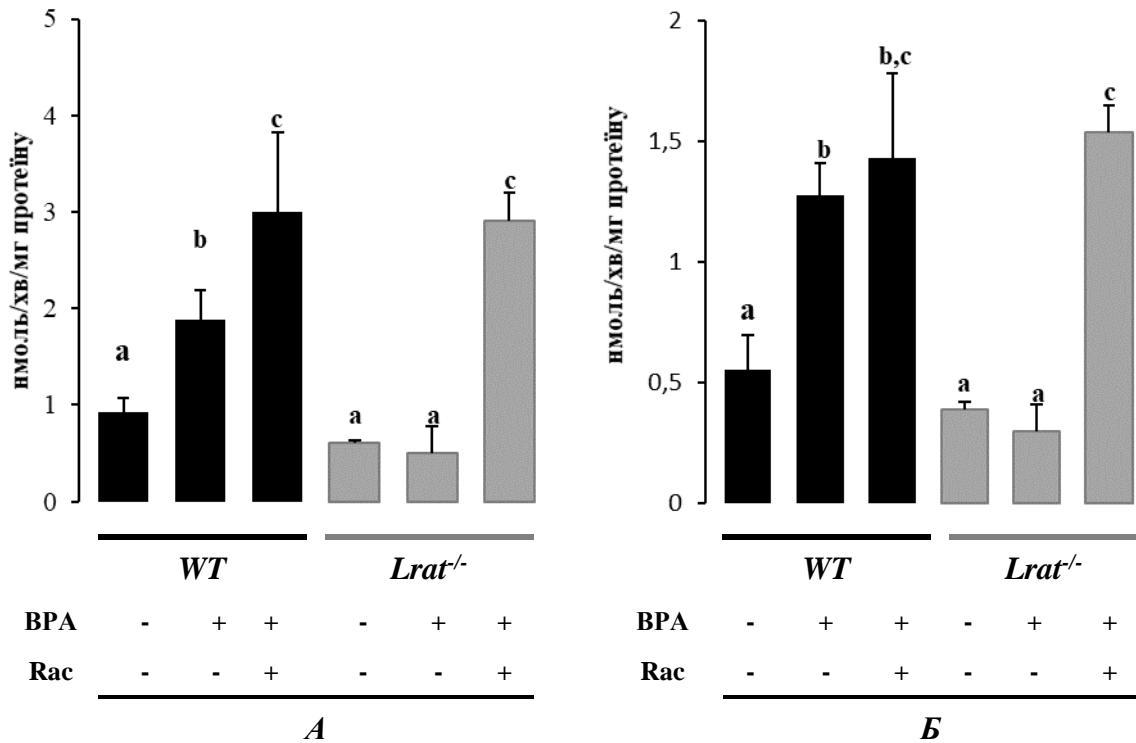


Рис. 3.14. *p*-гидроксилазна (А) та N-деметилазна активності в мікросомальній фракції печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Зафіксоване зростання маркерних монооксигеназних активностей є логічним, з огляду на потребу детоксикації даного ксенобіотика, введення якого проводили у досить високих дозах.

Існує велика кількість опублікованих даних про те, що для оптимального функціонування системи детоксикації ксенобіотиків необхідні ретиноїди (вітамін А, його метаболіти та синтетичні аналоги) (див. розділ 1.3.1.). Тому наступним етапом дослідження було встановити активність ВРА-метаболізуючих ензимів за умов різної забезпеченості ретиноїдами.

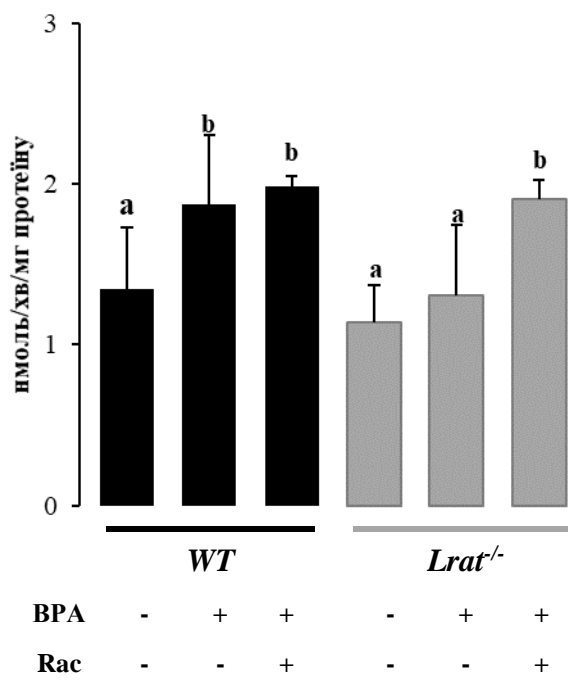


Рис. 3.15. N-оксигеназна активність в мікросомальній фракції печінки тварин в печінці тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Результати наших досліджень показали, що за відсутності печінкових запасів ретиноїдів (тварини *Lrat*^{-/-}) індукції даних монооксигеназних активностей не фіксувались. Зокрема, вищезазначені ензиматичні активності були однаковими для тварин *Lrat*^{-/-} (які нездатні етерифікувати ретинол у печінці, і як наслідок – позбавлені ендогенно-депонованих ретиноїдів), що отримували ксенобіотик та тварин-нокаутів, які отримували пероральну дозу кукурудзяної олії. Крім того, дані активності статистично-вірогідно не відрізнялись від тотожних показників контрольної групи тварин дикого типу та були значно нижчими за монооксигеназні активності у мікросомах печінки тварин із нормальною забезпеченістю VA, яким вводили ксенобіотик (рис. 3.14 та 3.15).

Отримані результати, в першу чергу, пов'язані із тим, що відсутність печінкових запасів ефірів ретинолу, очевидно, зумовлює відсутність доступної RA, яка виступає лігандом для RXR [149]. Останній є гетеродимерним партнером для багатьох ядерних рецепторів-ксеносенсорів, зокрема CAR та PXR, які регулюють експресію генів, продуктами яких є цитохроми родини 2C, що метаболізують ВРА до вільнорадикальних метаболітів.

Щоб підтвердити висновок про те, що ВРА-індукована детоксикація залежить від забезпеченості ретиноїдами, ми проводили пероральне введення 3000 МО ацетату ретинолу через 12-годинні інтервали тваринам обох генотипів після введення ВРА. Таке введення VA, як у тварин дикого типу, так і у тварин *Lrat^{-/-}*, після експозиції ВРА призвело до значного підвищення активності CYP (рис. 3.14 та 3.15). Зокрема, показники *p*-гідроксилування аніліну, опосередкованого CYP, та деметилування диметиланіліну у тварин-нокаутів збільшилися відповідно у 5,8 та 5,3 рази, порівняно з відповідними величинами у тварин, яким не вводили ацетат ретинолу (рис. 3.14). N-оксигеназна активність також була збільшена у тварин-нокаутів, які отримували аліментарні ретиноїди та ВРА (рис. 3.15). З одного боку підвищення активності може бути зумовлено наявністю ретиноєвої кислоти (отриманої з аліментарних ретиноїдів), що залучена в регуляцію CYP. З іншого, оскільки ці тварини не здатні зберігати вітамін А у печінці, підвищення монооксигеназних активностей може бути пов'язано із необхідністю метаболізувати надлишкові кількості ретиноїдів. Причому, оскільки ВРА метаболізується CYP родини 2C, які також залучені до катаболізму ретиноєвої кислоти до її оксо-форм, він може конкурувати за дані ензими, і таким чином, буде відбуватись порушення метаболізму як ВРА, так і катаболізму ретиноїдів.

Для тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, при додатковому введенні VA ми спостерігали подальшу індукцію активності *p*-

гідроксилування аніліну, тоді як інші види активностей залишалися незмінними порівняно із тими, що спостерігалися після введення ВРА. Це може пояснюватись тим, що тварини дикого типу можуть запасати ретинол у печінці, тому нами не було зафіксовано значного зростання монооксигеназних активностей при введенні 3000 МО ацетату ретинолу.

Одночасно у дисертаційному дослідженні проведено визначення активності ксантиноксидази, яка локалізована в цитозолі клітини, та є репрезентативним ферментом I фази детоксикації, що володіє широкою субстратною специфічністю. Даний ензим належить до родини молібденових гідролаз, та є однією із форм ксантиноксидоредуктази [150]. Специфічна активність даного ензиму в печінці мишей дикого типу була значно підвищена (в 5 разів) при введенні ВРА (рис. 3.16).

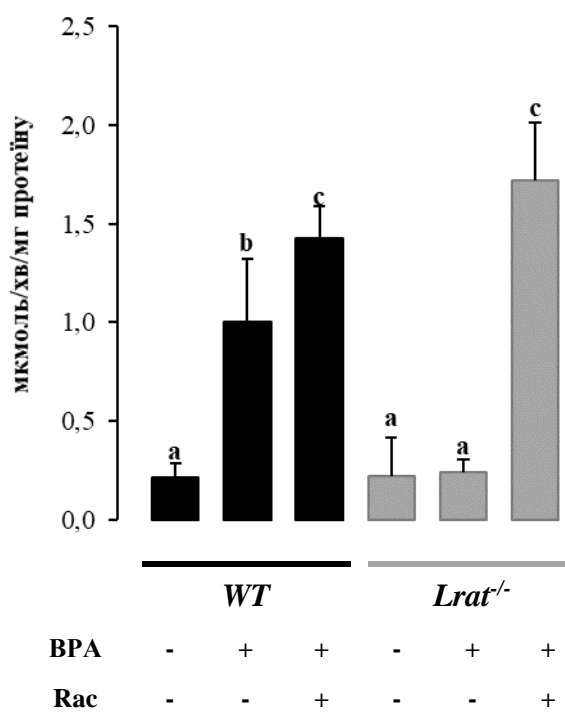


Рис. 3.16. Ксантиноксидазна активність цитозольної фракції в печінці тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, Lrat^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, P < 0,05.

Водночас, у печінці тварин, позбавлених ендогенних запасів ретиноїдів при експозиції бісфенолом А, активність ксантиноксидази залишалася незмінною порівняно із відповідним показником у тварин контрольної групи та статистично-вірогідно не відрізнялась від показників групи тварин із нормальним забезпеченням VA, яким вводили носій. Отримані результати, можуть бути пов'язані з тим, що активність даного ензиму залежить від наявності ретиноїдів. Зокрема, ксантиноксидаза каталізує перетворення повністю-*транс*-ретинолу через повністю-*транс*-ретиналь до ретиноєвої кислоти [151], а оскільки у трансгенних тварин відсутні запаси ефірів ретинолу, то зафіксовану низьку ензиматичну активність можна пояснити відсутністю субстрату.

Проте, додавання ацетату ретинолу тваринам *Lrat*^{-/-} призвело до підвищення специфічної активності XO, коли цим тваринам вводили бісфенол А, що очевидно, пов'язано з необхідністю метаболізувати високі дози ретинолу, які не можуть запасатись у стелатних клітинах через відсутність ензиму лецитин:ретинолацилтрансфери. Утворена ретиноєва кислота в подальшому за участі CYP та UGT виводиться з організму. Даний показник у цій групі тварин перевищував у 7 разів XO активність у групі тварин, яким вводили контамінант, та статистично-вірогідно не відрізнявся від даної ензиматичної активності у тварин дикого типу, які отримували ВРА та піддавались додатковому введенню аліментарних ретиноїдів. Цей показник у даній групі тварин становив перевищував на 42% ензиматичну активність зафіксовану у ВРА-експозиційних тварин, та у 6,7 разів – у тварин дикого типу контрольної групи (рис. 3.16).

Таким чином, введення високих доз ВРА тваринам дикого типу супроводжується індукцією монооксигеназної системи та ксантиноксидази. Підвищення даних активностей спостерігається при додатковому введенні ретиноїдів, що свідчить про залежність оксигеназної біотрансформації ВРА

від забезпеченості вітаміном А та підтверджується відсутністю індукції СYP та XO у тварин, позбавлених ендогенних запасів ефірів ретинолу у печінці.

До метаболізму бісфенолу А також залучені кон'югуючі ензими II фази системи біотрансформації, зокрема UDP-глюкуронілтрансфераза та глутатіон-S-трансфераза.

Результатами наших досліджень показано, що введення ВРА в умовах із нормальною забезпеченістю ретиноїдами призводить до індукції ензиматичних активностей II фази детоксикаційної системи [152]. Зокрема, активність ензиму, залученого до утворення кон'югатів ВРА-глюкуронідів – UDP-глюкуронозилтрансферази, була підвищена на 28 % в мікросомальній фракції печінки тварин дикого типу, яким вводили ВРА (рис. 3.17).

У даній групі тварин також проводили визначення в цитозольній та мікросомальній фракціях глутатіон-S-трансферазної активності – ензиму відповідального за кон'югацію як ВРА, так його окиснених метаболітів з глутатіоном. В переважній більшості кон'югація з даним трипептидом є презентацією однієї із детоксикаційних реакцій, що захищає основні клітинні нуклеофіли такі, як білки та ДНК від ковалентної модифікації [7, 18]. У тварин дикого типу дана ензиматична активність індукується як в мікросомальній, так і в цитозольній фракції при введенні ВРА. Зокрема, активність GST у вищезазначених субклітинних фракціях печінки у 8,9 та 2,3 рази перевищували відповідні показники у тварин дикого типу, яким вводили носій. Проте, в абсолютному значенні рівень індукції специфічної активності мікросомальної GST був набагато вищим (на 60%), ніж той, який спостерігався для специфічної активності цитозольної ізоформи (рис. 3.18).

Таким чином, введення ксенобіотика, за умов нормальної забезпеченості ретиноїдами супроводжувалось підвищенням основних трансферазних активностей у мікросомальній та цитозольній фракціях печінки, що є очевидним, з огляду на потребу в детоксикації ВРА, шляхом утворення кон'югантів з глюкуроновою кислотою та глутатіоном.

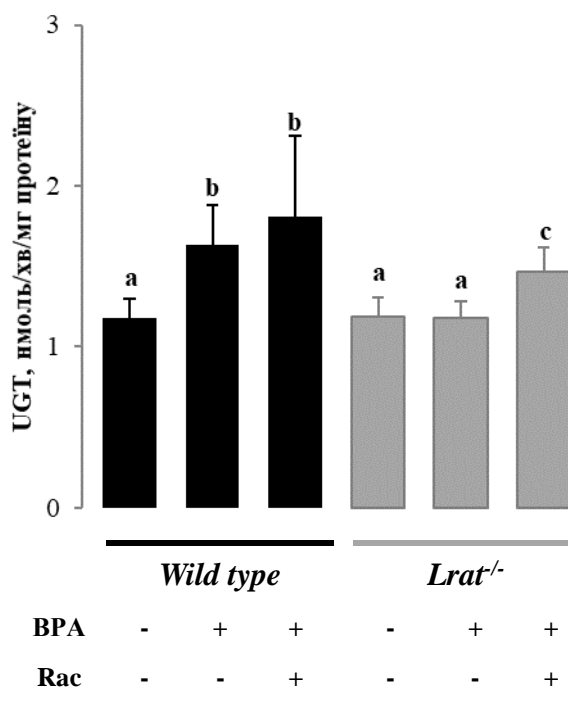


Рис. 3.17. UDP-глюкуронілтрансферазна активність у мікросомальній фракції печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Раc – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Водночас, введення 3000 МО Раc при введенні ВРА тваринам дикого типу призвело до збільшення мікросомальних та цитозольних GST активностей II фази приблизно в 1,7 та 2,9 разів відповідно, порівняно з величинами у групі тварин дикого типу, яким вводили ксенобіотик (рис. 3.18). Отримані результати, з одного боку, можуть бути пов'язані з тим, що ретиноїди залучені у регуляцію активності даних ензимів. З іншого – підвищення GST активностей може бути пов'язано з посиленням за дії СYP (індукцію яких зафіксовано при додатковому введенні ретиноїдів) утворенням окиснених метаболітів ВРА як субстратів GST.

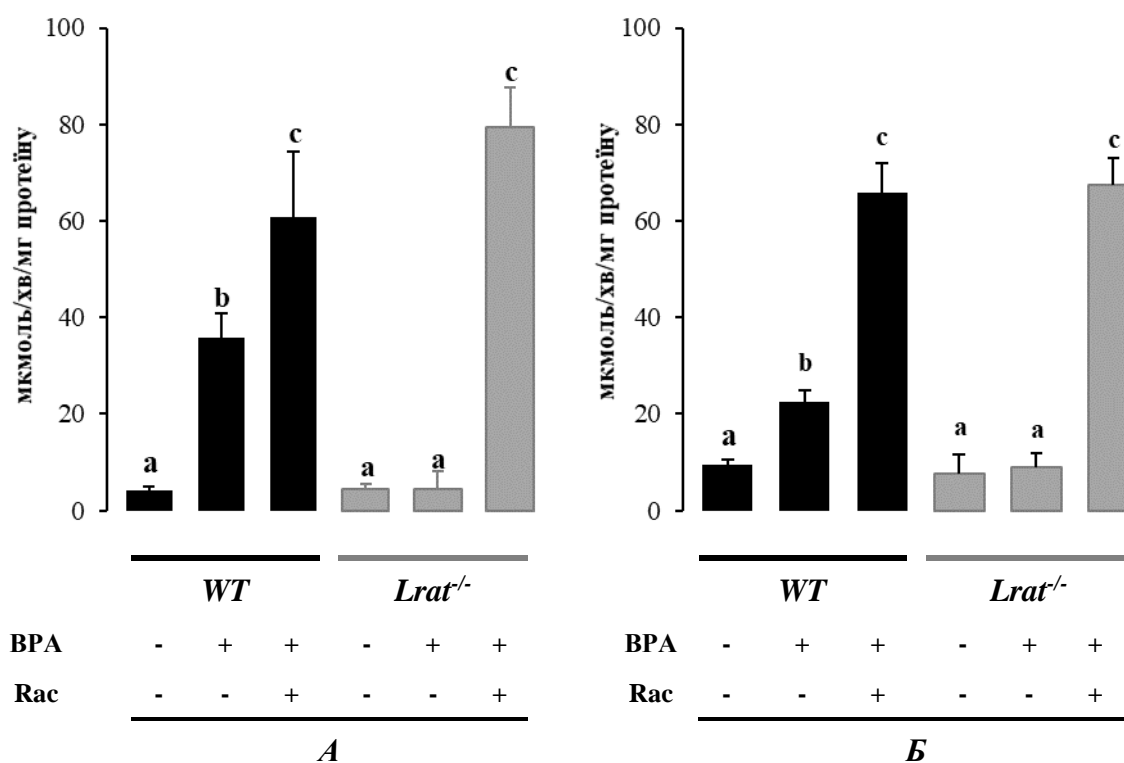


Рис. 3.18. Глутатіон-S-трансферазна активність у мікросомальній (А) та цитозольній (Б) фракціях печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

При введенні фармакологічних доз ретиноїдів тваринам дикого типу, яким вводили ВРА, не зафіксовано збільшення UGT активності в мікросомальній фракції (рис. 3.17), показник якої статистично вірогідно не відрізнявся від відповідної величини в ВРА-експозиційній групі тварин контрольної групи. Можливо, це пов'язано з тим, що ці тварини здатні естерифікувати введений вітамін А для зберігання у формі ефірів ретинолу, і тому не виникає потреба катаболізувати перорально отримані ретиноїди, які можуть депонуватись у печінці.

Для перевірки залежності функціонування трансферазних активностей від наявності ретиноїдів, ми проводили введення ВРА

тваринам, позбавлених ендогенних печінкових запасів ефірів ретинолу. Результати досліджень показали, що введення ВРА не призвело до збільшення специфічних UGT та GST активностей (рис. 3.17 та 3.18). Дані показники статистично вірогідно не відрізнялись від відповідних величин ензиматичних активностей у субклітинних фракціях печінки твариннокаутів контрольної групи. Однією з причин відсутності індукції трансферазних активностей може бути недостатність ретиноєвої кислоти, яка необхідна для оптимального функціонування досліджуваних ензимів. Проте, іншим поясненням може бути інгібування UGT та GST за дії ВРА. Оскільки за умов відсутності ендогенно-депонованих ретиноїдів, не відбувається індукції СYP, що підтверджено зафіксованими зниженими ензиматичними активностями, то ВРА не метаболізується за оксигеназним шляхом, а підлягає дії трансфераз. А оскільки введення ВРА проводили у достатньо високих дозах, частина ксенобіотика взагалі не метаболізується та, як відомо з джерел літератури [153–155], може інгібувати UGT та GST активності. Крім того, не метаболізований ВРА у цих тварин може проявляти інші токсичні ефекти, зокрема діяти як ксеноестроген, та володіти репродуктивною й ембріональною токсичністю.

Водночас, додаткове введення 3000 МО ацетату ретинолу цим тваринам супроводжувалось значним збільшенням GST активності (рис. 3.18) у всіх субклітинних фракціях. Даний показник у мікросомальній та цитозольній фракціях печінки у 18 та 7,6 разів перевищував відповідні показники у твариннокаутів, які отримували ксенобіотик. Отримані результати, ймовірно пов'язані, з посиленням утворенням метаболітів ВРА за дії СYP (індукцію активностей якого нами зафіксовано у трансгенних тварин при введенні 3000 МО Раc), які піддаються дії GST, для виведення з організму. Крім того, посилена робота I фази детоксикації може призвести до посиленого генерування супероксидного радикалу (результати будуть викладені у розділі 3.2.3), який за одночасного генерування оксиду азоту (що зафіксовано нами

лише при додатковому введенні вітаміну А) може перетворитись на пероксинітрит. З даних літератури відомо [156], що дана ROS може підвищувати активність GST, шляхом нітрування 92 залишку тирозину у структурі молекули. Це може пояснити й підвищення GST активності у тварин дикого типу після введення вітаміну А та ВРА.

Крім того, в ВРА-експозиційних тварин *Lrat^{-/-}* при введенні 3000 МО Раc зафіксовано зростання (24%) специфічної UGT активності у мікросомальній фракції печінки тварин, позбавлених ендогенних запасів ефірів ретинолу (рис. 3.17). Отримані результати можна пояснити відновленням індукції даної ензиматичної активності, за додаткового введення фармакологічних доз ретиноїдів у трансгенних тварин. Проте за цих же умов відновлюється індукція маркерних монооксигеназних активностей, які залучаються до катаболізму ретиноєвої кислоти. Окиснені метаболіти останньої є субстратом для UGT, і у формі глюкуронідів виводяться з організму. Тому зростання даної ензиматичної активності, ймовірно буде зумовлено зростанням концентрації субстрату.

Таким чином, наші результати встановили, що ендогенно-депоновані ретиноїди, що зберігаються в стелатних клітинах печінки, або екзогенні ретиноїди, отримані з раціону, необхідні для індукції гідроксилювання ВРА. Однак, коли запаси печінкових ретиноїдів відсутні, як у тварин *Lrat^{-/-}*, відбувається або порушення біотрансформації ВРА, або взагалі даний ксенобіотик не метаболізується, що, в свою чергу може призвести до індукції класичних токсичних ефектів ВРА, як ксеноестрогена. Водночас пероральне введення 3000 МО ацетату ретинолу тваринам *Lrat^{-/-}* відновило здатність цих мишей-нокаутів нормально реагувати на введення ВРА, підвищуючи активності біотрансформуючих ензимів [157].

3.2.3. Інтенсивність генерування супероксидного аніон-радикалу та оксиду азоту субклітинними фракціями печінки

Як побічний продукт метаболізму ВРА, за рахунок одноелектронного відновлення кисню можуть утворюватись його активні форми [158]. Крім того, індукція системи детоксикації печінки може супроводжуватись генеруванням ROS. Існує 2 «шунти» в межах каталітичного циклу СYP, які можуть генерувати вільні радикали. В результаті першого з них утворюється супероксидний радикал через втрату відновленого кисню, який потім швидко дисмутує з утворенням гідрогену пероксиду. Інший – пряме утворення останнього після додавання протону до відновленого кисню [159].

Результати наших досліджень показали, що введення ВРА тваринам дикого типу призвело до підвищеного утворення $O_2^{\cdot-}$ в мікросомальній фракції. Даний показник у цій групі тварин у 4,6 разів перевищував інтенсивність генерування супероксидного радикалу, порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 3.19 А). Отримані результати, ймовірно, пов'язані з підвищеними активностями монооксигеназної системи, що зафіксовано нами у тварин дикого типу при введенні ВРА. Варто зазначити, що інтенсивність генерування даної ROS у мікросомальній фракції навіть досягала показника утворення супероксидного радикалу у мітохондріальній фракції, в якій, як відомо, дихальний ланцюг виступає основним генератором даної ROS.

При введенні ВРА даний показник у цій субклітинній фракції зростав у 2 рази, порівняно із контрольною групою тварин дикого типу (рис. 3.19 Б). Такі результати можуть бути пов'язані з порушенням роботи дихального ланцюга [160], ймовірно, через індукцію процесів пероксидного окислення ліпідів, що підтверджено у наших дослідженнях зростанням вмісту ТВА-активних продуктів у мітохондріальній фракції при введенні ВРА.

Ще одним генератором супероксидного радикалу може виступати цитозольний ензим ксантиноксидоредуктаза, а саме її O-форма, яка, використовуючи в якості акцептора електронів кисень, здатна генерувати $O_2^{\cdot-}$.

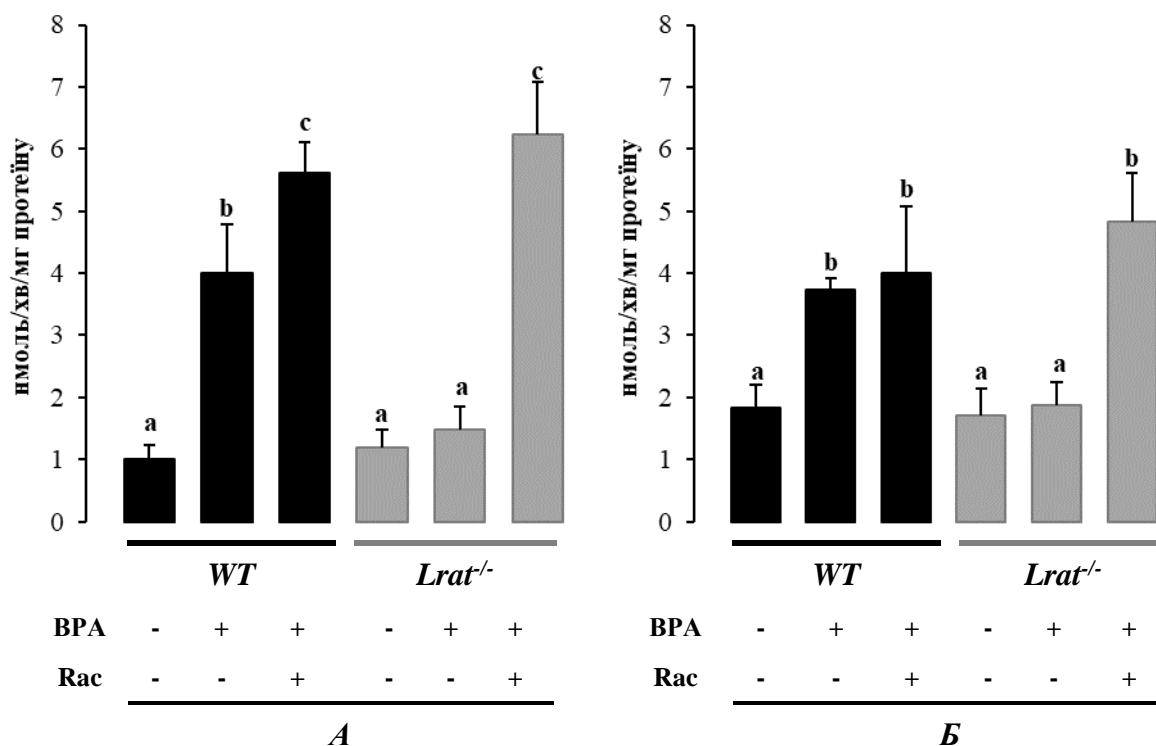


Рис. 3.19. Інтенсивність генерування супероксид аніон радикалу мікросомальною (А) та мітохондріальною (Б) фракціями печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat^{-/-}* – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

При введенні ВРА тваринам із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, зафіксовано посилене генерування вищезазначеної активної форми кисню, показник якого у цій групі тварин перевищував відповідну величину в контрольній групі на 59% (рис. 3.20). Отримані дані є логічними, та підтверджують зафіксоване нами підвищення оксидазної активності ксантиноксидоредуктази у тварин з нормальною забезпеченістю ретиноїдами при введенні ВРА.

Таким чином, при введенні ВРА спостерігається посилення генерування супероксидного радикалу у всіх субклітинних фракціях, що призводить до індукції вільнорадикальних процесів, підтвержене підвищенням вмістом

маркерів оксидативного пошкодження ліпідів та протеїнів у мікросомальній, мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки при введенні ВРА. Наші результати підтверджуються експериментальними даними, що свідчать про те, що введення ВРА *in vitro* та *in vivo* супроводжується індукцією активних форм кисню (ROS), що лежать в основі розвитку окисного стресу [79, 123, 124].

Водночас, додаткове введення 3000 МО Раc тваринам дикого типу призводило до посиленого генерування супероксидного радикалу лише у мікросомальній фракції, показник якого у 1,4 і 6,5 разів перевищував відповідні величини у групі тварин, яким вводили ВРА та контролю (рис. 3.19 А), що ймовірно пов'язано з зафіксованими підвищеними активностями монооксигеназної системи, при введенні аліментарних ретиноїдів.

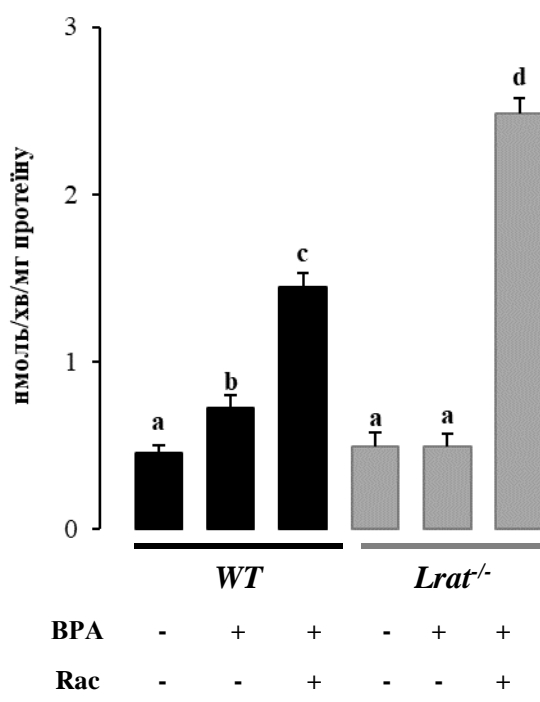


Рис. 3.20. Генерування супероксид аніон радикалу ксантинооксидазою у печінці тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами
 римітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, Lrat^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Раc – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, P < 0,05.

Проте, додаткова експозиція фармакологічними дозами ацетату ретинолу у тварин не впливала на генерування супероксидного радикалу у мітохондріальній фракції, посилене внаслідок введення ВРА. Показник генерування у цій групі тварин статистично-вірогідно не відрізнявся від інтенсивності його утворення у тварин, яким вводили лише ВРА (рис. 3.19 Б).

Крім того, додаткове введення фармакологічних доз ретиноїдів ВРА-експозиційним тваринам дикого типу супроводжувалось 2-разовим зростанням цитозольного генерування супероксидного радикалу ХО, порівняно із групою тварин даного генотипу, яким вводили ВРА та у 3,2 рази порівняно із відповідною величиною у контрольній групі мишей.

Таким чином, отримані результати, ймовірно, свідчать про те, що фармакологічні дози ретиноїдів впливають на продукування супероксидного радикалу саме мікросомальною та цитозольною фракціями, ймовірно, через зафіксоване нами підвищення активності монооксигеназної системи та О-форми ксантинооксидази.

Дані результати підтвержені даними, отриманими від ВРА-експозиційних тварин, які не мають запасів ефірів ретинолу у печінці. Введення ксенобіотика нокаутним мишам не супроводжувалося збільшенням генерування супероксиду у всіх субклітинних фракціях, як це зафіксовано для тварин дикого типу. Усі досліджувані показники статистично-вірогідно не відрізнялись від показників тварин-нокаутів, яким вводили носій, та тварин дикого типу контрольної групи (рис. 3.19-3.20). Отримані результати, ймовірно, пов'язані із відсутністю індукції маркерних монооксигеназних ензиматичних активностей та незмінністю активності О-форми ксантинооксидази при введенні цим тваринам ВРА.

Водночас, додаткове введення фармакологічних доз Рас тваринам *Lrat^{-/-}* стимулювало утворення $O_2^{\cdot-}$ у мікросомальній та цитозольній фракціях, що узгоджується з зафіксованим нами у тварин-нокаутів за цих експериментальних умов відновленням індукції ензиматичних

монооксигеназних активностей та підвищенням оксидазної активності XOR, зафіксоване за цих експериментальних умов у тварин-нокаутів. Причому, мікросомальна фракція печінки кількісно була найбільшим джерелом $O_2^{\cdot-}$. Швидкість генерування супероксиду мікросомами печінки тварин цієї групи у 4,2 рази перевищувала відповідну величину у групі трансгенних тварин, яким вводили ВРА (рис. 3.19 А) та на 29% була вища за відповідний показник у мітохондріальній фракції печінки цієї ж групи тварин.

Одночасно із посиленням генерування $O_2^{\cdot-}$ при введенні ВРА та 3000 МО Рас, нами зафіксовано посилене утворення за дії NO-синтази оксиду азоту (NO^{\cdot}) як сигнальної молекули [161].

Результати наших досліджень показали, що лише за умов комбінованого введення вітаміну А та 50 мг/кг ВРА спостерігається посилення цитозольного генерування NO^{\cdot} та збільшення його вмісту як у тварин-нокаутів, так і у тварин дикого типу (рис. 3.21). З джерел літератури відомо [162], що ретиноева кислота, у даному випадку отримана з перорально введеного ацетату ретинолу, може посилювати експресію $IFN-\gamma$, що індукує активність індукцибельної NO-синтази.

Проте, в умовах посиленого формування супероксиду може утворюватися потенційно більш токсичний пероксинітрит аніон ($ONOO^-$) [163], який здатний індукувати процеси пероксидного окислення ліпідів, нітрозилювання та ковалентні модифікації протеїнів, і може пояснити ще більше зростання вмісту ТВА-активних продуктів, карбонільних похідних та зниження протеїнових тіольних груп у цитозольній фракції печінки ВРА-експозиційних тварин обох генотипів після введення 3000 МО Рас.

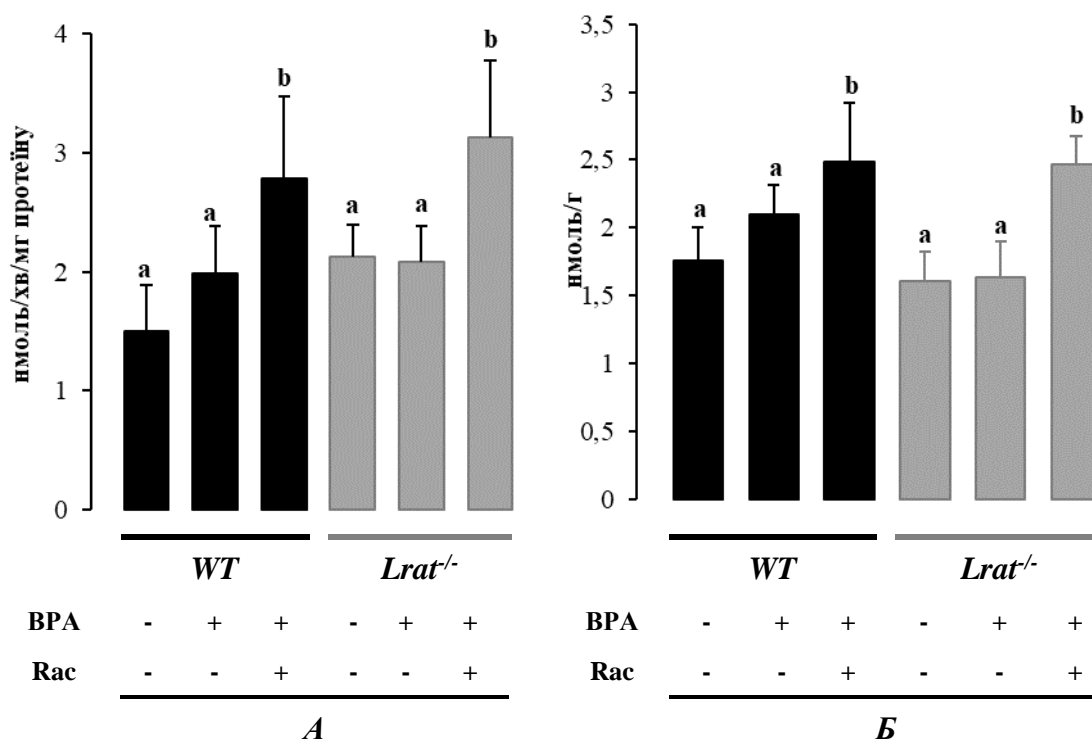


Рис. 3.21. Цитозольне генерування NO^* (А) та його вміст (Б) у печінці тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Раc – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Таким чином, за умов додаткового введення фармакологічних доз ретиноїдів та гострої експозиції ВРА, спостерігається індукція роботи ензиматичних систем біотрансформації, що виступає додатковим джерелом вільних радикалів [164]. Найбільше зростання інтенсивності генерування ROS зафіксовано саме у мітосомальній та цитозольній фракціях. Отриманий висновок підтверджується незмінністю показників при введенні ВРА у тварин нокаутів, порівняно із контрольною групою та зростання генерування ROS при введенні цим тваринам фармакологічних доз ретиноїдів.

3.2.4. Активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту

Одним із механізмів розвитку оксидативного стресу, індукованого введенням ксенобіотиків, фармацевтичних препаратів та полютантів, є порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

Інтенсивність утворення вільних радикалів у клітині строго контролюється широким набором ензиматичних та неензиматичних інструментів антиоксидантного захисту. Антиоксиданти зменшують клітинні пошкодження внаслідок взаємодій між молекулами ліпідів, протеїнів, ДНК та ROS [165]. Тому наступним нашим завданням було дослідити ензиматичні активності антиоксидантної системи, а саме супероксиддисмутазу, каталазу та глутатіонпероксидазу.

SOD є першою лінією антиоксидантного захисту від ROS та єдиним ензимом, що каталізує дисмутацію супероксидного радикалу. Існує дві ізоформи даного ензиму: цитозольна (Cu, Zn-вмісна, є основною та найбільш поширеною ізоформою) та мітохондріальна (Mn-вмісна) [166]. З цим узгоджуються, зафіксовані у нашому експерименті, переважаючі показники SOD активності у цитозольній фракції тварин контрольної групи, які вищі, в середньому, на 25%, порівняно з даною ензиматичною активністю у мітохондріальній фракції (рис. 3.22).

Функціональне навантаження SOD полягає у інактивації $O_2^{\cdot-}$, утвореного у результаті роботи електронтранспортних систем та цитозольних ензимів. У зв'язку із нездатністю даного радикалу дифундувати на значні відстані та його короткий час напівжиття (10^{-6} с) виникає необхідність знешкодження $O_2^{\cdot-}$ у місцях його утворення.

Результати досліджень показали, що 3-добове введення тваринам дикого типу 50 мг/кг супроводжувалось зниженням SOD активності у цитозольній фракції, показник якої знижувався у 3 рази порівняно із тваринами, яким не вводили ксенобіотик (рис. 3.22 Б). При введенні ВРА тваринам дикого типу фіксували незначне зниження активності даного

ензиму у мітохондріальній фракції, показник якої відрізнявся від показників контрольної групи на 23% (рис. 3.22 А.). Отримані результати, ймовірно пов'язані з тим, що найбільшого вільнорадикального пошкодження індукованого високореакційноздатними метаболітами ВРА [167] та посиленням утворенням $O_2^{\cdot-}$ (в результаті посиленої роботи ензимів I фази) зазнають біомолекули цитозольної та мікросомальної фракцій.

Тотожні результати отримано щодо показників каталазної активності у цитозольній та мітохондріальній фракціях печінки (рис. 3.23). Біологічна роль цього гем-вмісного ензиму полягає в деградації пероксиду водню, що утворюється у клітинах в результаті каталітичного циклу СYP та дисмутації супероксиду за дії SOD, до молекулярного кисню та води [168].

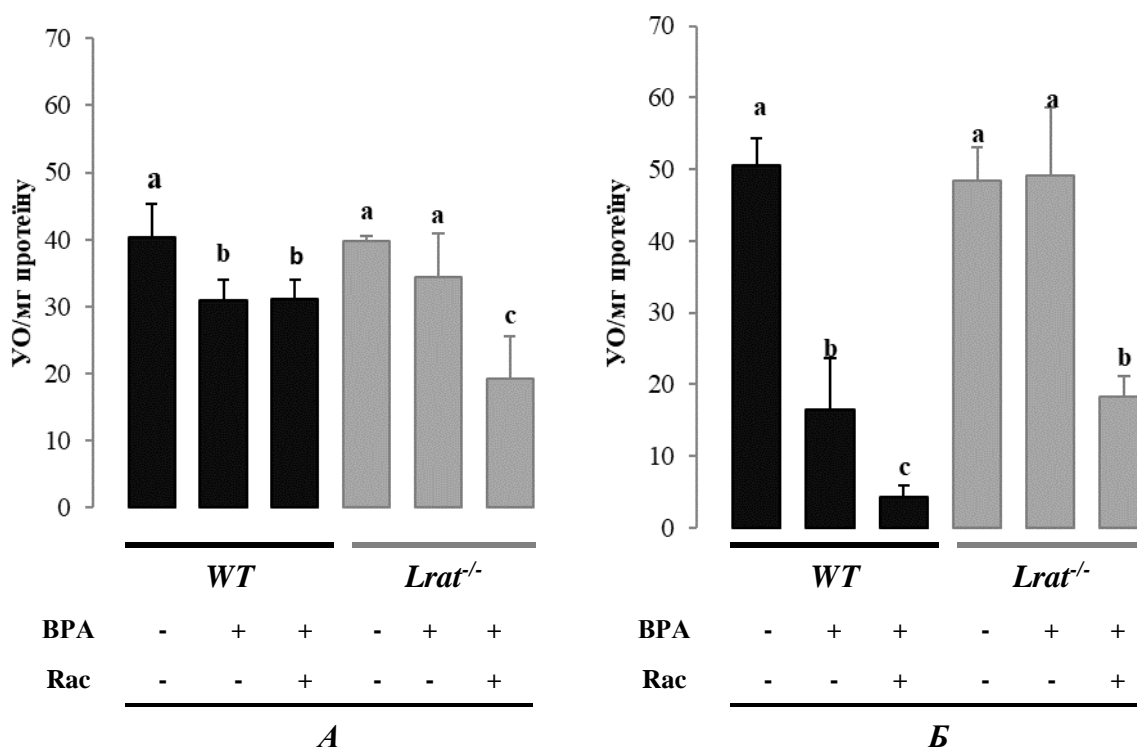


Рис. 3.22. Супероксиддисмутазна активність у мітохондріальній (А) та цитозольній (Б) фракціях печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Активність даного ензиму у тварин дикого типу при введенні ВРА також найбільше знижувалась у цитозольній фракції, на 46 %, в той час, як у мітохондріальній фракції даний показник був нижчий на 14% порівняно з показником активності САТ у тварин, які не отримували ВРА. З одного боку, отримані результати можуть бути пов'язані із вільнорадикальним пошкодженням субклітинних фракцій, з іншого – з низькою концентрацією субстрату каталази – гідрогену пероксиду, що пов'язано із зниженою активністю SOD.

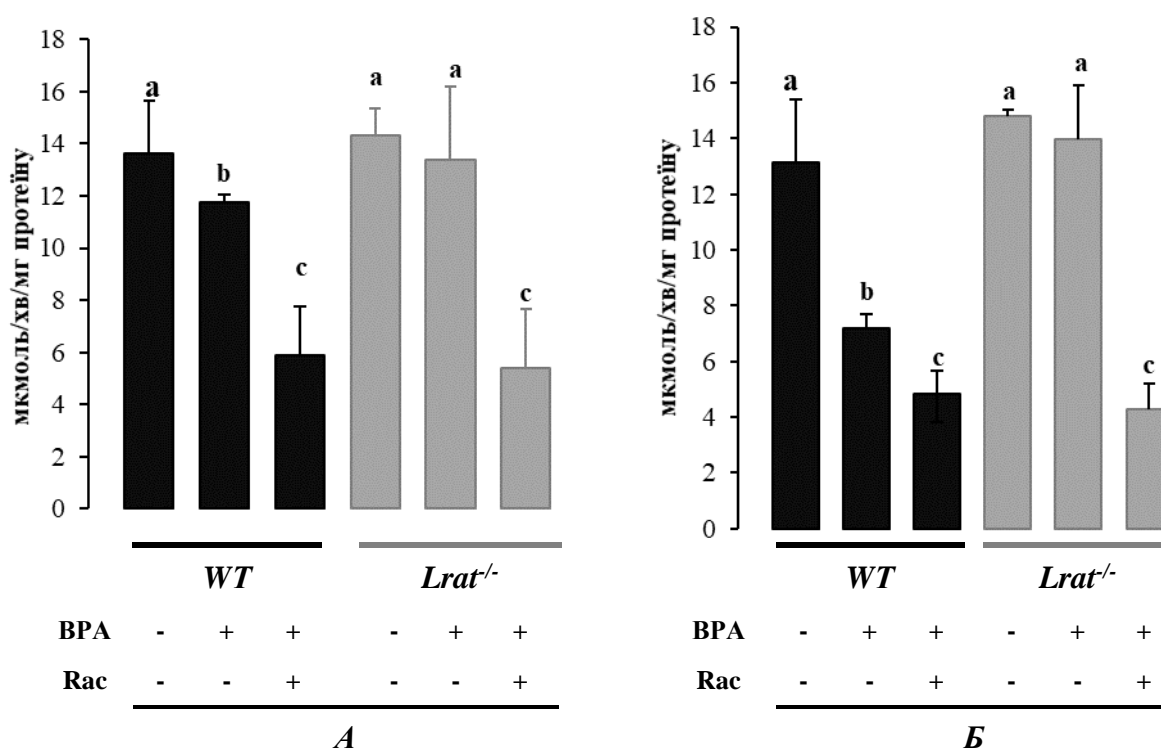


Рис. 3.23. Каталазна активність у мітохондріальній (А) та цитозольній (Б) фракціях печінки тварин за умов введення ВРА та різної забезпеченості ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat*^{-/-} – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Раc – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (а, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, P < 0,05.

Іншим важливим ензимом антиоксидантної системи є глутатіонпероксидаза – Se-вмісний ензим, важливість якого полягає у забезпеченні інактивації не лише пероксиду водню, але й гідропероксидів ліпідів за участі відновленого глутатіону, до якого ензим виявляє високу специфічність [169]. Основним місцем локалізації GSHPx виявляється цитозольна фракція (до 70%), а в мітохондріальній фракції знаходиться приблизно 20-30% GSHPx [170]. З цим узгоджуються, зафіксовані у нашому експерименті, переважаючі показники даної ензиматичної активності у цитозольній фракції тварин контрольної групи, які вищі, в середньому, на 62%, порівняно із активністю GSHPx у мітохондріальній фракції (рис. 3.24).

Результати досліджень показали, що при введенні ВРА тваринам дикого типу, зафіксовано зниження активності глутатіонпероксидази як у цитозольній так і у мітохондріальній фракції у 1,4 рази порівняно з показником активності GSHPx у тварин дикого типу, які не отримували ВРА (рис. 3.24).

Отримані результати можуть бути пов'язані з вільнорадикальним пошкодженням даних субклітинних фракцій, при введенні ВРА. З іншого боку, зниження глутатіонпероксидазної активності може бути пов'язано із зниженням вмісту відновленого глутатіону, що є кофактором, та зниження якого нами зафіксовано у печінці при введенні ВРА.

Проте з джерел літератури [79] відомо, що ВРА індукує не лише зниження основних ензиматичних активностей антиоксидантного захисту – GSPx, SOD, CAT, але й призводить до зниження експресії мРНК генів GSHPx та CAT. Подібні результати й отримані дослідженнями *Bindhumol et al.* [171], де показано, що введення ВРА індукує розвиток оксидативного стресу шляхом зниження активності антиоксидантних ензимів та зростання пероксидного окислення ліпідів. Водночас, у дослідженнях *Kabuto et al.* [78] зафіксовано зниження CAT та GSHPx активностей у печінці внаслідок введення тваринам досліджуваного контамінанту.

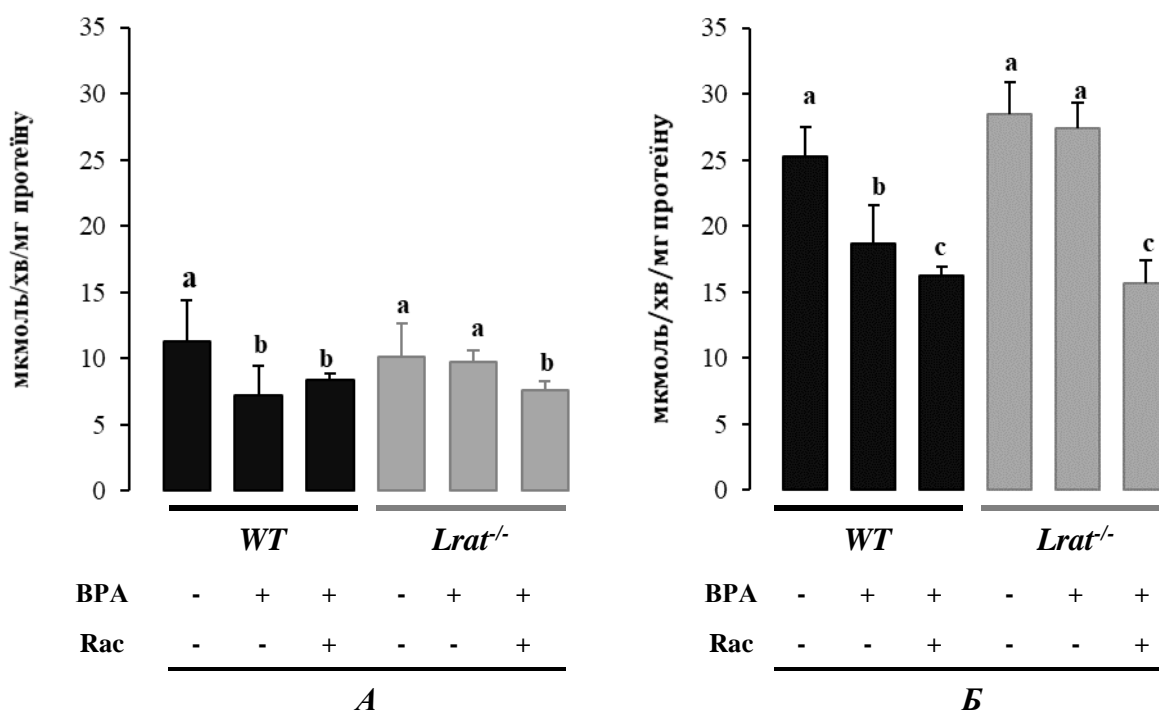


Рис. 3.24. Глутатіонпероксидазна активність у мітохондріальній (А) та цитозольній (Б) фракціях печінки тварин за умов введення ВРА та різної саплементачії ретиноїдами

Примітка: WT – тварини дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, *Lrat^{-/-}* – трансгенні тварини, позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу, ВРА – бісфенол А, Rac – ацетат ретинолу, величини, позначені різними буквеними індексами (а, b, с), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Водночас, додаткове введення 3000 МО Rac тваринам дикого типу при одночасному введенні ВРА, призводила до ще більшого погіршення функціонування ензиматичної ланки антиоксидантного захисту у цитозольній фракції. Зокрема, SOD активність у цитозольній фракції знизилась на 91%, порівняно з контрольною групою, та на 75% – порівняно з тваринами, яким вводили лише ВРА (рис. 3.22). Було також зафіксовано зниження каталазної активності у цитозольній фракції на 62% та глутатіонпероксидазної на 36%, порівняно з групою контролю, на 29% та 11 % – порівняно з тваринами, яким вводили ксенобіотик (рис. 3.23 та 3.24). Отримані результати, ймовірно, пов'язані з тим, що за додаткового введення вітаміну А відбувається підвищення активностей монооксигеназної системи з наступним посиленням

оксигеназного метаболізму ВРА та генеруванням активних форм кисню та азоту в цитозольній фракції.

Для підтвердження залежності отриманих результатів від забезпеченості вітаміном А, у роботі ми проводили введення ВРА трансгенним тваринам, які не мають печінкових запасів ефірів ретинолу.

Результати наших досліджень, показали, що у тварин-нокаутів, активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази як у цитозольній, так і у мітохондріальній фракціях печінки знаходились на рівні показників контрольної групи тварин *Lrat^{-/-}* та статистично-вірогідно не відрізнялись від тотожних показників тварин дикого типу, яким вводили лише носій (рис. 3.22-3.24). В свою чергу, додаткове введення ретиноїдів трансгенним тваринам призвело до значного зниження активності ензимів антиоксидантної системи у цитозольній фракції, а саме: супероксиддисмутази на 62%, каталази на 71% та глутатіонпероксидази на 46%, порівняно з групою тварин, позбавлених запасів ефірів ретинолу у печінці, яким вводили носій (рис. 3.22-3.24). Отримані результати, в першу чергу, пов'язані із відновленням індукції монооксигеназної системи, метаболізму ВРА до його токсичних метаболітів, посиленням генерування ROS та, як наслідок, оксидативне пошкодження цитозольної та мікросомальної фракцій печінки. Крім того, зниження ензиматичних активностей антиоксидантної системи у цих тварин може бути викликане утворенням пероксинітриту, який може генеруватись внаслідок зафіксованого нами одночасного посиленого генерування супероксидного радикалу та оксиду азоту при одночасному введенні 3000 МО вітаміну А та ВРА. Відомо, що дана активна форма кисню здатна інгібувати вищезгадані ензиматичні активності шляхом нітрування тирозинових залишків у структурі ензиму [172].

Отже, нами встановлено, що введення ВРА тваринам із нормальною забезпеченістю ретиноїдами супроводжується змінами ензиматичних активностей антиоксидантної системи у всіх субклітинних фракціях печінки,

проте найбільші зміни зафіксовані у цитозольній фракції. Водночас введення фармакологічних доз вітаміну А, одночасно із введенням ВРА супроводжується ще більшим зниженням активностей SOD, CAT та GSHPx. Водночас при відсутності печінкових запасів ретиноїдів за умов введення ксенобіотика змін досліджуваних ензиматичних активностей не фіксувалось, проте їх зниження відбувалось при поповненні запасів ретиноїдів [173].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.2

Отже, результати досліджень чітко вказують на те, що для індукції активностей ензимів I та II фаз клітинної системи детоксикації необхідні ретиноїди, від яких залежить печінкова ВРА-біотрансформація. Це підтверджується підвищенням ензиматичних активностей обох фаз при введенні великих доз ретиноїдів та експозицією ксенобіотика. Проте, пероральне введення фармакологічних доз ретиноїдів також має несприятливі наслідки для печінки, прискорюючи окисне пошкодження, викликане ВРА, через посилення генерування немітохондріальних ROS.

У тварин *Lrat*^{-/-} при додаванні ацетату ретинолу, накопичення маркерів окислення білка, зокрема посилене карбонілювання протеїнів та окислення протеїнових тіолів, є більш вираженим, ніж у тварин дикого типу, що може бути результатом синергічного ефекту одночасного введення ВРА та ацетату ретинолу, оскільки у тварин нокаутів обидві ці сполуки можуть метаболізуватися печінковими CYP та UGT.

Ступінь вільнорадикального пошкодження біомолекул печінки, яке виникає внаслідок гострої інтоксикації ВРА, безпосередньо модулюється споживанням аліментарних ретиноїдів протягом періоду експозиції ВРА та запасів печінкових ефірів ретинолу, накопичених за час життя організму.

Результати дослідження, висвітлені у цьому розділі, викладені у роботах [86, 144, 152, 157, 164, 173].

3.3. ПРЕВЕНТИВНА КОРЕКЦІЯ БІСФЕНОЛ А-ІНДУКОВАНОГО ОКСИДАТИВНОГО ПОШКОДЖЕННЯ БІОМОЛЕКУЛ ПЕЧІНКИ СЕЛЕКТИВНИМИ ПРОБІОТИКАМИ

3.3.1. Компонентний склад мікробіоти кишечника за умов введення бісфенолу А та пробіотиків

Кишечна мікрофлора, що являє собою складну екологічну систему та представлена більш ніж 1000 видами мікроорганізмів, в загальній сукупності до трильйона мікроорганізмів (тобто приблизно 10^{14} бактерій та архей) загальною вагою приблизно 1-2 кг. Однак, на це різноманіття можуть легко впливати зовнішні фактори, такі як: харчування, бактеріальна/вірусна інфекція та ксенобіотики. Вплив токсичних хімічних речовин екзогенного походження призводить до зміни мікробіому кишечника (дисбактеріозу) як механізму, завдяки якому екологічні агенти негативно впливають на здоров'я людини [174–177]. Тому дана мікробіологічна система є потенційною мішенню токсичної дії деяких лікарських засобів або харчових контамінантів.

Результати наших досліджень продемонстрували, що при введенні 50 мг/кг ВРА кількість корисних бактерій, таких як біфідобактерії та лактобактерії, значно зменшилась, тоді як кількість умовно-патогенних бактерій, як *E. coli*, значно збільшилась (табл. 3.1.).

У контрольній групі, якій не вводили ВРА, кількість бактерій родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* становила $4,69 \pm 0,02$ lg КУО/г та $4,68 \pm 0,014$ lg КУО/г. У цій експериментальній групі кількість умовно-патогенного мікроорганізму *Escherichia coli* становила $3,25 \pm 0,07$ lg КУО/г (табл. 3.1.). Введення тваринам 50 мг/кг ксенобіотика призводить до збільшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів та зменшення кількості корисних пробіотичних бактерій (табл. 3.1). У цій експериментальній групі кількість кишкової палички збільшилось до $3,91 \pm 0,07$ lg КУО/г, а кількість лактобактерій та біфідобактерій зменшилось до $4,29 \pm 0,06$ lg КУО/г та

4,09±0,02 lg КУО/г відповідно. Наші результати підтверджують різні дослідження, які показують, що вплив ВРА змінює бактеріальний склад кишечника та метаболічний профіль [178–181] у тварин.

Дисбіоз мікробіоти кишечника відноситься до дисбалансу мікробної спільноти з точки зору якісних та кількісних змін, метаболічної активності та топографічного розподілу [182]. Аномальний профіль мікробіоти кишечника (дисбактеріоз) був продемонстрований при таких патологічних станах, як старіння, запальні захворювання кишечника та захворювання печінки [183–187].

Таблиця 3.1. Популяції мікроорганізмів у фекальних зразках

Бактерії	Кількість мікроорганізмів (lg КУО/г)			
	Контрольна група	Бісфенол А	Природні пробіотики	Селективні пробіотики
<i>Lactobacillus</i>	4,69±0,02 ^a	4,29±0,06 ^b	4,63±0,09 ^a	4,53±0,12 ^a
<i>Bifidobacterium</i>	4,68±0,014 ^a	4,09±0,02 ^b	4,83±0,04 ^c	4,77±0,02 ^c
<i>E. coli</i>	3,25±0,07 ^a	3,91±0,07 ^b	2,68±0,05 ^c	2,90±0,06 ^c

Профілактика та терапія пробіотиками гепатотоксичності, індукованої введенням ксенобіотика, є цікавою сферою сучасних біомедичних досліджень [188–190]. Все більше зростає інтерес до використання фекальної мікробної трансплантації як способу корекції різних захворювань, включаючи інфекцію *Clostridium difficile*, запальну хворобу кишечника та синдром роздратованого кишечника [191]. Це процес трансплантації бактерій фекалій від здорового донора до господаря із захворюванням, що являє собою терапію з високим потенціалом успіху, і в основному, її вивчали при лікуванні хронічних шлунково-кишкових інфекцій [192].

У межах даного дисертаційного дослідження ми провели виділення двох видів пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus* з фекального біоптату тварин із ВРА-індукованою гепатотоксичністю та тварин контрольної групи, яким вводили лише носій. Таким чином, ми ізолювали селективні (бактерії, що контактували із ксенобіотиком) чи природні (бактерії, що не контактували з бісфенолом А) пробіотики та провели попередню колонізацію ними кишечника здорових тварин із наступним введенням бісфенолу А.

Результати наших досліджень показали, що введення природних пробіотиків тваринам впливало на кількість мікроорганізмів кишкової мікрофлори. Кількість *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* у групі тварин, яким вводили природний пробіотик до введення ксенобіотика, становила $4,63 \pm 0,09$ та $4,83 \pm 0,04$ lg КУО/г фекалій відповідно. Крім того, введення даних пробіотиків призводило до зменшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів. У цій експериментальній групі кількість *Escherichia coli* зменшилась до $2,68 \pm 0,05$ lg КУО/г, що навіть менше кількості даних бактерій у контрольній групі.

Колонізація шлунково-кишкового тракту селективними пробіотичними культурами призводить до збільшення кількості мікроорганізмів корисної мікрофлори та зменшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів. Кількість *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* у цій групі була вищою, ніж у групах, яким вводили лише ксенобіотик, і становила відповідно $4,53 \pm 0,12$ та $4,77 \pm 0,02$ lg КУО/г фекалій. Кількість *Escherichia coli* зменшилось до $2,90 \pm 0,06$ lg КУО/г, після ведення селективних пробіотиків (табл. 3.1.), причому, даний показник був навіть менший, ніж у контрольній групі тварин.

Один з можливих механізмів сприятливого впливу пробіотиків – це збереження/відновлення мікробіоти тонкого кишечника. Наприклад, запобігання росту бактерій патогенних видів може сприяти захисту цілісності

кишкового бар'єру [193]. Кілька досліджень повідомили про корисні терапевтичні ефекти пробіотиків у пацієнтів з печінковою енцефалопатією, неалкогольною патологією печінки, цирозом [194–197]. Крім того, нещодавно опубліковане дослідження з використанням культуральної техніки повідомило про дисбактеріоз у алкоголіків із захворюваннями печінки [119]. Автори показали, що при хронічному вживанні алкоголю спостерігається аномальний профіль мікробіоти кишечника зі значно меншою кількістю біфідобактерій та лактобактерій. У пацієнтів, які отримували пробіотичну терапію біфідобактеріями та лактобактеріями, було відновлено кількість цих видів до рівнів, виявлених у контролі, і продемонстровано значне покращення функції печінки. Також у експериментальних тварин із кишковою дисфункцією, спричиненої психологічним стресом, введення лактобактерій відновило нормальну бар'єрну функцію кишечника [198, 199].

Таким чином, колонізація шлунково-кишкового тракту обома пробіотичними культурами призводить до збільшення кількості мікроорганізмів корисної мікрофлори та зменшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів.

3.3.2. ВРА-індуковане оксидативне пошкодження ліпідів та протеїнів печінки при введенні різних пробіотиків

Мікробіота кишечника здійснює широкий спектр метаболічних реакцій, що спрямовані на детоксикацію фармакологічних препаратів, різноманітних полютантів, контамінантів й інших ксенобіотиків, та каталізуються ензимами кишкової мікрофлори (в переважній більшості анаеробні бактерії ободової кишки товстого кишечника) [15, 16, 18]. Як було підсумовано згодом, найбільш важливими біотрансформаційними реакціями є відновлення та гідроліз (зокрема кон'югатів). Крім того, мікробіота кишечника також здатна до низки додаткових детоксикаційних механізмів, включаючи реакції

деметилування, дезамінування, дегідроксилювання, деацилування, декарбоксилування або окислення. Зокрема, у *in vitro* дослідженнях, які полягали у інкубуванні таких препаратів, як метамфетамін та 4-гідроксиметамфетамін із мікробіотою, вилученою у щурів [200], було зафіксовано зростання N-деметиلاзної активності.

На сьогодні з'являються свідчення того, що кишечна мікрофлора може змінювати активність ключових ензимів хазяїна, що залучені в процеси біотрансформації ксенобіотиків. Для прикладу, дослідження показують, що експресія у печінці СYP генів відрізняється між конвенціональними (із нормальною мікрофлорою) та мікробіотно-вільними мишами. У цих тварин зафіксована підвищена експресія CYP, донора електронів для ферментів СYP типу II, підвищена експресія конститутивного андростанового рецептора, який слугує як головний регулятор печінкового метаболізму ксенобіотиків. Авторами показано, що миші, які були позбавлені мікробіоти, одужували на 35% швидше від анестезії, спричиненої введенням фенobarбіталу, ніж конвенціональні тварини [15]. Таким чином, кишечна мікрофлора може виступати одним із учасників детоксикації ксенобіотиків, модулювати їх метаболізм та токсичність.

Для встановлення впливу виділених пробіотиків на оксидативне пошкодження біомолекул печінки, що індуковане введенням ВРА, ми провели визначення вмісту вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, протеїнових карбонільних та тіольних груп у печінці тварин.

Результати наших досліджень показали, що введення селективних пробіотиків, які контактували із ВРА, у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО протягом 4 діб до введення ксенобіотика призводило до зменшення маркерів оксидативного пошкодження ліпідів. Зокрема, у тварин даної групи нами зафіксовано зниження у 2,7 разів вмісту ТВА-активних продуктів, порівняно із групою тварин, яким вводили ВРА, та цей показник статистично вірогідно не відрізнявся від показника контрольної групи тварин (рис. 3.25).

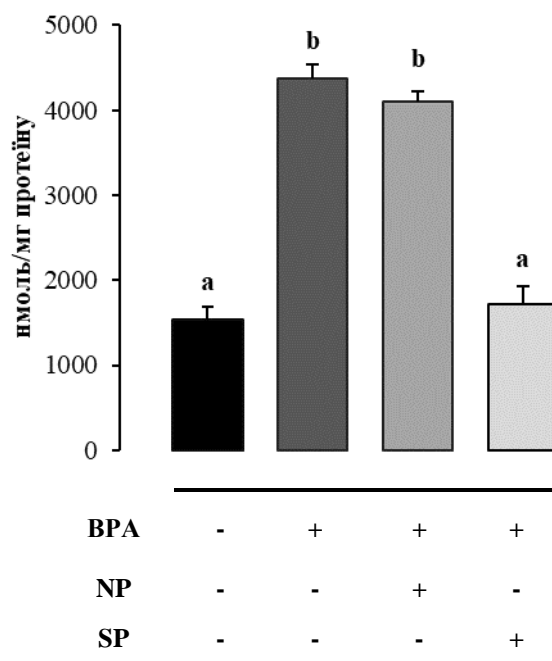


Рис. 3.25. ТВА-активні продукти в печінці тварин за умов введення ВРА та пробіотиків

Примітка: SP – бактерії, що контактували із ксенобіотиком, NP – бактерії, що не контактували з бісфенолом А (ВРА), величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Крім того, у цих тварин при введенні селективних пробіотиків нами зафіксовано зниження інтенсивності оксидативного пошкодження протеїнів печінки, що підтверджено зменшенням вмісту карбонільних груп на 20% та підвищенням рівня протеїнових SH-груп на 49%, порівняно з відповідними величинами у ВРА-експозиційній групі тварин, причому дані показники статистично-вірогідно не відрізнялись від відповідних показників контрольної групи (рис. 3.26).

На відміну від цього, попереднє введення пробіотиків, отриманих від тварин, які не контактували з ксенобіотиком, не призводило до значних змін досліджуваних показників. Рівень ТВА-активних продуктів як маркерів пероксидного окислення ліпідів статистично-вірогідно не відрізнявся від ВРА-експозиційної групи та був вищий у 2,7 разів порівняно з контрольною групою тварин (рис. 3.25 та 3.26).

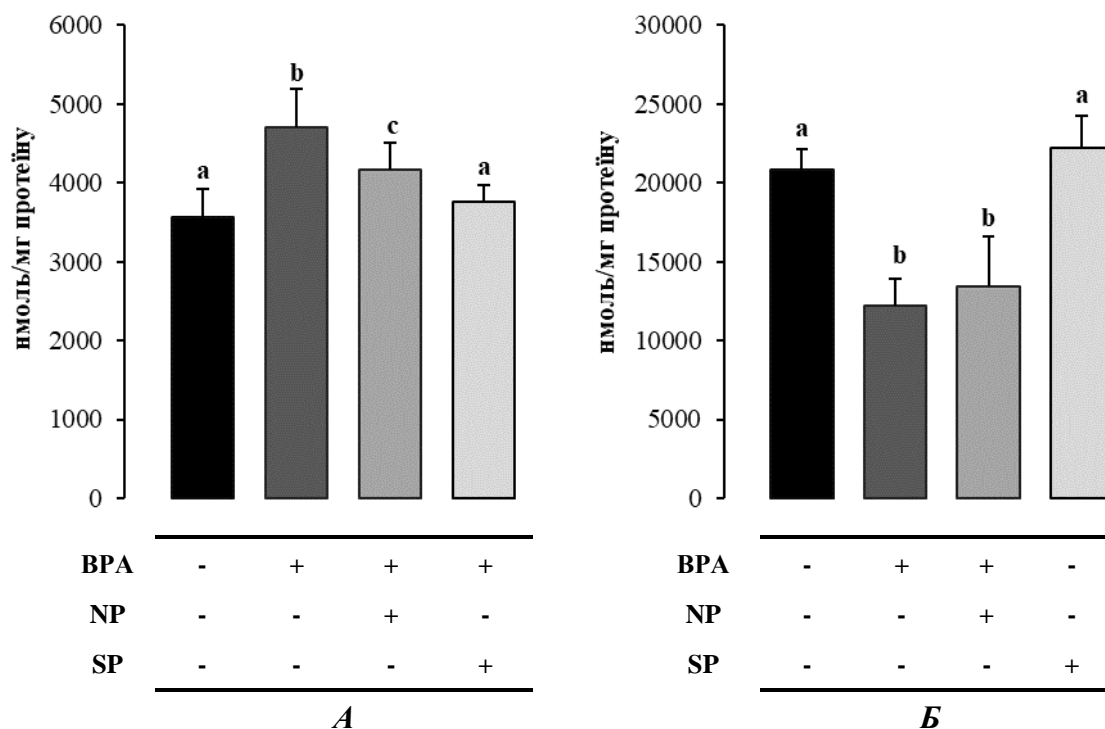


Рис. 3.26. Рівень протеїнових карбонільних груп (А) та SH-груп (Б) в печінці тварин за умов введення ВРА та пробіотиків

Примітка: SP – бактерії, що контактували із ксенобіотиком, NP – бактерії, що не контактували з бісфенолом А (ВРА), величини, позначені різними буквеними індексами (a, b, c), статистично-вірогідно відрізняються, $P < 0,05$.

Аналогічні результати були отримані щодо оксидативного пошкодження протеїнів у печінці. Рівень протеїнових карбонільних груп при введенні природніх пробіотиків знижувався, проте не досягав відповідної величини у групі тварин, яким попередньо вводили селективні пробіотики, що контактували з ВРА, та контрольної групи тварин (рис. 3.26 А). Рівень протеїнових тіольних груп у цій групі тварин був знижений, та статистично вірогідно не відрізнявся, від відповідних величин у ксенобіотик-експозиційних тварин (рис. 3.26 Б).

Таким чином, введення селективних пробіотиків попереджувало розвиток ВРА-індукованих оксидативних процесів у печінці. Це виражалось

у зниженні вмісту основних маркерів оксидативного пошкодження клітинних біомолекул у печінці.

Наші результати підтверджують різні дослідження, що проводились на щурах та мишах, та показують, що пробіотичні препарати покращують індуковане ксенобіотиком окисне пошкодження тканини печінки. Було висунуто гіпотезу, що пробіотики можуть перешкоджати всмоктуванню ксенобіотиків у кишечнику. З джерел літератури відомо, що пряме зв'язування харчових канцерогенів з клітинними стінками пробіотичних бактерій в даний час вважається найбільш ефективним механізмом детоксикації, що запобігає всмоктуванню генотоксичних ксенобіотиків слизовою кишкою. Як повідомлялося, кілька харчових мутагенів, включаючи PhIP, дуже ефективно зв'язуються з клітинними стінками *Lactobacillus acidophilus* та *Bifidobacterium longum* [201–204].

Крім того, пробіотики можуть інактивувати харчові мутагени та/або їх прекурсори за допомогою декількох інших механізмів, таких як хімічна або ферментативна інактивація [205–207].

Osman et al. [208] показали, що пробіотики здійснюють протективну дію при захворюваннях печінки. Вони зменшують пошкодження гепатоцитів, запалення, покращують бар'єрні функції та посилюють антиоксидантну активність. В іншому дослідженні [209] пробіотичний штам *E. lactis* ПТНН1 володіє антиоксидантною здатністю і забезпечує захист від індукованої АРАР гепатотоксичності, модулюючи антиоксидантний статус, вміст про-/антиапоптотичні білки, експресію каспаз та пошкодження ДНК.

Отже, застосування розробленого підходу виділення селективної аутохтонної пробіотичної культури *Lactobacillus* із фекального біоптату тварин, що піддавались контакту із ксенобіотиком та її подальше введення здоровим тваринам у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО протягом 4 діб, з метою колонізації кишечника цими бактеріями та залученням їх у процеси метаболізму

бісфенолу А забезпечує попередження оксидативного ураження печінки, індуковане введенням даного синтетичного персистентного контамінанта [210].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.3.

Введення тваринам 50 мг/кг бісфенолу А призводить до збільшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів та зменшення кількості корисних пробіотичних бактерій. Проте введення пробіотиків з метою колонізації ними кишечника та залучення їх у процеси метаболізму бісфенолу А, забезпечує попередження оксидативного ураження печінки, індуковане введенням даного синтетичного персистентного контамінанту. Проте даний ефект спостерігався при попередньому введенні лише селективної культури бактерій роду *Lactobacillus*, які мали контакт з ксенобіотиками, що виражалось у зниженні вмісту ТВА-активних продуктів, карбонільних груп та підвищенні протеїнових тіолів у печінці.

Результати дослідження, висвітлені у цьому розділі, оформлені у вигляді патенту [210].

УЗАГАЛЬНЕННЯ

У дисертаційній роботі вперше встановлено роль ретиноїдів у процесах біотрансформації ВРА, розвитку оксидативного пошкодження біомолекул печінки та дисліпідемії за умов гострого введення ксенобіотика та проведено превентивну корекцію пробіотичними культурами автохтонної мікрофлори кишечника вільнорадикального ураження печінки, спричиненого введенням бісфенолу А.

Дослідження особливостей ВРА-індукованих вільнорадикальних процесів та обезогенної дії даного контамінанту вперше проводилось з використанням трансгенних тварин, які позбавлені ендогенних запасів ефірів ретинолу у печінці внаслідок нокауту гена лецитин:ретинолацилтрансферази. Дані тварини є зручною моделлю для точного встановлення ролі вітаміну А у підтримці нормальної ретиноїд-залежної функції та попередженні розвитку захворювання печінки.

У дисертації встановлено, що ВРА, за умов нормального надходження ретиноїдів, потрапляючи до організму, порушує транспорт глюкози, що виражалось у підвищених показниках її вмісту й розвитку інтолерантності до даного моносахариду, та змінами ліпідного профілю сироватки крові. Дані ефекти посилювались за умов додаткового надходження ретиноїдів, що, в першу чергу, зумовлені посиленням дії бісфенолу А, опосередкованої сигналінгом ретиноєвої кислоти. В свою чергу, за умов дефіциту ендогенних печінкових запасів ретиноїдів, основні показники ліпідного профілю сироватки крові, глікемічна крива та вміст глюкози у тварин не змінювались із введенням ксенобіотика. Проте, компенсація недостатніх запасів вітаміну А у цих трансгенних тварин шляхом введення 3000 МО ацетату ретинолу, призводило до розвитку ВРА-індукованих дисліпідемії та порушення транспорту глюкози.

Результатами дисертаційного дослідження також встановлено, що введення 50 мг/кг ВРА, що відповідає дозі, при якій спостерігається

найменший несприятливий ефект, тваринам дикого типу із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, супроводжується індукцією вільнорадикального пошкодження клітинних біомолекул у печінці, причому найбільші зміни були зафіксовані у мікросомальній та цитозольній фракціях, що ймовірно, пов'язано із особливостями детоксикації ВРА. Додаткове пероральне введення надвисоких доз ацетату ретинолу поглиблювало індуквані ксенобіотиком вільнорадикальні процеси. Це підтверджено результатами, отриманими від тварин-нокаутів та застосуванні надвисоких доз вітаміну А цим тваринам. Відсутність оксидативного пошкодження біомолекул печінки та її субклітинних фракцій при недостатності печінкових ефірів ретинолу та його поява при нормальних чи надлишкових кількостях вітаміну А свідчить, що забезпеченість ретиноїдами є одним з факторів, який визначає прооксидантні властивості бісфенолу А.

Виявлені ефекти пов'язані із здатністю ретиноїдів впливати на активність компонентів детоксикаційної системи печінки. Індукція маркерних монооксигеназних активностей I фази та UGT й GST – ензимів II фази у тварин дикого типу, які містять нормальні запаси печінкових ретиноїдів, забезпечує біотрансформацію та елімінацію бісфенолу А. Однак, коли запаси печінкових ретиноїдів відсутні, як у тварин *Lrat^{-/-}*, відбувається або порушення біотрансформації ВРА, або взагалі даний ксенобіотик не метаболізується, що, в свою чергу, може призвести до розвитку інших токсичних ефектів ВРА. Тобто запаси печінкових ретиноїдів необхідні для забезпечення оптимальної детоксикації ВРА.

Як це не парадоксально, хоча ретиноїди печінки необхідні для окислення та елімінації ВРА з організму, споживання ретиноїдів може посилити несприятливі біологічні наслідки інтоксикації даним персистентним контамінантом. РА-індукована робота ензиматичних систем біотрансформації виступає додатковим джерелом вільних радикалів, що підтверджено у наших дослідженнях посиленням генеруванням супероксид

аніон радикалу та оксиду азоту, основним джерелом, яких як зафіксовано у наших дослідженнях, виступають саме мікросомальна та цитозольні фракції. Крім того, при введенні ВРА відбувається і зниження активностей ензимів антиоксидатної системи печінки, основна роль яких полягає у знешкодженні вільних радикалів, що виражено зниженням каталазної, супероксиддисмутазної та глутатіонпероксидазної активностей у цитозольній фракції. Це, в свою чергу, призводить до посилення процесів оксидативного пошкодження клітинних біомолекул вищезазначених субклітинних фракцій. Даний висновок підтверджується результатами досліджень у тварин із нормальною забезпеченістю ретиноїдами, що отримували ВРА після фармакологічної саплементації 3000 МО ацетатом ретинолу.

Пероральне введення ретиноїдів тваринам, позбавлених ендогенно-депонованих ретиноїдів, внаслідок нокауту гена лецитин:ретинолацилтрансфери, також має несприятливі наслідки для печінки, прискорюючи оксидативне пошкодження, викликане бісфенолом А, через індукцію активності мікросомальних монооксигеназ. Це, в свою чергу, супроводжується посиленням генеруванням немітохондріальних ROS, зниженою активністю ензиматичної ланки антиоксидантного захисту, що призводить до індукції вільнорадикального пошкодження клітинних біомолекул, вираженого у підвищенні рівня маркерів пероксидного окиснення ліпідів та протеїнів, переважно в мікросомальній фракції печінки, як місця детоксикації контамінанта.

Таким чином, ступінь оксидативного пошкодження біомолекул печінки, що виникає внаслідок гострої інтоксикації ВРА, безпосередньо модулюється споживанням аліментарних ретиноїдів протягом періоду експозиції ВРА та запасами печінкових ретиноїдів, накопичених за час життя організму.

У дисертаційній роботі нами також проведено превентивну корекцію ВРА-індукованого оксидативного пошкодження біополімерів печінки шляхом попереднього введення високоактивної щодо детоксикації даного ксенобіотика, селективної культури бактерій роду *Lactobacillus*. Колонізація шлунково-кишкового тракту даною пробіотичною культурою призводить до збільшення кількості мікроорганізмів корисної мікрофлори та зменшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів. Застосування розробленого підходу виділення селективної аутохтонної пробіотичної культури тварин, що піддавались контакту із ксенобіотиком та її подальше введення здоровим тваринам, забезпечує попередження оксидативного пошкодження основних біомолекул печінки, індукованого введенням бісфенолу А.

ВИСНОВКИ ДО РОБОТИ

В результаті узагальнення отриманих даних щодо особливостей детоксикації бісфенолу А в умовах різної забезпеченості ретиноїдами, його впливу на ліпідний обмін, окисні процеси в печінці та пробіотичного корегування останніх встановлено:

1. За умов нормального надходження ретиноїдів гостра експозиція високими дозами ВРА супроводжується порушенням транспорту глюкози та ліпідного обміну, що виражалось у гіперглікемії, гіперхолестеролемії, гіпертриацилгіцеролемії та розвитком дисбалансу ліпопротеїнів. Встановлені ефекти даного ксенобіотика посилювалися за умов додаткового надходження фармакологічних доз ретиноїдів. Залежність обезогенних ефектів бісфенолу А від забезпеченості вітаміну А підтверджено результатами, отриманими від нокаутних тварин, позбавлених запасів даного мікронутрієнта у печінці.
2. Короткотривале введення високих доз бісфенолу А супроводжується індукцією вільнорадикального пошкодження клітинних біомолекул у печінці, причому найбільшого оксидативного пошкодження зазнавали саме мікросомальна та цитозольна фракції, що, ймовірно, пов'язано із особливостями детоксикації ВРА. Додаткове пероральне введення надвисоких доз ацетату ретинолу поглиблювало ВРА-індуковані вільнорадикальні процеси, що підтверджено результатами, отриманими від тварин-нокаутів та введенні надвисоких доз вітаміну А цим тваринам.
3. Введення ВРА в умовах із нормальною забезпеченістю ретиноїдами призводить до індукції основних ензиматичних активностей I та II фаз клітинної системи детоксикації, що виражено у зростанні N-диметилазної, *p*-гідроксилазної, N-оксигеназної, UDP-глюкуронілтрансферазної, глутатіонтрансферазної активностей у мікросомальній фракції та ксантинооксидазної активності у цитозольній фракції печінки. Водночас при відсутності печінкових запасів ретиноїдів

за умов введення ксенобіотика індукції досліджуваних ензиматичних активностей не фіксувалось, проте її відновлення відбувалось при поповненні запасів ретиноїдів.

4. Посилена робота ензиматичної системи біотрансформації за умов додаткового введення фармакологічних доз ретиноїдів та гострої експозиції ВРА виступає додатковим джерелом вільних радикалів з максимальними показниками у мікросомальній та цитозольній фракціях. Водночас у тварин *Lrat^{-/-}*, які позбавлені запасів ефірів ретинолу, підвищення генерування вільних радикалів відбувається лише після введення фармакологічних доз ретиноїдів. Поряд з цим, спостерігається зниження активностей SOD, CAT та GSHPx за умов введення ВРА тваринам дикого типу, яке посилюється за умов введення ретиноїдів та індукується за цих же умов у трансгенних тварин, позбавлених ендогенних запасів ретиноїдів.
5. Попереднє введення тваринам селективної аутохтонної пробіотичної культури *Lactobacillus* із фекального біоптату тварин, що піддавались контакту із ксенобіотиком, у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО протягом 4 діб, з метою колонізації кишечника цими бактеріями та залученням їх у процеси метаболізму бісфенолу А забезпечує попередження оксидативного пошкодження печінки, індукованого введенням даного синтетичного персистентного контамінанта.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Holladay, S.D., Xiao, S., Diao, H., Barber, J., Nagy, T., Ye, X., Gogal, R.M.: Perinatal bisphenol a exposure in C57B6/129svj male mice: Potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 7, 2845–2852 (2010). <https://doi.org/10.3390/ijerph7072845>
2. Elsby, R., Maggs, J.L., Ashby, J., Park, B.K.: Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 103–113 (2001)
3. Rubin, B.S.: Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002>
4. Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G.P., Mselli-Lakhal, L.: Low doses of bisphenol a induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology*. 55, 395–407 (2012). <https://doi.org/10.1002/hep.24685>
5. Fay, M.J., Nguyen, M.T., Snouwaert, J.N., Dye, R., Grant, D.J., Bodnar, W.M., Koller, B.H.: Xenobiotic Metabolism in Mice Lacking the UDP-Glucuronosyltransferase 2 Family. *Drug Metab. Dispos.* 43, 1838–1846 (2015)
6. Okuda, K., Fukuuchi, T., Takiguchi, M., and Yoshihara, S.: Novel pathway of metabolic activation of bisphenol A-related compounds for estrogenic activity. *Drug Metab Dispos.* 39, 1696–1703 (2011)
7. Parkinson, A. and Ogilvie, B.W.: Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen, C.D. (ed.) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. pp. 161–304. McGraw-Hill, Kansas (2008)
8. Aranda, A., Pascual, A.: Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304 (2001). <https://doi.org/0031-9333/01>

9. Rhinn, M., Dollé, P.: Retinoic acid signalling during development. *Development*. 139, 843–858 (2012). <https://doi.org/10.1242/dev.065938>
10. Njar V. C.: Cytochrome p450 retinoic acid 4-hydroxylase inhibitors: potential agents for cancer therapy. *Mini Rev Med Chem*. 2, 261–269 (2002). <https://doi.org/10.2174/1389557023406223>
11. Darwish, W.S., Ikenaka, Y., Nakayama, S., Mizukawa, H., Thompson, L.A., Ishizuka, M.: β -carotene and retinol reduce benzo[a]pyrene-induced mutagenicity and oxidative stress via transcriptional modulation of xenobiotic metabolizing enzymes in human HepG2 cell line. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 6320–6328 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0977-z>
12. Dash, A.K., Yende, A.S., Jaiswal, B., Tyagi, R.K.: Heterodimerization of Retinoid X Receptor with Xenobiotic Receptor partners occurs in the cytoplasmic compartment: Mechanistic insights of events in living cells. *Exp. Cell Res.* 360, 337–346 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.024>
13. Shmarakov, I.O.: Retinoid-xenobiotic interactions: the Ying and the Yang. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 4, 243–267 (2015). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.05.05>
14. Shirakami, Y., Lee, S.A., Clugston, R.D., Blaner, W.S.: Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim. Biophys. Acta*. 1821, 124–136 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.023>
15. Carmody, R.N., Turnbaugh, P.J.: Host-microbial interactions in the metabolism of therapeutic and diet-derived xenobiotics. *J. Clin. Invest.* 124, 4173–4181 (2014). <https://doi.org/10.1172/JCI72335>
16. Bojic, G., Golocorbin-Kohn, S., Stojancevic, M., Mikov, M., Suvajdzic, L.: Metabolic activity of gut microbiota and xenobiotics. *Zb. Matice Srp. za Prir. Nauk.* 47–55 (2015). <https://doi.org/10.2298/ZMSPN1528047B>
17. Chiang, J.: Liver Physiology: MetaboLism and Detoxification. *Pathobiol.*

- Hum. Dis. A Dyn. Encycl. Dis. Mech. 1770–1782 (2014). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.04202-7>
18. Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E.: Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 154, 103–16 (2010). <https://doi.org/10.5507/bp.2010.017>
 19. Hodges, R.E., Minich, D.M.: Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application. *J. Nutr. Metab.* 2015, 1–23 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/760689>
 20. Davydov, D.R.: Molecular organization of the microsomal oxidative system: a new connotation for an old term. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 10, 10–21 (2016). <https://doi.org/10.1134/S1990750816010042>
 21. Ingelman-Sundberg, M.: Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: Properties and polymorphisms. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 369, 89–104 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0819-z>
 22. Pearson, P. G., Wienkers, L.C. ed: *Handbook of Drug Metabolism*. Informa healthcare, New York (2008)
 23. Celius T., Pansoy A., Matthews J., Okey A.B., Henderson M.C., Krueger Sh.K., Williams, D.E.: Flavin-containing monooxygenase-3: induction by 3- methylcholanthrene and complex regulation by xenobiotic chemicals in hepatoma cells and mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* 247, 60–69 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.doi:10.1016/j.taap.2010.05.018>
 24. Kostic, D.A., Dimitrijevic, D.S., StojanoviT, G.S., Palic, I.R., Dordevic A.S., I.J.D.: Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. *J. Chem.* 2015, 1–8 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/294858>
 25. Ritter, J.K.: Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem. Biol. Interact.* 129, 171–193 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00198-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00198-8)
 26. Lu, L.Y., Chiang, H.P., Chen, W.T., Yang, Y.S.: Dimerization is

- responsible for the structural stability of human sulfotransferase 1a1. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1083–1088 (2009).
<https://doi.org/10.1124/dmd.108.025395>
27. Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., McManus, M.E.: Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci.* 90, 5–22 (2006).
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj061>
28. Shugarts, S., Benet, L.Z.: The Role of Transporters in the Pharmacokinetics of Orally Administered Drugs. *Pharm. Res.* 26, 2039–2054 (2009). <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9924-0>
29. Döring, B., Petzinger, E.: Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab. Rev.* 43, 261–282 (2014).
<https://doi.org/10.3109/03602532.2014.882353>
30. Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D., Nie, D.: Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1112–1126 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.030>
31. Luis, A.L.: ATP-Binding Cassette Transporters in the Clinical Implementation of Pharmacogenetics. *J. Pers. Med.* 8, 1–12 (2018).
<https://doi.org/10.3390/jpm8040040>
32. Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M.: Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters: Function and Regulation. *Pharmacol. Rev.* 62, 1–96 (2014).
<https://doi.org/10.1124/pr.109.002014.1>
33. Union, E.: Opinion on Vitamin A (Retinol, Retinyl Acetate, Retinyl Palmitate). In: Scientific Committee on Consumer Safety. pp. 1–85. , Luxembourg (2016)
34. Li, Y., Wongsiriroj, N., Blaner, W.S.: The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 3, 126–139 (2014).

- <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.05.04>
35. Blomhoff, R.: Vitamin A and carotenoid toxicity. *Food Nutr. Bull.* 22, 320–334 (2001). <https://doi.org/10.1177/156482650102200309>
 36. Qian, L., Zolfaghari, R., Ross, A.C.: Liver-specific cytochrome P450 CYP2C22 is a direct target of retinoic acid and a retinoic acid-metabolizing enzyme in rat liver. *J. Lipid Res.* 51, 1781–1792 (2010). <https://doi.org/10.1194/jlr.M002840>
 37. O’Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Libien, J., Vogel, S., Goldberg, I.J., Baehr, W., Palczewski, K., Blaner, W.S.: Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J. Biol. Chem.* 280, 35647–35657 (2005). <https://doi.org/10.1074/jbc.M507924200>
 38. Shulman, A.I., Mangelsdorf, D.J.: Retinoid X Receptor Heterodimers in the Metabolic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 353, 604–615 (2005). <https://doi.org/10.1056/NEJM200511103531921>
 39. Bray, B.J., Goodin, M.G., Inder, R.E., Rosengren, R.J.: The effect of retinol on hepatic and renal drug-metabolising enzymes. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1–19 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00110-1)
 40. Su, M., Alonso, S., Jones, J.W., Yu, J., Kane, M.A., Jones, R.J., Ghiaur, G.: All-trans retinoic acid activity in acute myeloid leukemia: Role of cytochrome P450 enzyme expression by the microenvironment. *PLoS One.* 10, 1–14 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127790>
 41. Foti, R.S., Isoherranen, N., Zelter, A., Dickmann, L.J., Buttrick, B.R., Diaz, P., Douguet, D.: Identification of tazarotenic acid as the first xenobiotic substrate of human retinoic acid hydroxylase CYP26A1 and CYP26B1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 357, 281–292 (2016). <https://doi.org/10.1124/jpet.116.232637>
 42. Ross, A.C., Zolfaghari, R.: Cytochrome P450s in the Regulation of Cellular Retinoic Acid Metabolism. *Annu Rev Nutr.* 31, 65–87 (2011).

- <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
43. Nelson, C.H., Buttrick, B.R., Isoherranen, N.: Therapeutic potential of the inhibition of the retinoic acid hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by xenobiotics. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 1402–1428 (2013). <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0411>. Persistent
 44. Nelson, C.H., Peng, Ch.-Ch., Lutz J.D., Yeung, C.K., Zelter, A., Isoherranen, N.: Direct protein-protein interactions and substrate channelling between cellular retinoic acid binding proteins and CYP26B1. *FEBS Lett.* 590, 2527–2535 (2016). <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12303>
 45. Stevison, F., Kosaka, M., Kenny, J.R., Wong, S., Hogarth, C., Amory, J.K., Isoherranen, N.: Does In Vitro Cytochrome P450 Downregulation Translate to In Vivo Drug-Drug Interactions? Preclinical and Clinical Studies With 13-cis-Retinoic Acid. *Clin. Transl. Sci.* 12, 350–360 (2019). <https://doi.org/10.1111/cts.12616>
 46. Lee, W.M.: Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 349, 474–485 (2003). <https://doi.org/10.1056/NEJMr021844>
 47. Macherey, A.-Ch., Macherey, P.M.: Biotransformations Leading to Toxic Metabolites: Chemical Aspects. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. pp. 674–696. Academic Press (2015)
 48. Pandit, A., Sachdeva, T., Bafna, P.: Drug-induced hepatotoxicity: A review. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2, 233–243 (2012). <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2541>
 49. Friedman, S.L.: Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 88, 125–172 (2008). <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
 50. Nau, H., Blaner, W.S. ed: *Retinoids. The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*. Springer, New York (1999)
 51. Rosengren, R.J., Sauer, J.M., Hooser, S.B., Sipes, I.G.: The interactions

- between retinol and five different hepatotoxicants in the swiss webster mouse. *Toxicol. Sci.* 25, 281–292 (1995).
<https://doi.org/10.1093/toxsci/25.2.281>
52. Sauer, J.M., Hooser, S.B., Badger, D.A., Baines, A., Sipes, I.G.: Alterations in chemically induced tissue injury related to all-trans-retinol pretreatment in rodents. *Drug Metab. Rev.* 27, 299–323 (1995).
<https://doi.org/10.3109/03602539509029828>
53. Pumford, N.R., Roberts, D.W., Benson, R.W., Hinson, J.A.: Immunochemical quantitation of 3-(cystein-S-yl)acetaminophen protein adducts in subcellular liver fractions following a hepatotoxic dose of acetaminophen. *Biochem. Pharmacol.* 40, 573–579 (1990).
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90558-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90558-3)
54. Bray, B.J., Rosengren, R.J.: Retinol potentiates acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse: Mechanistic studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 173, 129–136 (2001). <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9170>
55. Elsis, A.E.D., Hall, P., Sim, W.L.W., Earnest, D.L., Sipes, I.G.: Characterization of vitamin A potentiation of carbon tetrachloride-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119, 280–288 (1993).
<https://doi.org/10.1006/taap.1993.1070>
56. Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., Sezenna, E.: Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5711–5741 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3974-5>
57. Kang, J.H., Katayama, Y., Kondo, F.: Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology.* 217, 81–90 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.001>
58. Nahar, M.S., Liao, C., Kannan, K., Dolinoy, D.C.: Fetal Liver Bisphenol A Concentrations and Biotransformation Gene Expression Reveal Variable Exposure and Altered Capacity for Metabolism in Humans. *J. Biochem.*

- Mol. Toxicol. 27, 116–123 (2013). <https://doi.org/10.1002/jbt.21459>
59. Oda, T.K., Orita, M.M., Mai, H.I.: Retinoic Acid Inhibits Uterotrophic Activity of Bisphenol A in Adult Ovariectomized Rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 53, 432–436 (2007). <https://doi.org/10.3177/jnsv.53.432>
60. Naha, M.S.: Human bisphenol A biomonitoring and biotransformation programming in the developing fetus, (2014)
61. Jalal, N., Surendranath, A.R., Pathak, J.L., Yu, S., Chung, C.Y.: Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol. Reports.* 5, 76–84 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.013>
62. Darbre, P.D.: Overview of air pollution and endocrine disorders. *Int. J. Gen. Med.* 11, 191–207 (2018). <https://doi.org/10.2147/IJGM.S102230>
63. Elswefy, S.E., Abdallah, F.R., Atteia, H.H., Wahba, A.S.: Inflammation , oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 97, 369–379 (2016). <https://doi.org/10.1111/iep.12207>
64. Li, L., Wang, Q., Zhang, Y., Niu, Y., Yao, X., Liu, H.: The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with N1. Li, L., Wang, Q., Zhang, Y., Niu, Y., Yao, X., Liu, H.: The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with Nuclear Rec. *PLoS One.* 10, 1–18 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120330>
65. Stowell, C.L., Barvian, K.K., Young, P.C.C.M., Bigsby, R.M., Verdugo, D.E.E., Bertozzi, C.R., Widlanski, T.S.: A Role for Sulfation-Desulfation in the Uptake of Bisphenol A into Breast Tumor Cells. *Chem. Biol.* 13, 891–897 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.06.016>
66. Welshons, W. V., Nagel, S.C., vom Saal, F.S.: Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology.* 147, 56–69 (2006). <https://doi.org/10.1210/en.2005-1159>

67. Quesnot, N., Bucher, S., Fromenty, B., Robin, M.A.: Modulation of metabolizing enzymes by bisphenol A in human and animal models. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1463–1473 (2014). <https://doi.org/10.1021/tx500087p>
68. Mazur, C.S., Marchitti, S.A., Dimova, M., Kenneke, J.F., Lumen, A., Fisher, J.: Human and rat ABC transporter efflux of bisphenol A and bisphenol A glucuronide: Interspecies comparison and implications for pharmacokinetic assessment. *Toxicol. Sci.* 128, 317–325 (2012). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs167>
69. Yoshihara, S.I., Makishima, M., Suzuki, N., Ohta, S.: Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicol. Sci.* 62, 221–227 (2001). <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.221>
70. Niwa, T., Fujimoto, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F., Katagiri, M.: Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1064–1067 (2001). <https://doi.org/10.1248/bpb.24.1064>
71. Schmidt, J., Kotnik, P., Trontelj, J., Knez, Ž., Mašič, L.P.: Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol. Vitro.* 27, 1267–1276 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.016>
72. Letcher, R.J., Sanderson, J.T., Bokkers, A., Giesy, J.P., van den Berg, M.: Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 94–104 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.03.013>
73. Konieczna, A., Rutkowska, A., Rachoń, D.: Health Risk of Exposure To Bisphenol A (BPA). *Dep. Clin. Exp. Endocrinol. Pol.* 66, 5–11 (2015)
74. Mian, L.I., Ge, W.T., Yu, X.U., Jie, Z., Hui, X.U.B., Min, X.U., Hong, C.Y.: Letter to the Editor Association of Bisphenol A Exposure with Circulating Sex Hormone Concentrations in Men and Postmenopausal

- Women. *Biomed. Environ. Sci.* 27, 633–636 (2014).
<https://doi.org/10.3967/bes2014.096>
75. Wang, W., Jiang, C., Zhu, L., Liang, N., Liu, X., Jia, J., Zhang, C., Zhai, S., Zhang, B.: Adsorption of bisphenol a to a carbon nanotube reduced its endocrine disrupting effect in mice male offspring. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15981–15993 (2014). <https://doi.org/10.3390/ijms150915981>
76. Kundakovic, M., Champagne, F.A.: Epigenetic Perspective on the Developmental Effects of Bisphenol A. *Brain Behav Immun.* 25, 1084–1093 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.005>
77. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting 2-5 November 2010 and Report of Stakeholder Meeting on Bisphenol A, 1 November 2010 Ottawa, Canada. (2011)
78. Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., Shishibori, T.: Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ. Res.* 93, 31–35 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00062-8](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00062-8)
79. Hassan, Z.K., Elobeid, M.A., Virk, P., Omer, S.A., Elamin, M., Daghestani, M.H., Alolayan, E.M.: Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 1–6 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/194829>
80. Chen, M., Xu, B., Ji, W., Qiao, S., Hu, N., Hu, Y., Wu, W., Qiu, L., Zhang, R., Wang, Y., Wang, S., Zhou, Z., Xia, Y., Wang, X.: Bisphenol A Alters n-6 Fatty Acid Composition and Decreases Antioxidant Enzyme Levels in Rat Testes: A LC-QTOF-Based Metabolomics Study. *PLoS One.* 7, 1–8 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044754>
81. Gao, X., Wang, H.S.: Impact of bisphenol A on the cardiovascular system - Epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 11, 8399–8413 (2014). <https://doi.org/10.3390/ijerph110808399>
82. Tudurí, E., Marroqui, L., Dos Santos, R.S., Quesada, I., Fuentes, E.,

- Alonso-Magdalena, P.: Timing of exposure and Bisphenol-A: Implications for diabetes development. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 1–10 (2018). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00648>
83. Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., Quesada, I., Nadal, A.: Bisphenol-A: A new diabetogenic factor? *Hormones*. 9, 118–126 (2010). <https://doi.org/10.1007/BF03401277>
84. Ke, Z., Pan, J., Jin, L., Xu, H., Yu, T.: Bisphenol A Exposure May Induce Hepatic Lipid Accumulation via Reprogramming the DNA Methylation Patterns of Genes Involved in Lipid Metabolism. *Nat. Publ. Gr.* 6, 1–13 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep31331>
85. Dunder, L., Halin Lejonklou, M., Lind, L., Risérus, U., Lind, P.M.: Low-dose developmental bisphenol A exposure alters fatty acid metabolism in Fischer 344 rat offspring. *Environ. Res.* 166, 117–129 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.05.023>
86. Марченко, М.М., Шмараков, І.О., Борщовецька, В.Л.: Біохімічні аспекти функціонування ретиноїдів. Чернівецький нац. ун-т, Чернівці (2017)
87. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press, Washington (2011)
88. National Toxicology Program U.S. Department of Health and Human Services, Center: NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. Center for The Evaluation of Risks To Human Reproduction (2008)
89. Wongsiriroj, N., Piantedosi, R., Palczewski, K., Goldberg, I.J., Johnston, T.P., Li, E., Blaner, W.S.: The molecular basis of retinoid absorption: A genetic dissection. *J. Biol. Chem.* 283, 13510–13519 (2008). <https://doi.org/10.1074/jbc.M800777200>
90. S. Bliss: *Rodent Anesthesia*, (2012)

91. Schenkman, J.B., Cinti, D.L.: Preparation of microsomes with calcium. *Methods Enzym.* 52, 83–89 (1978)
92. Kitagawa, Y., Sugimoto, E.: Estimation of the in vivo translational activity of rat liver mitochondria without use of an antibiotic. *J Biochem.* 88, 689–693 (1980)
93. Archakov, A.I., Panchenko, L.F., Kapitanov, A.B., Efron, I.I., Knyazeva, T.I., Zherebkova, N.S.: A quantitative estimation of degree of purity of preparations of subcellular structures. *Anal. Biochem.* 54, 223–233 (1973). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90266-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90266-2)
94. Fiske, C., Subbarow, Y.: The colormetric determination of phosphorous. *J Biol Chem.* 66, 375–400 (1925). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
95. Slater, E.C., Borner, W.D.: The effect of fluoride on the succinic oxidase system. *Biochem. J.* 52, 185–196 (1952). <https://doi.org/10.1042/bj0520185>
96. Покровский, А.А., Арчаков, А.А.: Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций. In: Орехович, В.Н. (ed.) *Современные методы в биохимии.* pp. 5–59. Медицина, Москва (1968)
97. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Tveritinov, V.N., Kokareva, I.S.: Hydroxylation of aniline and aminoantipyrine (1-phenyl-2,3-dimethylaminopyrasolon-5) derivatives in liver endoplasmatic reticulum. *Biochem. Pharmacol.* 23, 1053–1063 (1974). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90005-7)
98. Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55, 416–421 (1953). <https://doi.org/10.1042/bj0550416>
99. Pettit, F.H., Orme-Johnson, W., Ziegler, D.M.: The requirement for flavin adenine dinucleotide by a liver microsomal oxygenase catalyzing the oxidation of alkylaryl amines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 444–

- 448 (1964). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(64\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(64)90373-0)
100. Burchell, B., Weatherill, P.: 4-Nitrophenol UDPglucuronyltransferase (Rat Liver). *Methods Enzymol.* 77, 169–177 (1981). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77022-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77022-8)
101. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.: Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139 (1974). <https://doi.org/10.14026/j.cnki.0253-9705.2010.23.013>
102. Шмараків, І.О., Марченко, М.М.: Ксантинооксидазна активність у тканинах печінки щурів у процесі онкогенезу. *Український біохімічний журнал.* 80, 89–91 (2008)
103. Auclair C., Voisin, E.: Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald, R.A. (ed.) *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* pp. 123–132. Boca Raton, Fla. : CRC Press (1985)
104. Hwang, S., Lopez, C.A., Heck, D.E., Gardner, C.R., Laskin, D.L., Laskin, J.D., Denhardt, D.T.: Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 269, 711–715 (1994)
105. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski, J., Skipper P. L., Wishnok J. S., and Tannenbaum, S.R.: Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138 (1982)
106. Сирота, Т.В.: Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы мед. химии.* 3, 1–10 (1999)
107. Goth, L.: A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.* 196, 143–151 (1991). [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M)
108. Paglia, D.E., Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70, 158–169 (1967)

109. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358 (1979). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
110. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R.: Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478 (1990). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
111. Murphy, M.E., Kehrer, J.P.: Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem. J.* 260, 359–364 (1989). <https://doi.org/10.1042/bj2600359>
112. Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M.: Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882–888 (1963)
113. Barham, D., Trinder, P.: An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst.* 97, 142–145 (1972). <https://doi.org/10.1039/an9729700142>
114. Purves, R.D.: Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 20, 211–226 (1992). <https://doi.org/10.1007/BF01062525>
115. Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W., Fu, P.C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* (1974). <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.4.470>
116. Bucolo, G., David, H.: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.* 19, 476–482 (1973). <https://doi.org/10.1093/clinchem/19.5.476>
117. Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S.: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502 (1972)

118. Vaahrovuo, J., Toivanen, P., Eerola, E.: Bacterial composition of murine fecal microflora is indigenous and genetically guided. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 131–136 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00460-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00460-9)
119. Kirpich, I.A., Solovieva, N. V., Leikhter, S.N., Shidakova, N.A., Lebedeva, O. V., Sidorov, P.I., Bazhukova, T.A., Soloviev, A.G., Barve, S.S., McClain, C.J., Cave, M.: Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol.* 42, 675–682 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2008.08.006>
120. Borschovetska, V., Marchenko, M.: Lipid profile of blood serum in mice under conditions of bisphenol A administration and vitamin A different supplementation. *Biol. Syst.* 11, 115–121 (2019)
121. Borschovetska, V. L. , Nahez, O. O., Marchenko, M.M.: Lipid profile of blood serum in mice under the conditions of Bisphenol A administration and Vitamin A overconsumption. In: Young scientists conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2019.” pp. 65–93. *Ukr. Biochem. J.*, 2019, Vol. 91, N 2, Kyiv (2019)
122. Batista, T.M., Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Amaral, M.E.C., Cederroth, C.R., Nef, S., Quesada, I., Carneiro, E.M., Nadal, A.: Short-term treatment with Bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS One.* 7, 1–10 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033814>
123. Dunder, L., Halin Lejonklou, M., Lind, L., Risérus, U., Lind, P.M.: Low-dose developmental bisphenol A exposure alters fatty acid metabolism in Fischer 344 rat offspring. *Environ. Res.* 166, 117–129 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.05.023>
124. Menale, C., Mita, D.G., Diano, N., Diano, S.: Adverse Effects of Bisphenol A Exposure on Glucose Metabolism Regulation. *Open Biotechnol. J.* 10, 122–130 (2016). <https://doi.org/10.2174/1874070701610010122>
125. Yildiz, N., Barlas, N.: Hepatic and renal functions in growing male rats

- after bisphenol A and octylphenol exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 675–686 (2013). <https://doi.org/10.1177/0960327112464796>
126. Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H., Dong, S.: Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death Dis.* 4, 1–10 (2013). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.206>
127. Rhee, E.J., Plutzky, J.: Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab. J.* 36, 167–180 (2012). <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.3.167>
128. Amengual, J., Ribot, J., Bonet, M.L., Palou, A.: Retinoic acid treatment enhances lipid oxidation and inhibits lipid biosynthesis capacities in the liver of mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 25, 657–666 (2010). <https://doi.org/10.1159/000315085>
129. Chen, W., Chen, G.: The Roles of Vitamin A in the Regulation of Carbohydrate, Lipid, and Protein Metabolism. *J. Clin. Med.* 3, 453–479 (2014). <https://doi.org/10.3390/jcm3020453>
130. Standeven, A.M., Beard, R.L., Johnson, A.T., Boehm, M.F., Escobar, M., Heyman, R.A., Chandraratna, R.A.S.: Retinoid-induced hypertriglyceridemia in rats is mediated by retinoic acid receptors. *Fundam. Appl. Toxicol.* 33, 264–271 (1996). <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0164>
131. Krupková, M., Liška, F., Šedová, L., Křenová, D., Křen, V., Šeda, O.: Pharmacogenomic analysis of retinoic-acid induced dyslipidemia in congenic rat model. *Lipids Health Dis.* 13, 1–9 (2014). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-172>
132. Klör, H.U., Weizel, A., Augustin, M., Diepgen, T.L., Elsner, P., Homey, B., Kapp, A., Ruzicka, T., Luger, T.: The impact of oral vitamin A derivatives on lipid metabolism - What recommendations can be derived for dealing with this issue in the daily dermatological practice? *J. Ger. Soc. Dermatology.* 9, 600–606 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1610->

0387.2011.07637.x

133. Jayashankar, C., Pinnelli, B.K., Nikhil, N., Prakash, B.: Effect of systemic Retinoids on Lipid Profile in patients with dermatological diseases. *Int. J. Med. Sci. Innov. Res.* 4, 306–311 (2019)
134. Maesa, M., Vinkena, M., Jaeschke, H.: Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 290, 86–97 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.016>.
135. Dasgupta, A., Klein, K.: Methods for Measuring Oxidative Stress in the Laboratory. In: *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*. pp. 19–40. Elsevier Inc. (2014)
136. Dasgupta, A., Klein, K.: Introduction to Free Radicals and the Body's Antioxidant Defense. In: *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*. pp. 1–18. Elsevier Inc. (2014)
137. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 329, 23–38 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
138. Sönmez, M.G., Kozanhan, B., Deniz, Ç.D., Göğer, Y.E., Kiliç, M.T., Neşelioğlu, S., Erel, Ö.: Is oxidative stress measured by thiol/ disulphide homeostasis status associated with prostate adenocarcinoma? *Cent. Eur. J. Immunol.* 43, 174–179 (2018). <https://doi.org/10.5114/ceji.2017.72285>
139. Piomboni, P., Stendardi, A., Gambera, L., Tatone, C., Coppola, L., De Leo, V., Focarelli, R.: Protein modification as oxidative stress marker in normal and pathological human seminal plasma. *Redox Rep.* 17, 227–232 (2012). <https://doi.org/10.1179/1351000212Y.0000000014>
140. Adwas, A.A., Elsayed, A.S.I., Azab, A.E., Quwaydir, F.A.: Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* 6, 43–47 (2019). <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00173>
141. Inder, R.E., Bray, B.J., Sipes, I.G., Rosengren, R.J.: Role of cytochrome P4502E1 in retinol's attenuation of carbon tetrachloride-induced

- hepatotoxicity in the Swiss Webster mouse. *Toxicol. Sci.* 52, 130–139 (1999)
142. Noyan, S., Cavusoglu, I., Minbay, F.Z.: The effect of vitamin a on CCl₄-induced hepatic injuries in rats: A histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Histochem.* 107, 421–434 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2005.09.001>
143. Shmarakov, I.O., Borschovetska, V.L., Marchenko, M.M., Blaner, W.S.: Retinoids modulate thioacetamide-induced acute hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 139, (2014). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu045>
144. Shmarakov, I.O., Borschovetska, V.L., Ivanishchuk, L.P., Marchenko, M.M.: Hepatotoxicity of bisphenol A under conditions of differential supplementation with retinoids. *Ukr. Biochem. J.* 88, 99–105 (2016). <https://doi.org/10.15407/ubj88.03.099>
145. Coughlin, J.L., Thomas, P.E., Buckley, B.: Inhibition of genistein glucuronidation by bisphenol A in human and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 40, 481–485 (2012). <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042366>
146. Gao, J., Zhang, Y., Yang, Y., Yuan, C., Qin, F., Liu, S., Zheng, Y., Wang, Z.: Molecular characterization of PXR and two sulfotransferases and hepatic transcripts of PXR, two sulfotransferases and CYP3A responsive to bisphenol A in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Mol. Biol. Rep.* 41, 7153–7165 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3598-3>
147. Delfosse, V., Grimaldi, M., Maire, A. Le, Bourguet, W., Balaguer, P.: Nuclear receptor profiling of bisphenol-A and its halogenated analogues . *HAL.* 94, 229–251 (2014)
148. Sui, Y., Ai, N., Park, S., Rios-pilier, J., Perkins, J.T., Welsh, W.J.: Bisphenol A and Its Analogues Activate Human Pregnane X Receptor. *Environ. Health Perspect.* 120, 399–405 (2012)
149. Pengxiang, H., Chandra, V., Rastinejad, F.: Retinoic Acid Actions

- Through Mammalian Nuclear Receptors. *Chem Rev.* 114, 233–254 (2014).
<https://doi.org/10.1021/cr400161b>
150. Choughule, K. V., Barnaba, C., Joswig-Jones, C.A., Jones, J.P.: In vitro oxidative metabolism of 6-mercaptopurine in human liver: Insights into the role of the molybdoflavoenzymes aldehyde oxidase, xanthine oxidase, and xanthine dehydrogenase. *Drug Metab. Dispos.* 42, 1334–1340 (2014).
<https://doi.org/10.1124/dmd.114.058107>
151. Taibi, G., Nicotra, C.M.A.: Xanthine oxidase catalyzes the oxidation of retinol. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 22, 471–476 (2007).
<https://doi.org/10.1080/14756360701408739>
152. Борщовецька, В.Л., Шмараков, І.О., Марченко, М.М.: Забезпеченість ретиноїдами як фактор, що визначає активацію детоксикаційної системи. In: Конференція молодих уених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016.” р. 86. *Ukr. Biochem. J. Vol.* 88, N 4, Київ (2016)
153. Jiang, HM, Fang, ZZ, Cao, YF, Hu, CM, Sun, XY, Hong, M, Yang, L, Ge, GB, Liu, Y, Zhang, YY, Dong, Q, Liu, R.: New insights for the risk of bisphenol A: inhibition of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). *Chemosphere.* 93, 1189–1193 (2013).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.070>.
154. Rowland, A., Miners, J.O., Mackenzie, P.I.: The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, (2013).
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019>
155. Hanioka, N., Takeda, Y., Tanaka-Kagawa, T., Hayashi, K., Jinno, H., Narimatsu, S.: Interaction of bisphenol A with human UDP-glucuronosyltransferase 1A6 enzyme. *Env. Toxicol.* 23, 407–412 (2008).
<https://doi.org/10.1002/tox.20345>.
156. Ji, Y., Neverova, I., Van Eyk, J.E., Bennett, B.M.: Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione S-transferase by

- peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 281, 1986–1991 (2006).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M509480200>
157. Shmarakov, I.O., Borschovetska, V.L., Blaner, W.S.: Hepatic detoxification of Bisphenol A is retinoid-dependent. *Toxicol. Sci.* 157, 141–155 (2017). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx022>
158. Kazemi, S., Mousavi, S.N., Aghapour, F., Rezaee, B., Sadeghi, F., Moghadamnia, A.A.: Induction effect of bisphenol a on gene expression involving hepatic oxidative stress in rat. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 12–14 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/6298515>
159. Veith, A., Moorthy, B.: Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Curr Opin Toxicol.* 7, 44–51 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>
160. Yea-Hyun, L., Seikwan, O., Kang, H.-J., Kim, J.-H., Yoon, J., Chang, J.-S.: BPA-Toxicity via Superoxide Anion Overload and a Deficit in β -Catenin Signaling in Human Bone Mesenchymal Stem Cells. *Environ. Toxicol.* 344–352 (2016). <https://doi.org/10.1002/tox>
161. Palacio, J.P. del, Díaz, C., Vergara, N., Algieri, F., Rodríguez-Nogales, A., de Pedro, N., Rodríguez-Cabezas, M.E., Genilloud, O., Gálvez, J., Vicente, F.: Exploring the role of CYP3A4 mediated drug metabolism in the pharmacological modulation of nitric oxide production. *Front. Pharmacol.* 8, 1–14 (2017). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00202>
162. Bhatt, S., Qin, J., Bennett, C., Qian, S., Fung, J.J., Hamilton, T.A., Lu, L.: All- trans Retinoic Acid Induces Arginase-1 and Inducible Nitric Oxide Synthase–Producing Dendritic Cells with T Cell Inhibitory Function . *J. Immunol.* 192, 5098–5108 (2014).
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303073>
163. Kumar, A., Chen, S., Kadiiska, M.B., Hong, J., Kalyanaraman, B., Mason, R.P.: Probiotic *Enterococcus lactis* ITRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 0, 51–59

- (2014). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.014>. Inducible
164. Borschovetska, V., Ketsa, O., Marchenko, M.: Functional activity of NADH-dependent reductase system in liver microsomal fraction in rats with Guerin's carcinoma under conditions of essential nutrients administration. *Exp. Oncol.* 40, 154–155 (2018)
165. Conti, V., Izzo, V., Corbi, G., Russomanno, G., Manzo, V., Lise, F. De, Donato, A. Di, Filippelli, A.: Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Diseases. *Front. Pharmacol.* 7, 1–11 (2016). <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00024>
166. Sheng, Y., Abreu, I.A., Cabelli, D.E., Maroney, M.J., Miller, A.F., Teixeira, M., Valentine, J.S.: Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.* 114, 3854–3918 (2014). <https://doi.org/10.1021/cr4005296>
167. Popa, D., Kiss, B., Vlase, L., Pop, A.: Study of oxidative stress induction after exposure to bisphenol a and methylparaben in rats. *Farmacologia.* 59, 539–549 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.768>
168. Heck, D.E., Shakarjian, M., Kim, H.D., Laskin, J.D., Anna, M.: Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci.* 1203, 120–125 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x>.
169. Jiao, Y., Wang, Y., Guo, S., Wang, G.: Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget.* 8, 80093–80102 (2017). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20278>
170. Sciences, H., Ain, A.: Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem. J.* 55, 45–55 (2002)
171. Bindhumol, V., Chitra, K.C., Mathur, P.P.: Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology.* 188, 117–124 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00056-8)
172. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424 (2007).

- <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
173. Борщовецька, В.Л., Шмараков, І.О.: Активність ферментативної ланки антиоксидантної системи в печінці при введенні бісфенолу А за відсутності запасів ретиноїдів. *Біологічні системи*. 8, 28–34 (2016)
 174. Kaminsky, L.S., Zhang, Q.Y.: The small intestine as a xenobiotic metabolizing organ. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1520–1525 (2003). <https://doi.org/10.1124/dmd.31.12.1520>
 175. Lu, K., Abo, R.P., Schlieper, K.A., Graffam, M.E., Levine, S., Wishnok, J.S., Swenberg, J.A., Tannenbaum, S.R., Fox, J.G.: Arsenic Exposure Perturbs the Gut Microbiome and Its Metabolic Profile in Mice: An Integrated Metagenomics and Metabolomics Analysis. *Environ. Health Perspect.* 122, 284–291 (2014). <https://doi.org/10.1289/ehp.1307429>
 176. Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S.G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárate Rodriguez, J.G., Rogers, A.B., Robine, N., Loke, P., Blaser, M.J.: Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*. 158, 705–721 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052>
 177. Guo, M., Huang, K., Chen, S., Qi, X., He, X., Cheng, W.H., Luo, Y., Xia, K., Xu, W.: Combination of metagenomics and culture-based methods to study the interaction between ochratoxin a and gut microbiota. *Toxicol. Sci.* 141, 314–323 (2014). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu128>
 178. Lai, K.P., Chung, Y.T., Li, R., Wan, H.T., Wong, C.K.C.: Bisphenol A alters gut microbiome: Comparative metagenomics analysis. *Environ. Pollut.* 218, 923–930 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.039>
 179. Javurek, A.B., Spollen, W.G., Johnson, S.A., Bivens, N.J., Bromert, K.H., Givan, S.A., Rosenfeld, C.S.: Effects of exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on the gut microbiota of parents and their offspring in a rodent model. *Gut Microbes.* 7, 471–485 (2016).

- <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1234657>
180. Chen, M., Zhou, K., Chen, X., Qiao, S., Hu, Y., Xu, B., Xu, B., Han, X., Tang, R., Mao, Z., Dong, C., Wu, D., Wang, Y., Wang, S., Zhou, Z., Xia, Y., Wang, X.: Metabolomic analysis reveals metabolic changes caused by bisphenol A in rats. *Toxicol. Sci.* 138, 256–267 (2014). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu016>
181. Zhao, C., Tang, Z., Yan, J., Fang, J., Wang, H., Cai, Z.: Bisphenol S exposure modulate macrophage phenotype as defined by cytokines profiling, global metabolomics and lipidomics analysis. *Sci. Total Environ.* 592, 357–365 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.035>
182. Paoletta, G., Mandato, C., Pierri, L., Poeta, M., Di Stasi, M., Vajro, P.: Gut-liver axis and probiotics: Their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 15518–15531 (2014). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15518>
183. Fabia, R., Ar'Rajab, A., Johansson, M.L., Andersson, R., Willén, R., Jeppsson, B., Molin, G., Bengmark, S.: Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion.* 54, 248–255 (1993). <https://doi.org/10.1159/000201045>
184. Hopkins, M.J., Sharp, R., Macfarlane, G.T.: Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut.* 48, 198–205 (2001). <https://doi.org/10.1136/gut.48.2.198>
185. Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., Garcia-Gil, L.J.: Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 1136–1145 (2006). <https://doi.org/10.1097/01.mib.0000235828.09305.0c>
186. Riordan, S.M., Williams, R.: The intestinal flora and bacterial infection in cirrhosis. *J. Hepatol.* 45, 744–757 (2006).

- <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.08.001>
187. Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., Doré, J.: Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 52, 237–242 (2003). <https://doi.org/10.1136/gut.52.2.237>
 188. Minemura, M., Shimizu, Y.: Gut microbiota and liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 21, 1691–1702 (2015). <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i6.1691>
 189. Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Smart, J., Gopal, P.K.: Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Product Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Env. Microbiol.* 66, 2578–2588 (2000). <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2578-2588.2000>
 190. De LeBlanc, A.M. De, LeBlanc, J.G.: Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. *World J. Gastroenterol.* 20, 16518–16528 (2014). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16518>
 191. Matsuoka, K., Mizuno, S., Hayashi, A., Hisamatsu, T., Naganuma, M., Kanai, T.: Fecal Microbiota Transplantation for Gastrointestinal Diseases. *Keio J. Med.* 63, 69–74 (2014). <https://doi.org/10.2302/kjm.2014-0006-RE>
 192. Gupta, S., Allen-Vercoe, E., Petrof, E.O.: Fecal microbiota transplantation: In perspective. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 9, 229–239 (2016). <https://doi.org/10.1177/1756283X15607414>
 193. Versalovic, J.: Probiotics: Intestinal gatekeeping, immunomodulation, and hepatic injury. *Hepatology.* 46, 618–621 (2007). <https://doi.org/10.1002/hep.21916>
 194. Adawi, D., Ahrné, S., Molin, G.: Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 213–220

- (2001). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00550-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00550-5)
195. Chiva, M., Soriano, G., Rochat, I., Peralta, C., Rochat, F., Llovet, T., Mirelis, B., Schiffrin, E.J., Guarner, C., Balanzó, J.: Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J. Hepatol.* 37, 456–462 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00142-3](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00142-3)
196. Liu, Q., Duan, Z.P., Ha, D.K., Bengmark, S., Kurtovic, J., Riordan, S.M.: Synbiotic Modulation of Gut Flora: Effect on Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis. *Hepatology.* 39, 1441–1449 (2004). <https://doi.org/10.1002/hep.20194>
197. Loguercio, C., Federico, A., Tuccillo, C., Terracciano, F., D’Auria, M.V., De Simone, C., Del Vecchio Blanco, C.: Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J. Clin. Gastroenterol.* 39, 540–543 (2005). <https://doi.org/10.1093/jn/137.8.1901>
198. Eutamene, H., Lamine, F., Chabo, C., Theodorou, V., Rochat, F., Bergonzelli, G.E., Corthésy-Theulaz, I., Fioramonti, J., Bueno, L.: Synergy between *Lactobacillus paracasei* and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats. *J. Nutr.* 137, 1901–1907 (2007). <https://doi.org/10.1093/jn/137.8.1901> [pii]
199. Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P.-C., Ngan, B.-Y., McKay, D.M., Soderholm, J.D., Perdue, M.H., Sherman, P.M.: Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut.* 55, 1553–1560 (2006). <https://doi.org/10.1136/gut.2005.080739>
200. Wilson, I.D., Nicholson, J.K.: Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* 179, 204–222 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002>
201. Knasmüller, S., Steinkellner, H., Hirschl, A.M., Rabot, S., Nobis, E.C., Kässler, F.: Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal

- microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat. Res.* 480–481, 129–138 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00176-2)
202. Orrhage, K., Sillerström, E., Gustafsson, J.Å., Nord, C.E., Rafter, J.: Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res.* 311, 239–248 (1994). [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90182-1)
203. Zhang, X. Bin, Ohta, Y.: Antimutagenicity of cell fractions of microorganisms on potent mutagenic pyrolysates. *Mutat. Res.* 298, 247–253 (1993). [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(93\)90003-V](https://doi.org/10.1016/0165-1218(93)90003-V)
204. Lidbeck, A., Nord, C.E., Gustafsson, J.A., Rafter, J.: Lactobacilli, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. *Eur. J. Cancer Prev.* 1, 341–353 (1992)
205. Caldini, G., Trotta, F., Villarini, M., Moretti, M., Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., Cenci, G.: Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 37–47 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.015>
206. Chalova, V.I., Lingbeck, J.M., Kwon, Y.M., Ricke, S.C.: Extracellular antimutagenic activities of selected probiotic *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. as a function of growth phase. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* 43, 193–198 (2008). <https://doi.org/10.1080/03601230701795262>
207. Kumar, P., Ranawade, A. V., Kumar, N.G.: Potential probiotic *Escherichia coli* 16 harboring the *Vitreoscilla* hemoglobin gene improves gastrointestinal tract colonization and ameliorates carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–9 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/213574>
208. Osman, N., Adawi, D., Ahrné, S., Jeppsson, B., Molin, G.: Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of

- Lactobacillus, Bifidobacterium and blueberry. *Dig Liver Dis.* 39, 849–856 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.dld.2007.06.001>
209. Sharma, S., Chaturvedi, J., Chaudhari, B.P., Singh, R.L., Kakkar, P.: Probiotic *Enterococcus lactis* ПTRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Nutrition.* 28, 173–181 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.02.012>
210. Шмараков, І.О., Борщовецька, В.Л., Марченко, М.М.: А61К35/74 Спосіб пробіотичної превентивної корекції бісфенол А-індукованого токсичного ураження печінки, (2017)

ДОДАТОК А СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

Видання, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Shmarakov I. O., Borschovetska V. L., Blaner W. S. Hepatic detoxification of Bisphenol A is retinoid-dependent. *Toxicol. Sci.* 2017. Vol. 157. P. 141–155.
2. Shmarakov I. O., Borschovetska V. L., Ivanishchuk L. P., Marchenko, M. M. Hepatotoxicity of bisphenol A under conditions of differential supplementation with retinoids. *Ukr. Biochem. J.* 2016. Vol. 88. P. 99–105.

Наукові фахові видання:

3. Борщовецька В. Л., Шмараков І. О. Активність ферментативної ланки антиоксидантної системи в печінці при введенні бісфенолу А за відсутності запасів ретиноїдів. *Біол. сист.* 2016. Т. 8. С. 28–34.
4. Borschovetska V., Marchenko M. Lipid profile of blood serum in mice under conditions of bisphenol A administration and vitamin A different supplementation. *Biol. Syst.* 2019. Vol. 11. P. 115–121.

Патенти:

5. Пат. № 115978. А61К35/74. Спосіб пробіотичної превентивної корекції бісфенол А-індукованого токсичного ураження печінки. Шмараков І. О., Борщовецька В. Л., Марченко М. М.; опуб. Бюл. № 9, від 10.05.2017.

Монографія:

6. Біохімічні аспекти функціонування ретиноїдів : монографія. М. М. Марченко, І. О. Шмараков, В. Л. Борщовецька. Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2017. 112 с.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. Борщовецька В. Л., Шмараков І. О., Марченко М. М. Забезпеченість ретиноїдами як фактор, що визначає активацію детоксикаційної системи. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016: Конференція-конкурс робіт молодих учених, Київ, 26 – 27 травня 2016 р.: *Укр. біохім. журн.* 2016. Т. 88, № 4. С. 86.
8. Borschovetska V., Ketsa O., Marchenko M. Functional activity of NADH-dependent reductase system in liver microsomal fraction in rats with Guerin's carcinoma under conditions of essential nutrients administration. International Scientific Symposium «Fundamental principles of cancer biotherapy», 21-23 May 2018, Kyiv.: *Experimental Oncology*. 2018. Vol. 40, N 2. P. 154-155.
9. Borschovetska V. L., Nahez O. O., Marchenko M. M. Lipid profile of blood serum in mice under the conditions of Bisphenol A administration and Vitamin A overconsumption. Young scientists Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”, 21-22 March, 2019, Kyiv.: *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91, N 2. P. 73.

ДОДАТОК Б

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. Вимоги безпеки під час виконання роботи:

- ❖ Дозволяється працювати тільки на заземлених об'єктах.
- ❖ Забороняється встановлювати запобіжники, що не відповідають номінальному значенню.
- ❖ Забороняється виконувати заміну запобіжників при включеному обладнанні.

2. Вимоги безпеки перед початком роботи:

- ❖ Перевірити стан та одягти спецодяг, спецвзуття та засоби індивідуального захисту.
- ❖ Включити припливно-витяжну вентиляцію за 10-15 хв. до початку роботи.
- ❖ Перевірити справність приладів, обладнання; наявність необхідних реактивів.
- ❖ При необхідності включити вентиляцію у витяжній шафі.
- ❖ Перед проведенням робіт із застосуванням вакууму випробувати установку на герметичність.
- ❖ При виявленні несправностей обладнання сповістити керівника робіт та не приступати до роботи до усунення виявлених несправностей.

2. Правила безпеки при роботі на центрифугах:

- ❖ Не працювати на вищій максимальної частоті обертання для даного ротору.
- ❖ Не працювати з неповними та нерівномірно заповненими стаканами роторів.
- ❖ Не центрифугувати препарат з густиною, більшою за $1,2 \cdot 10^3 \text{ кг/м}^3$ на максимальній частоті обертання ротору.
- ❖ Не працювати з роторами, що відпрацювали свій термін експлуатації.
- ❖ Не запускати жодного приладу без попередньої перевірки.

- ❖ Не залишати діючий прилад без догляду.
- ❖ Для попередження нещасних випадків через можливий викид реакційної суміші не заглядати в пробірку або колбу зверху.

2. Техніка безпеки при роботі в лабораторіях:

- ❖ Працювати в лабораторії необхідно в халаті, захищаючи одяг і шкіру від попадання і роз'їдання реактивами і забруднення мікроорганізмами.
- ❖ Приступаючи до роботи, необхідно: усвідомити методику роботи, правила її безпечного виконання; перевірити відповідність взятих речовин тим, які вказані в методиці роботи.
- ❖ Дослід необхідно проводити в точній відповідності з його описом в методичних вказівках, особливо дотримуватися черговості додавання реактивів.
- ❖ Не виносити із лабораторії прилади, посуд та реактиви.
- ❖ Всі операції, пов'язані із застосуванням або можливим утворенням і виділенням отруйних, їдких, вибухонебезпечних речовин або речовин, які володіють запахом, виконувати тільки у витяжній шафі при працюючій загальнообмінній вентиляції із застосуванням засобів індивідуального захисту.
- ❖ Необхідно дотримуватися запобіжних заходів при роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами.
- ❖ Для нагрівання легкозаймистих та горючих рідин не використовувати відкрите полум'я.
- ❖ Змішування або розведення хімічних речовин, що супроводжуються виділенням тепла слід виконувати в термостійкому або порцеляновому посуді.
- ❖ При нагріванні рідини у пробірці необхідно спрямовувати її у бік від себе й осіб, які знаходяться поруч.
- ❖ При збовтуванні розчину у колбах і пробірках закривати їх тільки пробками.

- ❖ Не здійснювати відбір порцій речовин безпосередньо з великих бутлів, бочок.
- ❖ Не залишати запалені пальники та інші нагрівальні прилади без нагляду.
- ❖ Не виливати у раковину залишки кислот, лугів, вогненебезпечних рідин. Зливати ці речовини в спеціальні склянки, що знаходяться під витяжною шафою.
- ❖ Розчини, що містять кислоти та луги, перед тим як виливати у каналізаційну систему необхідно нейтралізувати.
- ❖ Отруйні речовини повинні бути знешкоджені хімічною обробкою або спалені в спеціально відведеному місці за межами лабораторії, бажано на повітрі.
- ❖ Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток.

4. Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях:

- ❖ При виникненні пожежі необхідно негайно вимкнути газ у всій лабораторії, прибрати із помешкання всі горючі речовини, засипати піском або закрити ковдрою вогнище і повідомити черговому пожежної охорони про те, що сталося (тел. - 101).
- ❖ Якщо в лабораторії за якихось причин пролита значна кількість легкозаймистої рідини, то необхідно загасити всі горілки та електронагрівальні прилади, відчинити вікна та збирати пролиту рідину ганчіркою або рушником, місце проливу засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою і винести у спеціально відведене місце.
- ❖ При легких термічних опіках шкіру слід обмити спиртом, а потім змастити гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та спиртом необхідно змастити засобом від опіків (наприклад, сульфідиновою емульсією).
- ❖ При опіках сильними кислотами потрібно промити обпалене місце

великою кількістю води, а потім 3% розчином соди. При опіках сильними лугами шкіру потрібно промити водою, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти.

- ❖ При випадковому потраплянні реактивів всередину рекомендується випити побільше води. Поряд з цим необхідно: а) при отруєнні кислотами випити склянку 2% вуглекислої соди, б) при отруєнні лугами випити склянку 2% оцтової або лимонної кислоти.
- ❖ У випадку загорання горючої рідини слід погасити всі горілки, прикрити полум'я азбестовим рушником або засипати його піском, чи скористатися вогнегасником з вуглекислим газом. Розчинні у воді вогнебезпечні речовини, такі як спирт, ацетон та інші можна гасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад, ефір, бензол, бензин), то воду використовувати для гасіння пожежі не можна, оскільки вона не тільки не буде ліквідована, але може навіть збільшитися. У цьому випадку полум'я слід гасити піском та використовувати вогнегасник.

5. Вимоги безпеки після закінчення роботи:

- ❖ По закінченню необхідно вимкнути газ і електроприлади, що використовувалися при виконанні даної роботи.
- ❖ Посуд, у якому проводили роботу з вогнебезпечними реактивами, повинен бути негайно вимитий.
- ❖ Хімікати, реактиви та інші речовини і матеріали покласти у відведене для них місце.
- ❖ Привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру, виключити головний газовий кран, вентиляцію та світло, а також перевірити, чи видалені з приміщення лабораторії надлишки горючих речовин, відпрацьовані рідини, сміття, промаслене ганчір'я, перевірити, чи весь посуд з реактивами закритий пробками та поставлений на відведені місця.