

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

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

**ВМІСТ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ
ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ АЦЕТАМІНОФЕНОМ НА ТЛІ
АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ ПРОТЕЇНУ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 Б групи
спеціальності 091 Біологія

Бринзила Валерія Володимирівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,
асистент **Николайчук І.М.**

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____

від „__” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

Анотація

Бакалаврська робота присвячена дослідженню вмісту металотіонеїнів у цитозольній та мітохондріальній фракціях печінки щурів, а також Cu, Zn-вмісної супероксиддисмутази в цитозолі печінки за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної протеїнової недостатності.

Встановлено, що в субклітинних фракціях печінки щурів спостерігаються різнонаправлені зміни вмісту металотіонеїнів: у цитозольній фракції печінки зареєстровано підвищення вмісту МТ за умов введення токсичних доз ацетамінофену незалежно від кількості протеїну в харчовому раціоні, в мітохондріях – зниження даного показника у всіх дослідних групах тварин із найнижчими значеннями на тлі ацетамінофен-індукованою ураження.

Токсичне ураження ацетамінофеном незалежно від кількості споживання харчового протеїну виступає ключовим чинником підвищення активності Cu,Zn-супероксиддисмутази у цитозольній фракції печінки щурів.

Ключові слова: металотіонеїни, цинк, Cu,Zn-супероксиддисмутаза, печінка, ацетамінофен, аліментарна депривація протеїну.

Annotation

The bachelor's thesis is devoted to the study of the content of metallothioneins in the cytosolic and mitochondrial fractions of rat livers, as well as Cu, Zn-containing superoxide dismutase in the cytosol of the liver under conditions of toxic damage by acetaminophen against the background of dietary protein deficiency.

It was found that in the subcellular fractions of the liver of rats, multidirectional changes in the content of metallothioneins are observed: in the cytosolic fraction of the liver, an increase in the content of MT was registered under the conditions of administration of toxic doses of acetaminophen, regardless of the amount of protein in the diet, in mitochondria - a decrease in this indicator in all experimental groups of animals with the lowest values against the background of acetaminophen-induced lesions.

Toxic damage by acetaminophen, regardless of the amount of dietary protein consumption, is a key factor in increasing the activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the cytosolic fraction of rat liver.

Key words: metallothioneins, zinc, Cu,Zn-superoxide dismutase, liver, acetaminophen, dietary protein deprivation.

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

_____ **В.В. Бринзила**

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Загальні властивості металотіонеїнів... ..	7
1.2. Ізоформи металотіонеїнів... ..	8
1.3. Регуляція деградації металотіонеїнів	9
1.4. Роль металотіонеїнів у функціонуванні мітохондрій	10
1.5. Металотіонеїни та оксидативний стрес.	12
1.6. Біологічна роль Cu,Zn-супероксиддисмутаза та її функції в організмі.....	14
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	16
2.1. Матеріали та методи досліджень.....	16
2.2. Виділення мітохондріальної фракції	19
2.3. Виділення цитозольної фракції	19
2.4. Визначення вмісту металотіонеїнів... ..	20
2.5. Визначення супероксиддисмутазної активності	20
2.6. Статистичні методи дослідження	21
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ... ..	22
ВИСНОВКИ.....	29
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	30
ДОДАТКИ.....	35

ВСТУП

Металотіонеїни (МТ) – це низькомолекулярні металозв'язуючі білки з високим вмістом залишків цистеїну. Найбільш ефективними індукторами МТ є кадмій та цинк. Даний факт вказує на те, що цей унікальний білок відіграє важливу роль у метаболізмі та детоксикації важких металів. Однак, багато інших агентів та речовин навколишнього середовища підвищують рівень МТ у печінці. Деякі стресові стани, зокрема висока та низька температура, інтенсивні фізичні вправи, обмеження в їжі, бактеріальна інфекція та рентгенівське опромінення призводять до підвищення рівня МТ у печінці щурів. Подібне явище спостерігали у щурів, які отримували катехоламіни та глюкокортикостероїди. Окрім того, в літературі [1] описано, що індукція печінкових МТ спостерігається після введення деяких гепатотоксичних речовин, зокрема чотирихлористого вуглецю, бромбензолу, етанолу, уретану, а також ацетамінофену тощо.

Сьогодні відомий всім ацетамінофен, як знеболюючий та жарознижуючий набув популярності при використанні COVID-19. Окрім того цей же ацетамінофен використовують як модельний токсин для моделювання гепатотоксичності [2].

Гепатотоксичність ацетамінофену зумовлена каскадом біохімічних реакцій ініційованих N-ацетил-p-бензохінон-іміном (NAPQI), що утворюється під час окиснення даного ксенобіотика цитохромом P-450. Цей метаболіт може викликати оксидативний та нітрозитивний стрес, що супроводжується дисфункцією мітохондрій [3].

Металотіонеїни захищають клітини і тканини від токсичної дії важких металів. Тому висока металозв'язуюча здатність МТ широко використовується у біохімії. Також показано, що МТ відіграють захисну роль при ураженнях печінки. Як джерело сульфгідрилів, МТ можуть поглинати електрофільні проміжні продукти ацетамінофену та вільних радикалів, які пов'язані з метаболізмом ацетамінофену [4].

Металотіонеїни складаються з чотирьох ізоформ: МТ-1, МТ-2, МТ-3 і МТ-4. МТ-1 і МТ-2 експресуються у багатьох органах, особливо в печінці, підшлунковій залозі, кишечнику, нирках та головному мозку. МТ-3 – в головному мозку, а МТ-4 – в епітеліальних клітинах шкіри та кишечнику. Також металотіонеїни відіграють захисну роль у клітинах під час захворювань та стресових станів. Головні функції МТ включають регуляцію гомеостазу металів, детоксикацію важких металів і нейтралізацію вільних радикалів. МТ також сприяють виживанню дисфункціональних мітохондрій, діючи як високоефективні відновлювальні елементи, що протистоять руйнівним властивостям активних форм кисню (АФК) та обмежують апоптоз [5].

Металотіонеїни (МТ) можуть проявляти різні субклітинні локалізації, включаючи ядерну, цитоплазматичну та мітохондріальну локалізацію. Зокрема, МТ були знайдені в ядрі клітин, де вони беруть участь у регуляції експресії генів, відновленні ДНК та захисті від окисного стресу. Також, МТ присутні в мітохондріях, де вони сприяють функціонуванню цих клітинних органел, захищаючи їх від окисного пошкодження та забезпечуючи цілісність мітохондрій. Але основна маса МТ знаходиться у цитозолі, де відіграють певну роль у підтримці гомеостазу металів, детоксикації важких металів і поглинанні вільних радикалів [6].

Окрім того відомо, що цинковмісним ферментом антиоксидантного захисту є супероксиддисмутаза-1 (СОД1), який є критично важливим ферментом для утилізації активних форм кисню у цитозолі [7].

Мета роботи – дослідити вміст металотіонеїнів у цитозольній та мітохондріальній фракціях печінки щурів та активність Cu,Zn-супероксиддисмутази за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні властивості металотіонеїнів

МТ – це внутрішньоклітинні неферментативні білки довжиною 61-68 амінокислот з молекулярною масою 6-7 кДа. МТ мають високий вміст цистеїну (близько 30 %) і не містять ароматичних амінокислот. Високий вміст Сульфуру надає цьому білку здатність зв'язувати 7 - 12 іонів металів (залежно від валентності металів) і звідси і назва – «металотіонеїни». Зв'язування різних металів з білком визначає його третинну структуру і, можливо, його локалізацію та функцію [8].

Незважаючи на незначні відмінності у третинній структурі, білок завжди утворює два певні глобулярні домени, що надають йому гантелеподібної форми. Залишки цистеїну в цьому білку утворюють характерні послідовності Cys-Хаа-Cys, Cys-Хаа-Хаа-Cys та Cys-Cys де Хаа – будь-яка нецистеїнова амінокислота. Ці залишки цистеїну орієнтовані назовні і так використовуються для швидкого поглинання іонів металів та кисневих радикалів. Зовнішня орієнтація залишків цистеїну, також запобігає спонтанному утворенню дисульфідних містків за фізіологічних умов і таким чином зберігає кластери цистеїну для зв'язування металів. Однак МТ можуть легко окислюються в нефізіологічних умовах за наявності значної кількості кисню [9].

Сімейство металотіонеїнів складається з чотирьох основних ізоформ: МТ-1, МТ-2, МТ-3, МТ-4. При цьому більшість організмів експресують принаймні перші дві ізоформи. МТ-1 і МТ-2 експресуються у всіх основних органах, особливо в печінці, підшлунковій залозі кишечника, нирках та головному мозку. Ізоформа МТ-2 може становити понад 80 % всієї експресії МТ людини. МТ-3 має сім додаткових амінокислот до своєї первинної структури і в основному експресується в головному мозку та центральній нервовій системі. Експресія МТ-3 здебільшого регулюється в протилежному напрямку, ніж у МТ-1 і МТ-2, коли вони піддаються впливу одного і того ж стимулу. МТ-4 – це нещодавно відкрита ізоформа, яка експресується

переважно в епітеліальних клітинах шкіри, язика та слизової оболонки кишечника [10]. Хоча ці ізоформи є високогомологічними та мають подібні функціональні властивості, але відмінності між ними все ж таки наявні. Однак, через відсутність чистих стандартів та специфічних методів виявлення, важко визначити та розрізнити різні ізоформи та їхні відповідні функції.

1.2. Ізоформи металотіонеїнів

Ізоформи МТ класифікують на основі різних факторів:

- молекулярної маси;
- металу, який зв'язується;
- закодованих генів, хромосоми, атоми зв'язування тощо.

Загалом їх поділяють на основні та допоміжні групи. Основними групами є МТ-1 і МТ-2 – це унікальна структура, яка є ідентичною для двох основних ізоформ, що зв'язує 7 г атомів двовалентних металів, таких як цинк та кадмій. МТ-3 і МТ-4 – це мінорні ізоформи, які зазвичай зустрічаються в спеціалізованих клітинах. Вперше білок МТ-3 виділений як фактор, що пригнічує ріст з нейронів головного мозку, а білок МТ-4 знайдений у багат шаровому епітелії [11].

У людини білки МТ кодуються сімейством генів, які розташовані на хромосомі 16q13, і може включати щонайменше 10 ідентифікованих функціональних генів. Гени кодують декілька ізоформ МТ-1 і, як правило, одну ізоформу МТ-2. Лише для МТ-3 і МТ-4 були виявлені поодинокі гени. Експресія та генні послідовності функціональних генів виявлені для МТ-1а, МТ-1b, МТ-1e і МТ-1f, МТ-1g, МТ-1h і МТ-1x, МТ-2а, МТ3, і МТ-4.

Нефункціональні гени МТ є МТ-1c і МТ-1d, МТ-1i, МТ1j, МТ-1k і МТ-1l, і МТ-2b. А передбачуваний ген, названий МТ-0, був ідентифікований з його кДНК-послідовності та виявлено, що він експресується в печінці ембріона, а також у моноцитах. Однак, секвенування гена показало, що МТ-0 насправді є тим самим геном, що й МТ-1h, який також експресується в мозку[12].

Різноманітність МТ контрастує з різноманітністю інших видів, таких як гризуни, у яких відомо лише чотири функціональні МТ-гени. Наприклад, гени МТ мишей розташовані на хромосомі 8 і кодують ізоформи: МТ-1, МТ-2, МТ-3 і МТ-4. Металотіонеїни також можуть проявляти гетерогенність внаслідок посттрансляційних модифікацій і МТ від щурів, оброблених Zn та Cd, містить значну кількість неацетильованих МТ-2.

Конститутивні рівні експресії МТ можна знайти в більшості клітин, хоча вони варіюють залежно від типу клітин [13].

1.3. Регуляція деградації металотіонеїнів

Деградація білка МТ також є важливим аспектом їх регуляції МТ.

Існують величезні відмінності в періодах напіврозпаду МТ, синтезованих в результаті хімічної індукції генів МТ. Наприклад, період напіврозпаду Zn-МТ становить приблизно 18-20 годин, тоді як період напіврозпаду Cd-МТ становить близько 3 днів. Дослідження показали, що період напіввиведення конститутивних МТ у дорослих щурів становить близько 4 год, тоді як у новонароджених – 49 год. МТ, індуковані етанолом, ZnCl₂ або CdCl₂ також мають дуже різний період напіввиведення, приблизно 9, 25 та 60 год. Це вказує на те, що деградація МТ залежить від віку тварин і металу, зв'язаного з МТ [14].

Деградація МТ в першу чергу регулюється вмістом Zn у клітинах і відбувається як у лізосомальному, так і в нелізосомальному компартментах. Значення катепсину В у лізосомальній фракції продемонстрована та виявлено, що специфічні інгібітори катепсину В пригнічують деградацію апо-МТ на 80%. Також показано, що МТ швидко деградує коли з кожною молекулою МТ зв'язано менше п'яти атомів металів МТ. Одночасні дослідження показали, що при рН близькому рН лізосом більша частина Zn вивільняється з МТ, тоді як більша частина Cd не вивільняється. Це може бути причиною того, що МТ-Cd мають більший період напіврозпаду *in vivo*, ніж МТ-Zn [15].

Steinbach & Wolterbeek продемонстрували, що внутрішньоклітинний пул МТ існує щонайменше у двох формах. Це цитозольний апо-МТ та

лізосомальній металозв'язаній МТ, фонд який поповнюється з різною швидкістю. Подальші дослідження показали, що цитозольні апо-МТ можуть бути розщеплені за допомогою цитозольного 26S протеасомного комплексу. Докази того, що внутрішньоклітинний пул МТ може існувати у вигляді незалежних компартменталізованих пулів, має важливе значення для внутрішньоклітинних функції МТ [16].

Під час внутрішньоутробного розвитку концентрація МТ-1 і МТ-2 в тканинах швидко змінюються. І МТ-1, і МТ-2 виявляються в печінці плода щура на 18-й день гестації, досягаючи максимальних концентрацій при народженні. Концентрації МТ у печінці новонароджених щурів у 20 разів вищі, ніж у дорослих щурів. Цей високий рівень печінкових МТ зберігається протягом перших 2 тижнів після пологів. Після цього концентрація МТ знижується і досягає рівня, який характерний для дорослих щурів.

Одним з пояснень стабільно високого рівня МТ під час розвитку є те, що МТ локалізується в ядрі під час розвитку, і, таким чином, недоступні для внутрішньоклітинного механізму деградації. Обидві ізоформи МТ-1 та МТ-2 координовано регулюються під час розвитку. Рівні МТ у нирках, селезінці, серці, легенях, підшлунковій залозі та шлунку в три-десять разів вищі у 1-денних щурів, ніж у дорослих, і поступово знижуються до значень дорослих протягом 3-4 тижнів. На противагу цьому мозок новонароджених має нижчі (~50%) концентрації МТ, які зростають до рівня дорослих на 21-й день [17].

1.4. Роль металотіонеїнів у функціонуванні мітохондрій

Вважається, що МТ – це цитозольні білки, які транслокуються до ядра під час ранньої S-фази клітинного циклу або під час диференціації. При аналізі імуногістохімічним методом МТ були локалізовані на зовнішній мембрані мітохондрій, всередині мітохондрій при надлишку міді за патологічних умовах . Про наявність МТ у мітохондріях за фізіологічних умов не повідомлялося. Насправді, про відсутність МТ у мітохондріях серця чітко

заявлено. Підтверджено відсутність МТ у мітохондріях серця, але встановили, що він присутній у міжмембранному просторі мітохондрій (IMS) печінки [18].

Очевидно, що важливо встановити, як МТ потрапляють в мітохондрії, оскільки білок не має мітохондріальної цільової послідовності. Зовнішня мітохондріальна мембрана проникна для молекул розміром до 12 кДа. Однак немає жодного прикладу білка, подібного до МТ, який би проникав у мітохондрії через білковий комплекс, що контролює цю проникність. Імовірно, МТ імпортуються в мітохондрії за механізмом, подібним до того, що використовується для імпорту апоцитохрому *c*. Цей процес поки що унікальний і базується на взаємодії критичних залишків лізину з фосфоліпідами, прямій транслокації апопротеїну через мембрану і захопленні його в IMS шляхом включення гему в апофермент. На користь такого механізму транслокації свідчить той факт, що структурно МТ гомологічні металошаперону *Cox17*, який також не має мітохондріальної цільової послідовності і переносить мідь у мітохондрії для відновлення цитохрому *c*-оксидази. Молекулярний розмір МТ досить близький до розміру *Cox17*. Більше того, його послідовність збігається з послідовністю *Cox17* за залишками лізину та цистеїну. Механізми захоплення *Cox17* в IMS і вивільнення міді невідомі. Експериментальна підтримка механізму поглинання за участю лізину МТ впливає зі спостереження, що хімічна модифікація еволюційно консервативних лізинів значно знижує здатність молекули інгібувати мітохондріальне дихання. Як тільки МТ перетинає зовнішню мітохондріальну мембрану, він може зв'язуватися з АТФ, концентрація якого в IMS є високою через динамічну компартменталізацію аденінових нуклеотидів, що забезпечує механізм утримання МТ в IMS [19].

Одночасно цинк переноситься до інгібіторної ділянки дихального ланцюга внутрішньої мембрани мітохондрій, щоб викликати ефекти, які є предметом цього дослідження. Перенесення цинку може бути спровоковане окислювальним механізмом, або зниженням рН з 7,4 до 6,0 в активно дихаючих мітохондріях IMS або комбінацією обох механізмів. У зв'язку з цим

може бути важливим той факт, що β -, а не α -домен є активним в процесі дихання мітохондрій, і що в цьому діапазоні рН зв'язування цинку з β -доменом є слабшим, ніж з α -доменом. Доставка цинку до інгібіторної ділянки дихального ланцюга і реактивація тіонеїну аналогічна дії цинку і тіонеїну на цитозольні ензими. Таким чином, цинк сильно інгібує значну кількість ферментів, які не є металоферментами цинку, тоді як тіонеїн відмінняє це інгібування [18].

1.5. Металотіонеїни та оксидативний стрес

Генерація АФК (активні форми кисню) і АФН (активні форми нітрогену) невід'ємно пов'язана з метаболічними процесами. В їх метаболізмі беруть участь багато ферментів, включаючи каталазу, супероксиддисмутазу, ферменти-редуктази і пептиди, такі як GSH. *In vitro* МТ взаємодіють з численними АФК (супероксидом, пероксидом водню, гідроксирадикалами, оксидом азоту і пероксинітритом), що супроводжується вивільненням цинку. Фактично, МТ є більш ефективними у знешкодженні вільних радикалів, ніж GSH. АФК та окислювальний стрес також підвищують експресію МТ-1 і МТ-2 за допомогою транскрипційного фактора-1, що зв'язує цинковзв'язуючий білок (MTF-1), який є основним регуляторним білком, що опосередковує індукцію МТ. Дослідження з мишами, що надмірно експресують МТ, і мишами, що їх не експресують, додатково продемонстрували, що МТ також можуть захищати від окислювальних умов [20].

Індукція експресії МТ шляхом зв'язування цинку з MTF-1 ($K_d < 90$ мкМ) була продемонстрована *in vivo* як в умовах оксидативного стресу, так і в присутності токсичних металів. Декілька інших цинкочутливих транскрипційних факторів (наприклад, металорегуляторні білки Zur і ZntR, які контролюють експресію генів поглинання та експорту цинку) демонструють фемтомолярний рівень чутливості до цинку.

Термостабільний білок нещодавно отриманий з печінки великої рогатої худоби, був ідентифікований як цинковмісний МТ, який діє як відновник для

певних форм цинковмісної метіонінсульфоксидредуктази (MsrB2 та MsrB3) [29]. Ці білки MsrB відновлюють метіонінсульфоксид, обертаючи процес окислення метіоніну під дією АФК. Очікуваний фізіологічний відновник тіоредоксин виявився не активним для всіх сімейств ферментів Msr. Можна зробити допущення, що тіонеїн може функціонувати як відновлювальна система для людського MsrB3, утворюючи внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки. Тіоредоксин може відновлювати ці дисульфідні зв'язки в окисленому T (тіонін, T₀) для регенерації тіонеїну. Подальша робота показала, що селеноцистамін, каталізуючи обмін цинку з МТ, може також відновлювати ферменти метіонінсульфоксидредуктази, використовуючи тіоредоксин-редуктазу або тіоредоксин як відновлювальний агент [21].

Ролі МТ і розподілу цинку при захисті від окислювального пошкодження потенційно пов'язані між собою. Вивільнення цинку з МТ за умов окислативного стресу та взаємодія МТ з фізіологічно релевантними окисдантами і відновниками, згаданими раніше, підкреслюють важливість МТ у захисті клітини від окислативного пошкодження (рис.1.5.1) Де показано видалення «вільного» Zn або Zn з ферментів (каспаз, тирозинфосфатази) з подальшою активацією Zn білків і факторів транскрипції (сорбітолдегідрогенази та MTF-1) та інгібування Zn в окремих комплексах дихального ланцюга [20].

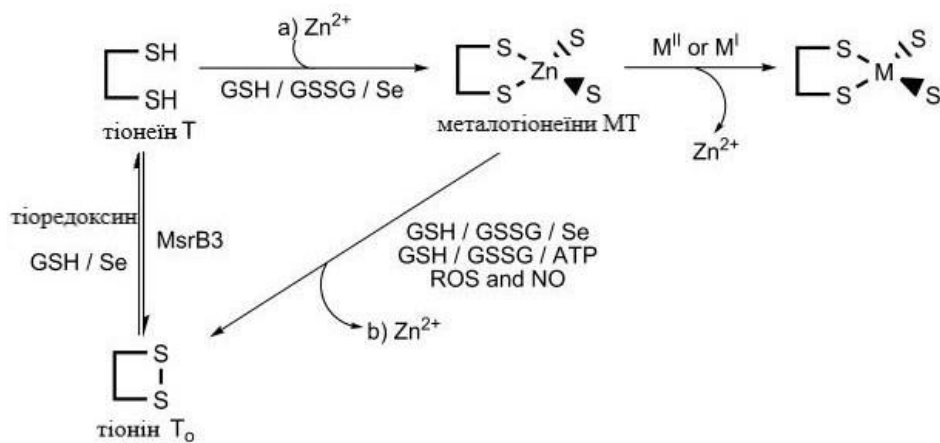


Рис.1.5.1. Окисно-відновний цикл металотіонеїнів та їх роль у цинковому гомеостазі

1.6. Біологічна роль Cu,Zn-супероксиддисмутаза та її функції в організмі

Супероксиддисмутаза Cu,Zn (СОД1) – це антиоксидантний фермент, який є висококонсервативним у всіх еукаріотів. СОД1 каталізує реакцію знешкодження двох аніонів супероксиду з утворенням пероксиду водню та кисню $[2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2]$. СОД1 людини – це поліпептид масою 15,9 кДа, який утворює гомодимер, кожен мономер якого зв'язує по одному іону міді та цинку в межах дисульфідного конформера. Активація СОД1 залежить від мідного шаперону супероксиддисмутази (Ccs1), однак, точна роль Ccs1 залишається під питанням. СОД1 демонструє високий ступінь послідовності та структурної консервативності між видами еукаріотів. СОД1 є дуже поширеним у цитоплазмі, але його граничні рівні також виявлені в міжмембранному просторі мітохондрій (IMS). Показано, що СОД1 також переміщується в ядро і пероксисоми [22].

Супероксид-аніони мають здатність діяти як окислювачі або відновники. Основними негативними наслідками накопичення супероксидних аніонів є переоксидне окислення ліпідів, пошкодження ДНК та окислення Fe-S кластерів. Супероксидні аніони є природними побічними продуктами декількох ферментів як в мітохондріях, так і в цитозолі. Зокрема, комплекси I і III мітохондріального дихального ланцюга є двома основними місцями генерації супероксиду в мітохондріях разом з 2-оксокислотними дегідрогеназами. НАДФН-оксидази також є основними учасниками утворення супероксиду в цитозолі. Токсичність видів АФК контролюється присутністю СОД1 в мітохондріальній IMS і цитозолі, а також супероксиддисмутази марганцю СОД2 в мітохондріальному матриксі [23].

Клітини, позбавлені СОД1, демонструють безліч фенотипів. Миші та фібробласти, позбавлені СОД1, демонструють підвищену чутливість до оксидативного стресу та стресу, спричиненого металами, скорочення тривалості життя тощо. Миші з нульовим СОД1 є життєздатними і були використані для вивчення ролі СОД1 у розвитку бічного аміотрофічного склерозу; однак, у них

не розвиваються будь-які очевидні аномалії моторних нейронів. Миші демонструють різноманітні фенотипи, включаючи підвищену вразливість до стресу, мітохондріальні дефекти, прогресуючу втрату м'язової маси тощо [24].

Функція СОД1 як ферменту, що поглинає активний кисень, пов'язана з окисно-відновними властивостями іона Купруму в активному центрі. Процес дисмутації супероксидного аніону відбувається за двоетапним механізмом. Спочатку початковий супероксидний аніон зв'язується з Cu(II)-СОД1, відновлюючи іон купруму з утворенням молекулярного кисню і Cu(I)-СОД1. Реакція Cu(I)-СОД1 з другим еквівалентом супероксидного аніону призводить до окиснення Cu(I) та утворення пероксиду водню. Окисно-відновний цикл міді супроводжується зміною її лігандного оточення, в якому Cu(I) існує в тригональному оточенні (His)₃, тоді як окислений іон Cu(II) має спотворену квадратну площину з чотирма His-лігандами. Ферментативна реакція СОД1 протікає з константою швидкості $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, що наближається до швидкості дифузії і практично не залежить від зміни рН в межах $\sim 5-9,5$ [25].

СОД1 традиційно характеризується як білок, що поглинає активний кисень, проте лише невелика частина клітинного СОД1 необхідна для цієї ролі, і цей фермент є одним з найпоширеніших в клітині. Це залишає можливість альтернативних функцій СОД1 в клітині [26].

В досліджах *in vitro* вперше досліджено механізм, за яким кисень необхідний для активації СОД1. Було встановлено, що Cu(I)-навантажений Ccs1 здатний реагувати з апо-СОД1 *in vitro* і сприяти перенесенню Cu та утворенню дисульфідів у присутності кисню. У цьому експерименті характерний сигнал Cu(II) спостерігався за допомогою ЕПР (електроний парамагнітний резонанс) після інкубації Cu(I)-Ccs1 з апо-СОД1 протягом 1 години в кисні при 37 °C. Однак той самий експеримент було проведено за відсутності кисню, і Ccs1 не зміг активувати СОД1 або дати характерний сигнал ЕПР Cu(II). Ці експерименти продемонстрували важливість кисню *in vitro* і узгоджуються з моделлю, в якій такі види кисню, як супероксид або пероксид водню, можуть опосередковувати активацію [27].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та методи досліджень

Для проведення досліджень використовували білих безпородних щурів віком 140-150 днів з масою тіла 150-180 грам, які перебували на утримуванні віварію кафедри біохімії та біотехнології ННІБХБ. При здійсненні усіх необхідних процедур над щурами було чітко дотримання вимог, що містяться у «Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), а також у «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», які були прийняті на VI Національному конгресі з біоетики (Київ, 2016).

Впродовж всього експерименту проводили моніторинг кількості спожитого тваринами раціону для нормування добового раціону за принципом «парного харчування» [28]. Через тиждень після утримання контрольних та дослідних тварин на напівсинтетичному раціоні (з метою уникнення стрес-специфічних реакцій переходу тварин на даний раціон) щури контрольної і дослідної групи мають споживати однакову кількість їжі. Принцип парного годування передбачав усереднений показник розрахунку спожитої їжі контрольних та дослідних тварин. В подальшому постановку контрольних тварин у тіж умови, що і дослідні [29].

Тварини протягом всього експерименту споживали напівсинтетичний раціон, який наведений нижче: (табл. 2.1.1).

«Таблиця 2.1.1

Склад напівсинтетичного раціону

Склад, г/кг	К	НПР	ТУ	НПР+ТУ
Крохмаль	620,69	714,1	620,69	714,1
Казеїн	140,0	46,6	140,0	46,6
Сахароза	100,0	100,0	400,0	100,0
Соева олія	40,0	40,0	40,0	40,0
Целюлоза	50,0	50,0	50,0	50,0

Мінеральна суміш	35,0	35,0	35,0	35,0
Вітамінна суміш	10,0	10,0	10,0	10,0
Цистеїн	1,8	1,8	1,8	1,8
Холін бітарtrat	2,5	2,5	2,5	2,5

» [30].

Таблиця 2.1.2

Мінеральна (сольова) суміш

Назва солі	Формула	Кількість, г
Фосфорнокислий калій однозаміщений	KH_2PO_4	163,3
Вуглекислий кальцій	CaCO_3	160,2
Хлористий натрій	NaCl	58,5
Сірчано-кислий магній	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	24,1
Закисне залізо	$\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	11,1
Сірчано-кислий марганець	$\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,87
Йодистий калій	KI	0,322
Сірчано-кислий цинк	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,23
Фтористий натрій	NaF	0,21
Сірчано-кисла мідь	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,2
Калій-алюміній сульфат	$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$	0,017
Фтористий кобальт	$\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,01

Таблиця 2.1.3

Вітамінна суміш

Назва вітаміну	Кількість вітаміну (мг/1кг)
----------------	-----------------------------

Нікотинова кислота	30 мг
Кальцій пантотенат	15 мг
Піродоксин	6 мг
Тіамін	5 мг
Рибофлавін	6 мг
Фіолієва кислота	2 мг
Біотин (волвіт)	0,2 мг
Вітамін В ₁₂	25 мкг
Вітамін К	960 мкг
Вітамін Е	75 мг
Вітамін А	4000 мкг
Вітамін D	1000 мкг

Токсичне ураження викликали пероральним введенням суспензії парацетамолу, в якій міститься 1250 мг препарату на кілограм маси тварини, що розчинявся у 2%-ному розчині крохмального гелю. Цей розчин було вжито один раз на день протягом 2 днів.

Дослідні щури були поділені на 4 групи:

- 1 група – тварини, які споживали раціон, збалансований за всіма нутрієнтами (К);
- 2 група – щури, які впродовж експерименту отримували низькопротеїновий раціон (НПР);
- 3 група – тварини, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном (ТУ);
- 4 група – протеїнодефіцитні щури з ацетамінофеноіндукованим ураженням (НПР+ТУ).

Тварин умертвляли на 29-й та 31-й день експерименту за допомогою методу цервікальної дислокації під легким інгаляційним наркозом. В процесі проведення дослідження було дотримано всіх біоетичних норм.

2.2. Виділення мітохондріальної фракції

Для досліджень використовували тканини печінки, які відмивали від крові в льодяному 0,9% р-ну NaCl. Далі проведено процедуру гомогенізації в розчині сахарози та фільтрації через чотири шари марлі. До середовища гомогенізації входили: 250 мМ розчин сахарози, 1 мМ EDTA, 10 мМ трис-HCl, рН 7,4.

Ядра та залишки клітин осаджували центрифугуванням при 1000 g протягом 10 хв. Осад мітохондріальної фракції отримували при повторному центрифугуванні 15 хвилин при 12000 g. Для отримання більш чистої фракції мітохондрії промивали сахарозою та піддали центрифугуванню на 15 хвилин при 12 000 g. Надалі мітохондрії розводили в 3 мл сахарози [32].

2.3. Виділення цитозольної фракції

Тканини печінки гомогенізували в 0,25 М розчині сахарози. Отриманий гомогенат фільтрували, використовуючи чотири шари марлі. Ядерну та мітохондріальну фракції одночасно осаджували методом центрифугуванням протягом 15 хв при 12 000 g.

До отриманого супернатанту додавали іони Ca^{2+} і Mg^{2+} (до 9 об'ємів надосадової рідини – 1 об'єм 80 мМ розчину CaCl_2 та 1 об'єм 160 мМ розчину MgCl_2 у 10 мМ трис-HCl буфері, рН 7,4). Отримані зразки супернатанту перемішували на магнітній мішалці протягом 10 хв при 4°C, після чого центрифугували при 10 000 g впродовж 10 хв.

Отриманий осад – це мікросомна фракція, що утворюється як агрегатна суспензія при додаванні до реакційного середовища іонів двовалентних металів (Ca^{2+} , Mg^{2+}), враховуючи те, що вони нейтралізують негативний заряд мікросом.

Надосадову рідину, яка залишалася після відділення мікросомної фракції, відбирали та використовували у дослідженнях як цитозольну (постмікросомну) фракцію.

2.4. Визначення вмісту металотіонеїнів

Визначення вмісту металотіонеїнів у мітохондріальній та цитозольній фракціях проводили за метод A. Viarengo et al [33]. Даний метод ґрунтується на оцінці кількості тіолових груп з 5,5'-дитіобіснітробензойною кислотою (ДТНБ) після екстракції в системі етанол/хлороформ. Після центрифугування до 0,3 мл відповідної фракції (мітохондріальної або цитозольної) додавали 3 мл 20 мМ трис-сахарозного буферу, рН 8,6 з додаванням 0,05 мл 0,01% β -меркаптоетанолу. Отриману суміш центрифугували впродовж 45 хвилин при 14 000 g та 4 °С. В подальшому, екстракцію супернатанту проводили за допомогою суміші охолодженого етанолу (до -20 °С) та хлороформу з наступним центрифугуванням при 6000 g протягом 10 хвилин.

До отриманого супернатанту додавали 3 мл охолодженого етанолу, перемішували протягом 15 с та інкубували 1 годину при -20 °С. Після цього до суміші додавали 1 мл 0,2 М фосфатного буферу (рН 8,0) і проби центрифугували протягом 12 хвилин при 6000 g. Отриманий супернатант декантували, а осад промивали 2 мл промивочного буферу та знову центрифугували протягом 20 хвилин при 3000 g та 4 °С. Супернатант знову декантували, а осад ресуспендували в 0,3 мл трис-EDTA буферу, рН 7,0. До цього додавали 4,2 мл 0,43 мМ розчину ДТНБ, приготовленого на 0,2 М фосфатному буфері. Екстинцію дослідних проб визначали при довжині хвилі 412 нм.

Для визначення кількості металотіонеїнів використовували калібрувальну криву на основі вмісту GSH та виражали у мкг/г вологої тканини [34].

2.5. Визначення супероксиддисмутазної активності

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД1) у цитозольній фракції печінки було використано метод [35], який базується на здатності СОД інгібувати аутоокислення адреналіну. Цей метод полягає в тому, що до 2,5 мл

0,2 М карбонатного буфера з рН=10,65 додавали 0,1 мл відповідної фракції та 0,1 мл 0,1% розчину адреналіну, після чого швидко перемішували. Навпроти 0,2 М карбонатного буфера з рН=10,65 вимірювали величину абсорбції кожні 60 с протягом 3 хв від моменту внесення адреналіну при довжині хвилі $\lambda=347$ нм [31]. Активність супероксиддисмутази виражали в умовних одиницях на міліграм білка за допомогою формули:

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

$\Gamma\%$ – відсоток гальмування,

N – розведення,

a – концентрація білка в нерозведеному біологічному матеріалі.

Вміст протеїну визначали методом Лоурі [36].

2.5. Статистичні методи дослідження

Для статистичного аналізу отриманих результатів досліджень було використано електронні таблиці прикладних програм статистичного аналізу *Microsoft Excel (Microsoft Office 2013)*. Для представлення значень було застосовано у форматі $M \pm m$, що означає середнє арифметичне значення плюс-мінус похибка. Для оцінки різниць між групами було використано параметричний t-критерій Стьюдента, а різницю між показниками вважали статистично значущою, якщо значення $p < 0,05$. Аналіз даних та побудова графіків були здійснені за допомогою пакета *Microsoft Office*.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Промотор МТ контролюється цинком (через металорегуляторний фактор транскрипції-1 (MTF-1)), а також окисненням (через ядерний фактор еритроїдний 2-споріднений фактор 2 (NRF2)). Багато сигнальних каскадів, важливих для клітинної проліферації або апоптозу, містять білкові тіоли, що діють як центри перехресних перешкод між цинковою та редокс-сигналізацією. Яскравим прикладом прикладом спільних молекулярних мішеней для цинку та АФК є тіоли цистеїну в активних центрах білкових тирозинфосфатаз, активність яких знижується внаслідок окиснення, а також зв'язування цинку. Оскільки зв'язування цинку також захищає тіоли тирозинтрифосфату від незворотного окиснення, існує багатогранна взаємна взаємодія, яка ілюструє що цинк і редокс-сигналізація тісно пов'язані на багатьох рівнях [37].

Як зазначається в літературі [38], індукція МТ *in vivo* та *in vitro* може бути викликана безліччю різних чинників: вільними радикалами, важкими металами, радіацією, цитокінами гострої фази (IL-1, IL-6, TNF- α), запальними агентами, зокрема ліпополісахаридами (LPS) тощо.

Відомо, що при надходженні токсичного агента індукція металотіонеїнів спостерігається, насамперед, у цитозолі печінці, де синтезуються ізоформи МТ-1 та МТ-2, які можуть бути індуковані і збільшувати свою концентрацію відповідно до токсичного ураження. Ці ізоформи МТ мають здатність зв'язувати та нейтралізувати токсичні метали та інші речовини.

Результати проведених досліджень показали, що в цитозольній фракції клітин печінки щурів підвищення вмісту металотіонеїнів спостерігається лише в групах тварин ТУ та НПР/ТУ в 1,5 та 2 рази відповідно порівняно з показниками контролю (рис. 3.1.1).

Транскрипційний фактор *Nrf2* є ключовим регулятором експресії генів, що кодують МТ [39]. Можна припустити, що за умов введення токсичних доз ацетамінофену відбувається активація даного фактору, що призводить до

збільшення кількості МТ у цитозолі клітини. Даний факт можна розглядати як адаптаційну реакцію організму на розвиток оксидативного стресу.

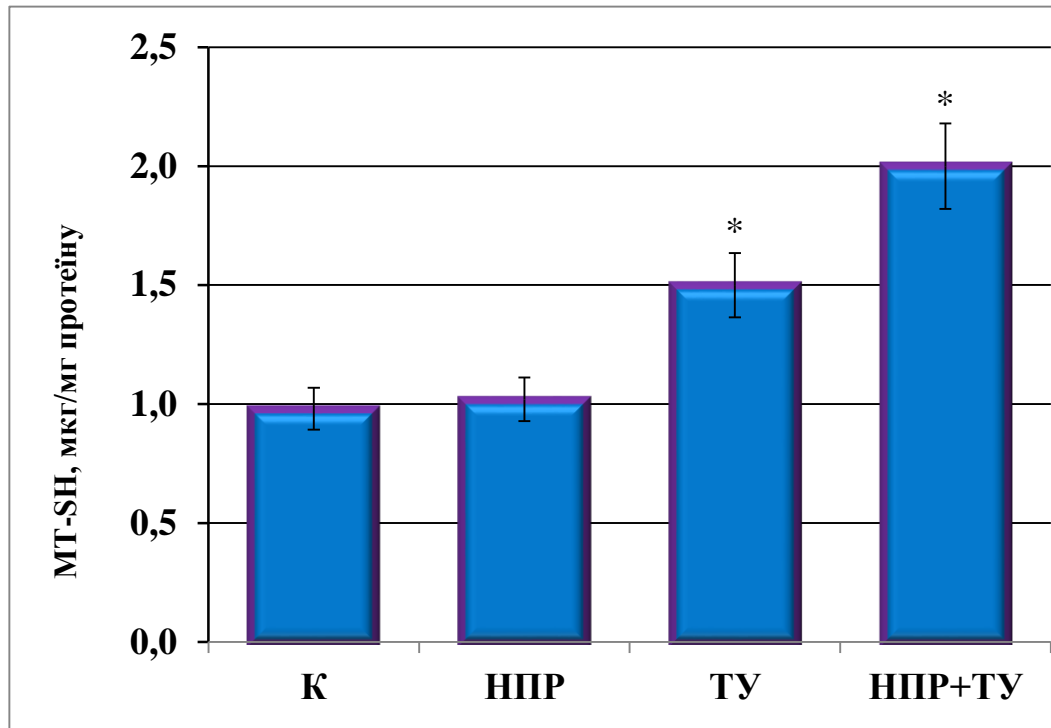


Рис. 3.1.1. Вміст металотіонеїнів у цитозольній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну

Примітка (тут і надалі):

К – контроль;

НПР – тварини, які перебували на низькопротеїновому раціоні;

ТУ – тварини, яким моделювали токсичне ураженням;

НПР/ТУ – тварини, яким на тлі аліментарної нестачі протеїну вводили токсичні дози ацетамінофену;

* – статистично вірогідна різниця порівняно з показниками контролю, $P \leq 0,05$.

Дослідження показало, що окислювальний стрес є основною причиною підвищення кількості МТ у цитозолі. Окислювальний стрес являє собою дисбаланс між продукцією та антиоксидантною буферністю активних форм кисню та/або азоту. Було виявлено, що гіперекспресія МТ захищає від токсичного впливу ацетамінофену у мишей, тоді як глобальний нокаут МТ

(тобто вони не синтезуються) робить мишей більш чутливими до деяких негативних факторів та хвороб [40].

Це свідчить про те, що металотіонеїни в печінці щурів відіграє важливу роль як потужний антиоксидант. Вони здатні знижувати рівень реактивних кисневих видів (РКВ) та інших окислювальних сполук у клітинах печінки, що сприяє захисту клітинних компонентів, включаючи ДНК, білки та ліпіди, від пошкоджень, спричинених окислюванням. Ядерний фактор еритроїдний 2-споріднений фактор 2 (Nrf2) є головним фактором транскрипції, який виконує критичну функцію в регуляції генів антиоксидантного захисту. Nrf2 регулює експресію своїх генів-мішеней шляхом зв'язування з елементами антиоксидантної відповіді в їхніх промоторних ділянках. МТ був ідентифікований як потенційна наступна мішень Nrf2 вже давно, але реальних доказів на користь цього бракує [41].

Щодо концентрації металотіонеїнів в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів спостерігається зниження їхнього вмісту в групах тварин НПР, ТУ та НПР/ТУ відповідно порівняно з показниками контролю (рис. 3.1.2). У мітохондріях, зазвичай, присутня ізоформа МТ-3, але її експресія може бути менша порівняно з МТ-1 та МТ-2. Тому, при пошкодженні мітохондрій під впливом ацетамінофену, може спостерігатись зменшення концентрації МТ у мітохондріях.

Передозування ацетамінофену призводить до насичення шляхів глюкуронізації та сульфатації. Тому надлишок АРАР метаболізується переважно СYP2E1, що призводить до збільшення виходу NAPQI, який може призвести до виснаження запасів GSH у печінці. Крім того, якщо метаболізм АРАР відбувається в умовах обмеженого рівня GSH, вільний некон'югований NAPQI реагує з сульфгідрильними групами на залишках цистеїну та лізину, утворюючи білкові аддукти NAPQI (АРАР-білкові аддукти) в гепатоцитах, зокрема в мітохондріях, що призводить до мітохондріальної дисфункції і загибелі клітин [42].

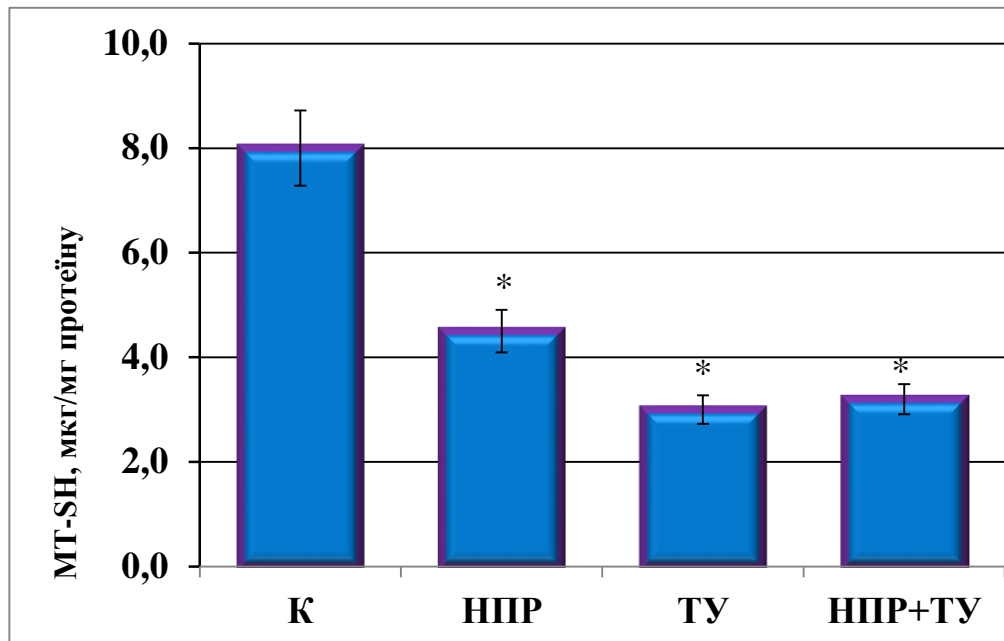


Рис. 3.1.2. Вміст металотіонеїнів у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну

Зв'язування NAPQI з мітохондріальними білками сприяє дисфункції мітохондрій після виснаження мітохондріального GSH (mGSH), спричиняючи утворення активних форм кисню (АФК), оксидативний стрес і пошкодження мітохондріальної ДНК. Крім того, NAPQI може впливати на α -субодиницю АТФ-синтази, що призводить до дефектного або порушеного вироблення АТФ, що сприяє витоку мітохондріальних білків у цитозоль, які сприяють загибелі клітин через індукцію пор мітохондріальної проникності. Відкриття яких порушує непроницність внутрішньої мембрани мітохондрій, дозволяючи перенесення розчинених речовин у матрикс, що призводить до вторинного розриву зовнішньої мембрани мітохондрій. Тому раннє втручання для поповнення запасів mGSH шляхом постачання попередника GSH, такого як N-ацетилцистеїн (NAC), або націлене на висхідні механізми, що беруть участь у мітохондріальній дисфункції та генерації АФК, такі як тривала активація N-кінцевих кіназ c-Jun (JNK), може призвести до захисту від АРАР-опосередкованої гепатотоксичності [43].

Тобто, ацетамінофен спричинює пряме пошкодження мітохондрій внаслідок утворення токсичного метаболіту N-ацетил-п-бензохіноніміна (NAPQI), що в свою чергу призводить до окислювального стресу та пошкодження компонентів мітохондрій, включаючи білки та ДНК. Після введення парацетамолу, переважна частина його метаболізується за допомогою ферменту CYP2E1, що призводить до утворення NAPQI. При нормальних умовах, NAPQI реагує з глутатіоном (GSH), який є важливим антиоксидантом, і утворює нешкідливий кон'югат, який може бути виведений з організму.

Однак, при великих дозах парацетамолу або при недостатньому рівні глутатіону, NAPQI може перевищити доступний GSH і залишитися у вільному вигляді. Це може призвести до утворення реактивних кисневмісних видів (ROS), включаючи перекисні радикали і супероксидні радикали. Реактивні кисневмісні види можуть спричинити окислювальний стрес та пошкодження клітинних компонентів, зокрема мітохондріїв. Пошкоджені мітохондрії можуть мати порушену функцію, включаючи зменшену експресію МТ у них [44].

Зниження рівня металотіонеїнів у мітохондріях при ураженні ацетамінофеном може сприяти збільшенню ураження мітохондрій та погіршенню гепатотоксичності. Металотіонеїни мають протимітохондріальну активність і можуть захищати мітохондрії від окислювального стресу та дисфункції.

Не менш важливим є цинквмісний ензим антиоксидантного захисту супероксиддисмутаза-1 (СОД1), який є критично важливим ферментом для обмеження активних форм кисню як у цитозолі. Cu,Zn-супероксиддисмутаза-1 (SOD1) – це фермент, який відіграє вирішальну роль у захисті клітин від окислювального стресу, каталізуючи дисмутацію супероксидних радикалів у перекис водню та молекулярний кисень. Результати проведених досліджень показали, що в цитозольній фракції клітин печінки щурів спостерігається

підвищення вмісту Cu,Zn-супероксиддисмутази-1 лише в групах тварин ТУ та НІР/ТУ відповідно порівняно з показниками контролю (рис. 3.1.3).

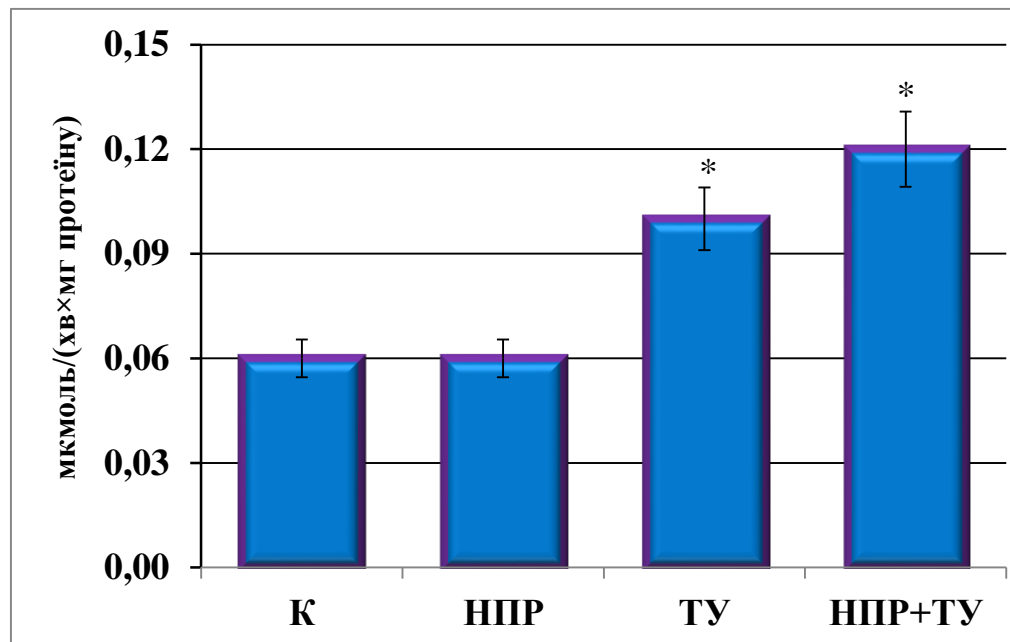


Рис. 3.1.3. Активність Cu,Zn-супероксиддисмутази-1 у цитозольній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну.

Загалом, механізм підвищення рівнів SOD1 у цитозольній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження парацетамолом на тлі аліментарної нестачі протеїну можна пов'язати зі збільшення вироблення шаперонів та зміни в білковому обміні клітини.

Аліментарна нестача протеїну суттєво впливає на стабільність та розподіл Cu,Zn-супероксиддисмутази-1 (SOD1) в клітині, зокрема в печінці. Під впливом аліментарної нестачі протеїну виникає збільшення вироблення шаперонів, таких як Hsp70 (тепловий шоківий білок 70), які мають важливу роль у стабілізації та транспорті SOD1 до цитозольної фракції. Це може призвести до збільшення рівнів SOD1 у цитозольній фракції печінки. Білок теплового шоку 70 (Hsp70) – це молекулярний шаперон, який експресується у відповідь на стрес. У цій ролі Hsp70 зв'язується зі своїми білковими

субстратами і стабілізує їх від денатурації або агрегації до покращення умов. І На додаток до своїх функцій під час реакції на стрес, Hsp70 має багато обов'язків під час нормального росту, наприклад, він допомагає у згортанні новосинтезованих білків, субклітинному транспорті білків і везикул, утворенні та дисоціації комплексів, а також і деградації небажаних білків. Таким чином, цей шаперон широко формує білковий гомеостаз, контролюючи контроль якості та обіг білків як у нормі, так і в умовах стресу [45].

Саме цей Hsp70 є шапероном, який взаємодіє з набором білків, включаючи SOD1, і забезпечує їх правильне складання, стабілізацію та транспорт у клітині. Підвищена експресія Hsp70 внаслідок аліментарної нестачі протеїну може збільшити кількість Hsp70, доступного для взаємодії з SOD1. Це у свою чергу може покращити стабілізацію SOD1 та сприяти його транспорту до цитозольної фракції клітини [46].

Механізми, що пояснюють вплив аліментарної нестачі протеїну на вироблення Hsp70 та розподіл SOD1, потребують додаткових досліджень для більш детального розуміння. Але наявні дані свідчать про те, що аліментарна нестача протеїну значно впливає на рівень та розподіл SOD1 в клітині, зокрема в цитозольній фракції печінки.

ВИСНОВКИ

1. У субклітинних фракціях печінки щурів спостерігаються різнонаправлені зміни вмісту металотіонеїнів: у цитозольній фракції печінки зареєстровано підвищення вмісту МТ за умов введення токсичних доз ацетамінофену незалежно від кількості протеїну в харчовому раціоні, в мітохондріях – зниження даного показника у всіх дослідних групах тварин із найнижчими значеннями на тлі ацетамінофен-індукованою ураження.

2. Токсичне ураження ацетамінофеном незалежно від кількості споживання харчового протеїну виступає ключовим чинником підвищення активності Cu,Zn-супероксиддисмутази у цитозольній фракції печінки щурів.