

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

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

**ОКИСЛЮВАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ІЗ ТОКСИЧНИМ
УРАЖЕННЯМ АЦЕТАМІНОФЕНОМ ПІСЛЯ ЧАСТКОВОЇ
ГЕПАТЕКТОМІЇ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 600-М групи

Бринзила Валерія Володимирівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,

асистент **Николайчук І.М.**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2024 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2024

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню окислювальних процесів у печінці щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії. У роботі проаналізовано вміст супероксиду, активність Mn- і Cu,Zn-супероксиддисмутази, рівень металотіонеїнів та вміст вільних SH-груп в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки щурів.

Встановлено, що в контрольних щурів після часткової резекції печінки активація Mn- і Cu,Zn-супероксиддисмутази та зростання вмісту металотіонеїнів в мітохондріальній та цитозольній фракціях та відбувається лише на ранніх етапах (24 та 48 год) регенераційного процесу, що очевидно спрямовано на нейтралізацію підвищеного рівня супероксиду.

Показано, що перебіг репаративної регенерації печінки в тварин із токсичним ураженням супроводжується інтенсифікацією генерації супероксиду впродовж всього експериментального періоду та тлі зниження активності Mn-СОД та вмісту металотіонеїнів, що вказує на посилення вільнорадикальних процесів у мітохондріях печінки.

Упродовж всього періоду регенерації в цитозольній фракції печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії відбувається активація Cu,Zn-СОД та підвищення вмісту металотіонеїнів, що, ймовірно, відображає компенсаторну реакцію антиоксидантних ресурсів гепатоцитів у відповідь на їх виснаження в мітохондріях.

Зниження вмісту вільних SH-груп в мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії відображає посилення окислювальних процесів у тканинах печінки, що призводить до пригнічення регенераційних процесів.

Ключові слова: супероксиданіон-радикал, Cu,Zn-супероксиддисмутаза, Mn-супероксиддисмутаза, металотіонеїни, SH-групи, ацетамінофен, часткова гепатектомія, регенерація

ABSTRACT

The master's thesis focuses on the investigation of oxidative processes in the liver of rats with acetaminophen-induced toxicity after partial hepatectomy.

It was found that in control rats, after partial liver resection, the activation of Mn- and Cu,Zn-superoxide dismutase and an increase in metallothionein content in mitochondrial and cytosolic fractions occur only at the early stages (24 and 48 hours) of the regeneration process. These changes are likely aimed at neutralizing elevated superoxide levels.

The study demonstrated that the course of reparative liver regeneration in animals with toxic damage is accompanied by intensified superoxide generation throughout the experimental period. This occurs alongside a decrease in Mn-SOD activity and metallothionein content, indicating enhanced free radical processes in liver mitochondria.

The decrease in the levels of free SH-groups in the mitochondrial and cytosolic fractions of the liver in rats with toxic damage after partial hepatectomy reflects intensified oxidative processes in liver tissues, leading to the suppression of regenerative processes.

Keywords: *superoxide anion radical, Cu,Zn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, metallothioneins, SH-groups, acetaminophen, partial hepatectomy, regeneration.*

Кваліфікаційна робота включає результати власних досліджень. Ідеї, результати та тексти наукових робіт інших авторів повинні супроводжуватися посиланнями на відповідні джерела.

_____ **В.В. Бринзила**

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Характеристики регенерації печінки.....	7
1.2. Особливості відновлення печінки після медикаментозного ураження.....	11
1.3. Супероксид-аніон: походження, властивості та біологічна роль.....	14
1.4. Види та властивості супероксиддисмутази.....	18
1.5. Структура та каталітичні функції супероксиддисмутази.....	20
1.6. Металотіонеїни: метаболізм та функції	21
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
2.1. Об'єкти та методи досліджень.....	25
2.2. Метод часткової гепатектомії.....	26
2.3. Виділення мітохондріальної фракції.....	27
2.4. Виділення цитозольної фракції	27
2.5. Визначення швидкості генерації супероксиду	28
2.6. Визначення супероксиддисмутазної активності.....	28
2.7. Визначення вмісту металотіонеїнів.....	29
2.8. Визначення вмісту вільних тіольних груп	300
2.9. Статистичні методи дослідження	311
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	32
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50
ДОДАТКИ	57

ВСТУП

Регенерація печінки – це високоорганізований процес відновлення тканин і є найважливішою реакцією печінки на ушкодження. Загалом процес регенерації печінки включає три фази: стадію підготовки, фазу проліферації та фазу завершення. Метою початкового етапу є підвищення чутливості гепатоцитів до факторів росту за допомогою деяких цитокінів, включаючи $\text{TNF-}\alpha$ та IL-6 . Фаза проліферації сприяє повторному входженню гепатоцитів у фазу G1 під впливом факторів росту. Під час завершальної фази гепатоцити припиняють проліферацію, щоб підтримати нормальну масу та функцію печінки [1].

Розуміння процесів регенерації печінки є важливим також у контексті впливу різних лікарських засобів на цей орган. Одним із прикладів такого впливу є ацетамінофен ($\text{N-acetyl-para-aminophenol}$; АРАР) – найпоширеніший жарознижувальний та знеболювальний препарат. Регенерація печінки збільшується пропорційно до ступеня пошкодження органа при передозуванні ацетамінофеном, що в більшості випадків призводить до регресії пошкодження та спонтанного відновлення. Однак у випадку важкого передозування АРАР регенерація печінки може порушуватися, що призводить до неконтрольованого прогресування ураження та навіть смерті [2].

Регенерація печінки супроводжується активацією прооксидантних процесів, зокрема, утворенням активних форм кисню (АФК), які виконують подвійну роль. З одного боку, АФК діють як сигнальні молекули, стимулюючи регенеративні процеси, зокрема проліферацію клітин та відновлення пошкоджених тканин. З іншого боку, надмірне накопичення АФК може призвести до оксидативного стресу, що викликає пошкодження клітинних мембран, білків та ДНК. Для нейтралізації АФК клітини активують антиоксидантні системи, які включають ферменти, такі як супероксиддисмутаза, а також білки, такі як металотіонеїни.

Супероксиддисмутаза є ключовим ферментом антиоксидантного захисту, що допомагає нейтралізувати супероксид-аніон ($\text{O}_2^{\bullet-}$), перетворюючи

його на менш шкідливий оксид водню. Існують різні ізоформи цього ферменту: супероксиддисмутаза-1, яка містить цинк і функціонує в цитозолі, та супероксиддисмутаза-2, що має манган у своєму складі та відіграє критичну роль в утилізації активних форм кисню в мітохондріях. Завдяки цим ензимам клітини захищені від оксидативного стресу, який може пошкоджувати білки, ліпіди та ДНК, зберігаючи їхню життєздатність навіть за умов надмірного утворення $O_2^{\cdot-}$ [3].

Металотіонеїни – це низькомолекулярні білки з молекулярною масою 6-7 кДа. Молекули МТ містять 20 залишків цистеїну, що приблизно становить 30% амінокислотного складу. Велика кількість цистеїну з сульфгідрильними групами визначає активність білка. Металотіонеїни допомагають підтримувати гомеостаз іонів металів, необхідних для нормального метаболізму (цинк, мідь), також регулюють функціонування та біосинтез цинкпротейнів, беруть участь у процесах детоксикації, захищають клітину від активних форм кисню (АФК). Численні фактори та зовнішні впливи сприяють збільшенню концентрації металотіонеїнів (МТ) у печінці. Встановлено, що різні стресові ситуації, такі як екстремальні температурні умови, інтенсивна фізична активність, обмежене харчування, бактеріальні інфекції, рентгенівське опромінення, а також введення певних гепатотоксичних речовин, сприяють підвищенню рівня МТ у печінці у щурів [4].

Одним із важливих компонентів захисту є тіоли, які завдяки сульфгідрильній групі (-SH) відіграють ключову роль у багатьох біологічних процесах, зокрема у антиоксидантному захисті та підтримці структурної цілісності білків. Ці сполуки мають здатність віддавати електрони, виконуючи функції відновників, що особливо важливо для захисту клітин від оксидативного стресу та мінімізації пошкоджень, спричинених активними формами кисню [5].

Мета роботи – дослідити окислювальні процеси в печінці щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристики регенерації печінки

Печінка, що складається з паренхіматозних клітин – гепатоцитів і непаренхіматозних клітин, включаючи ендотеліальні клітини, клітини Купфера, лімфоцити і зірчасті клітини, має унікальну здатність точно регулювати свій ріст і масу, що особливо примітно, оскільки гепатоцити є стабільними клітинами і рідко діляться в нормальному стані, оскільки вони перебувають у стані спокою у фазі G0 клітинного циклу [6]. Однак їхня проліферативна здатність ініціюється у разі втрати печінкової тканини. Існує дві різні регенеративні моделі. Часткова гепатектомія (видаляється дві третини печінки) ініціює унікальну відповідь, під час якої диплоїдні гепатоцити, що залишилися, вступають у клітинний цикл, щоб компенсувати втрату печінкової тканини, що займає близько тижня [7]. Інша модель регенеративної моделі встановлюється внаслідок ураження, наприклад, токсинами або вірусною інфекцією, під час якого пошкоджуються всі гепатоцити, а овальні клітини розглядаються як потужні стовбурові клітини, що диференціюються в гепатоцити і біліарні клітини (холангіоцити). Більш часто використовуються у дослідженнях перший метод часткової гепатектомії з видаленням двох третин печінки.

Регенерація печінки – це дуже організований процес, на який впливають різні фактори. Швидке відновлення об'єму і функції після великої резекції печінки (> 70%) або травми печінки, а також сурова регуляція на початковому і кінцевому етапах регенерації є винятковою характеристикою печінки. У базальних умовах гепатоцити перебувають у стані спокою (фаза G0 клітинного циклу), але зберігають здатність відновлювати клітинний цикл при пошкодженні, втраті тканини або дії екзогенних стимулів (факторів росту, мітогенів) [8].

Регенерацію печінки вивчали на різних експериментальних моделях: від клітинних культур до індукованого *in vivo* пошкодження печінки токсинами

(галактозамін, тіоацетамід), бактеріальними частинками, вірусами та хірургічними моделями, такими як часткова гепатектомія (ЧГ) або сегментарна трансплантація печінки. Процедура 70 % ЧГ у гризунів є найбільш використовуваною, оскільки є основним стимулом регенерації і викликає синхронну і гомогенну відповідь залишкової печінки. Ця модель дозволила порівняти регенерацію між контрольними тваринами і генетично модифікованими щодо сигнальних молекул, рецепторів і регуляторів клітинного циклу. Відновлення маси печінки після часткової гепатектомії або після гострої травми досягається шляхом компенсаторної гіперплазії [9].

Характеристики регенерації печінки можна підсумувати наступним чином:

1. Це явище присутнє у всіх хребетних тварин, у яких задіяні загальні механізми: активація тромбіну, участь вродженої імунної системи, розвиток плідності та анеуплоїдії, ремоделювання тканин і суворе регулювання об'єму печінки в кінці процесу, відома як «гепатостатична» регуляція [10].

2. Послідовність дублювання гепатоцитів, послідовність дублювання мезенхімальних клітин, морфогенез і об'єм, що досягається в кінці процесу, є генетично регульованими [11].

3. Це дуже швидкий процес, який починається за лічені секунди і закінчується через кілька днів, залежно від віку і виду, відновленням об'єму печінки, який включає сигнальні механізми – аутокринні, паракринні, ендокринні – клітинної проліферації, морфогенезу, зональності печінки і генів регуляції метаболізму [10].

В останні роки було описано різноманітні сигнальні та транскрипційні шляхи, багато з яких пов'язані з фізіологічною відповіддю печінки на пошкодження клітин. Регенерація печінки починається з розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних патернів та пошкодження-асоційованих молекулярних патернів, запуску природної імунної відповіді, активації фракцій комплементу C3a та C5a, секреції TNF- α , синтезу IL-6, IL-1 β , IL-18, які спонукають гепатоцити до проліферації. Перехід від стану спокою G0 до

фази G1 клітинного циклу (фаза праймінгу) відбувається протягом перших 4 годин після резекції печінки. Клітинна проліферація відбувається в хронологічному та послідовному порядку. Першими діляться гепатоцити, за якими слідує купферовські клітини, ендотеліальні клітини, новоутворення судин та жовчних каналців безпосередньо перед реплікацією печінкової структури [12].

На початку після 70 % часткової гепатектомії, 95 % гепатоцитів переходять з фази G0 у фазу G1 клітинного циклу, в кінці якого існує критична контрольна точка, позначена «R» (точка рестрикції), яка вирішує, чи є поділ клітин незворотнім. До цього моменту процес є зворотнім, що дозволяє гепатоцитам повернутися до попереднього стану (G0), якщо умови були несприятливими. Після цієї точки прогресія клітинного циклу завершується до завершення поділу гепатоцитів [13]. У перші 30 хв після гепатектомії збільшується вміст цитозольних преформованих факторів – трансдуктора сигналу та активатора транскрипції, ядерного фактора та активуючого протеїну-1, як наслідок сигнальних трансдукцій, індукованих зв'язуванням цитокінів з їхніми рецепторами. Цитозольні преформовані фактори запускають синтез білка, необхідних для запуску клітинного циклу (фаза праймінгу). Відомо про збільшення синтезу ДНК (фаза S) протягом 24 і 36 годин після гепатектомії у щурів і мишей відповідно. Гепатоцити вступають у мітоз через 48 годин після ЧГ, за ними слідує купферовські клітини. Клітини зірчастого та жовчного епітелію вступають у S-фазу через 48 годин після гепатектомії і проліферують повільно. Ендотеліальні клітини проліферують на третю добу, демонструючи пік на п'яту добу після ЧГ [14]. Крім того, частина популяції гепатоцитів повертається до стану спокою (G0) через 72 години після гепатектомії, тоді як інші відновлюють клітинний поділ до досягнення початкового розміру печінки [15]. Припускають, що друга проліферативна хвиля зумовлена факторами росту, що секретуються власними гепатоцитами, а також адитивним ефектом ко-мітогенів, таких як норадреналін, інсулін, соматостатин і глюкагон [7].

Міуаока та ін. описали, що гепатоцити подвоюють свій розмір і збільшують кількість гепатоцитів у 1,5 рази після ЧГ. Автори зазначають про збільшення розміру гепатоцитів на 1,6 і 0,7 поділу на клітину, що свідчить про те, що регенерація лежить в основі двох різних процесів: гіпертрофія та проліферація. Також вони спостерігали на моделі 30 % резекції печінки, що збільшення розміру печінкового залишку відбувалося за рахунок значного 1,5-кратного збільшення розміру гепатоцитів без клітинного поділу [16]. З морфологічної точки зору, незабаром після РНх спостерігали кілька кластерів гепатоцитів (10-14 мононуклеарних і бінуклеарних плідних клітин – тетраплоїдних ($4n$), октаплоїдних ($8n$), $16n...$). Реплікація зірчастих і синусоїдальних клітин, що збільшують розмір печінкових часточок, спостерігалася через 2-4 дні після гепатектомії [17].

Ding et al. описали секрецію ангіокринних факторів і судинне новоутворення. Відносна гіпоксія залишкової печінки, зумовлена гіперактивною буферною реакцією печінкових артерій, стимулює індукований гіпоксією фактор-1 α протягом перших 12-48 годин після гепатектомії, який активує судинно-ендотеліальний фактор росту, фактор росту фібробластів та індукцибельну синтазу оксиду азоту. Проліферація гепатоцитів відбувається від перипортальних до перицентральных ділянок печінкової часточки. Після відновлення початкового розміру відбувається апоптотичне ремоделювання та зонування [18].

Регенеративна здатність печінки майже необмежена. У щурів описано сім послідовних 50 % часткових гепатектомій без розвитку печінкової недостатності або запобігання регенеративної відповіді [7]. У моделі гомозиготної тирозинемії метаболічні порушення були зворотними після трансплантації синтетичних гепатоцитів. Коли трансплантовані гепатоцити були знову виділені і пересаджені, вони змогли повернути ферментативний дефіцит у другому поколінні гомозиготної тирозинемії, і так послідовно до 10 поколінь. Було підраховано, що гепатоцити миші можуть пройти до 69 поділів, що еквівалентно утворенню 50 печінок [19].

Ще однією інтригуючою загадкою регенерації є тісний взаємозв'язок між об'ємом печінки та поверхнею тіла, відомий як печінковий індекс (маса печінки/маса тіла $\times 100 \sim 2,5 \%$), який називають «гепатостатичною» регуляцією. У клінічній та експериментальній трансплантації печінки добре відома адаптація розміру донорської печінки до поверхні тіла реципієнта, маленькі трансплантати у великих реципієнтів і навпаки. Хоча більшість клітинних змін протягом регенерації пов'язані зі змінами клітинного ядра, під час клітинного поділу органели також повинні дублюватися. Регуляція між клітинним ростом і дуплікацією хромосом є недостатньо вивченою.

Кілька авторів вказують на те, що більш інтенсивне пошкодження печінки (екстремальні резекції печінки $> 70 \%$, трансплантація живих донорів з невеликими трансплантатами $< 30 \%$, субмасивний печінковий некроз) викликає сильнішу проліферативну відповідь печінки. В умовах трансплантації донорської печінки з використанням трансплантатів меншого розміру ($\leq 30 \%$ від стандартного об'єму печінки) було описано прискорення регенерації трансплантата. Ця закономірність схожа на класичну фізіологічну реакцію на стрес або реакцію на пошкодження тканин [20].

1.2. Особливості відновлення печінки після медикаментозного ураження

Печінка має надзвичайну здатність до регенерації після втрати печінкової тканини внаслідок токсин-індукованого ураження печінки, хірургічної резекції, інфекції або травми. В той час як експериментально часткова гепатектомія на дві третини (ЧГ) є найбільш широко вивченою моделлю регенерації печінки з поєднанням токсичного ураження.

Регенерація печінки як компенсаторна реакція на пошкодження печінки добре описана для кількох токсикантів, таких як тіоацетамід, чотирихлористий вуглець, хлороформ, ацетамінофен та аліловий спирт. Важливість регенерації печінки при токсичних ушкодженнях була особливо підкреслена в експериментах, у яких регенерацію печінки модифікували. Наприклад,

пригнічення регенерації печінки за допомогою антимітотичних агентів, таких як колхіцин, у моделі гострого ушкодження печінки, викликаного токсичними речовинами, призвело до загострення ушкодження та до подальшої смерті. Аналогічно, стимуляція регенерації печінки в цих випадках пригнічувала прогресування ушкодження, що призводило до покращення виживаності [21].

Як і у випадку інших гепатотоксичних агентів, ушкодження печінки, викликане ацетамінофеном, супроводжується компенсаторною регенерацією печінки, під час якої гепатоцити, які знаходяться найближче до некротичних зон, діляться і замінюють мертві клітини. Кілька доказів вказують на важливу роль регенерації печінки у визначенні результату після ушкодження печінки, викликаного ацетамінофеном. Наприклад, лікування інтерлейкіном-6, стовбуровим клітинним фактором, судинним ендотеліальним фактором росту та глутатіоном посилювало регенерацію, що призводило до зменшення ушкоджень або підвищення виживаності мишей після токсичного ураження ацетамінофеном. Крім того, миші зі стрептозотоцин-індукованим діабетом були стійкими до індукованих ушкоджень через вищу здатність до регенерації, а пригнічення регенерації антимітотичним агентом (колхіцином) у цих мишей призводило до підвищення смертності [22].

Накопичені клінічні дані підтримують зв'язок між регенерацією печінки після передозування АРАР та підвищеною виживаністю. Наприклад, вища активація β -катеніну корелювала з більш високою спонтанною регенерацією печінки, запобігало необхідності трансплантації печінки, а підвищений рівень α -фетопротейну в сироватці крові, маркера проліферації гепатоцитів, корелював з виживаністю у пацієнтів з ацетамінофен-індукованою гострою печінковою недостатністю (ГПН). Загалом ці дані вказують на те, що стимуляція регенерації печінки у пацієнтів з ацетамінофен-індукованою ГПН може потенційно покращити виживаність і одужання [23].

Незважаючи на значні докази того, що регенерація печінки відіграє вирішальну роль у вирішенні ГПН, викликаній ацетамінофеном, молекулярні механізми регенерації печінки після токсичності ацетамінофеном лише

починають розуміти. Важливо зазначити, що ці механізми можуть відрізнятися від найширше вивчених моделей часткової гепатектомії через основні відмінності між ушкодженням, викликаним ацетамінофеном, та ЧГ. Дослідження з використанням поступового дозування ацетамінофеном у мишей показало, що регенерація печінки після ацетамінофену залежала від дози, подібно до інших хімічних гепатотоксичних речовин [24].

Помірне передозування ацетамінофеном у мишей (300 мг/кг) спричинила значне ушкодження печінки, але також викликало суттєву компенсаторну регенерацію, що призвело до зменшення ушкодження та спонтанного одужання. Однак після важкого передозування ацетамінофеном (600 мг/кг) регенерація печінки була значно пригнічена, що призвело до стійкого ушкодження та зниження виживання. Варто зазначити, що значне пригнічення регенерації при вищій дозі не було спричинене відсутністю критичної маси печінки, оскільки понад 50% гепатоцитів залишалися життєздатними при цій дозі, навіть на піку ушкодження. Насправді, пік ушкодження не був суттєво різним між двома дозами, тоді як регенерація була значно порушена лише при вищій дозі [25].

Подальший комплексний аналіз сигнальних шляхів показав, що кілька про- і анти-регенеративних шляхів по-різному впливали залежно від дози. Підхід з використанням двох доз, одна з яких стимулювала регенерацію, а інша – пригнічувала її, призвело до виявлення проліферативних сигнальних шляхів, які сприяють регенерації печінки, і, що важливіше, також виявив потенційні механізми, які активно пригнічують регенерацію печінки після передозування ацетамінофеном. Висока доза імітувала пацієнтів, які не можуть спонтанно одужати після передозування ацетамінофеном, у яких або затримана, або повністю пригнічена регенерація печінки, і які потребують трансплантації печінки. Було виявлено кілька сигнальних шляхів, які опосередковують регенерацію печінки після передозування ацетамінофеном [24].

1.3. Супероксид-аніон: походження, властивості та біологічна роль

Активні форми кисню (АФК) — це високоактивні похідні кисню, які включають вільні радикали, такі як супероксидний аніон ($O_2 \bullet^-$) та гідроксильний радикал ($HO\bullet$), а також нерадикальні молекули, такі як перекис водню ($H_2 O_2$), пероксинітрит ($ONOO^-$) та гіпохлоритна кислота ($HOCl$). АФК взаємодіють між собою, утворюючи нові радикали з різною реактивністю та властивостями в живих системах. Серед АФК супероксидний аніон ($O_2 \bullet^-$) є основним кисневим радикалом, що утворюється через одноелектронне відновлення кисню. Супероксиддисмутаза перетворює $O_2 \bullet^-$ на перекис водню ($H_2 O_2$), що є попередником для інших АФК. Через реакцію Хабера-Вайса $O_2 \bullet^-$ утворює $HO\bullet$, що є одним з найреактивніших АФК у клітині. Подібним чином, $H_2 O_2$ утворює $HO\bullet$ через реакції Фентона за участю заліза. Взаємодія між $O_2 \bullet^-$ та оксидом азоту призводить до утворення $ONOO^-$, що підвищує рівень реактивних азотних видів [26].

Активні форми кисню є важливими молекулами в біологічних процесах, оскільки вони можуть мати як корисні, так і шкідливі ефекти в клітинах. З одного боку, АФК необхідні для виконання багатьох фізіологічних функцій, таких як виживання клітин, ріст, проліферація та диференціація. Вони також відіграють критичну роль у імунній відповіді, допомагаючи організму захищатися від патогенів. З іншого боку, при надмірному утворенні або дисбалансі, АФК можуть спричиняти оксидативний стрес, що веде до пошкодження білків, ліпідів та ДНК, що може ініціювати процеси апоптозу або некрозу.

Таким чином, активні форми кисню мають подвійний характер: вони є необхідними для нормального функціонування організму, але при їх надмірному накопиченні або неправильному регулюванні можуть призводити до патологічних змін, що негативно впливають на здоров'я клітин і тканин. Однак однією з основних перешкод для розуміння ролі цих сполук є відсутність адекватних методів для виявлення АФК *in vivo*, головним чином

через їх надзвичайно короткий час існування та наявність кількох антиоксидантів у клітинах. Насправді, радикали постійно генеруються більшістю організмів в результаті використання O_2 як кінцевого акцептора електронів у мітохондріальних транспортних ланцюгах і в цитохромі P450 [27].

Особливу увагу слід приділити супероксид-аніону, який є важливою складовою системи АФК. Супероксид-аніон утворюється шляхом приєднання одного електрона до молекулярного кисню, що зазвичай відбувається в мітохондріях під час дихального ланцюга. Цей процес забезпечує клітину енергією, але також створює певну кількість супероксид-аніонів як побічний продукт. Через свою нестабільність супероксид-аніон може швидко взаємодіяти з іншими молекулами, перетворюючись на більш реакційно активні форми, такі як перекис водню та гідроксильний радикал.

Супероксид-аніон – це первинний кисневий радикал, який утворюється, коли молекула кисню отримує електрон. Початкове утворення $O_2^{\bullet-}$ запускає каскад АФК, деякі з яких, наприклад H_2O_2 , діють як ключові молекули у клітинній сигналізації, тоді як інші, такі як $HO^{\bullet}$, є шкідливими. Зрештою, біологічний вплив цих молекул визначається кількістю АФК, захисними механізмами клітини та її здатністю до адаптації. Через свій заряд супероксид має низьку мембрану проникність, він проходить через аніонні канали, але цей процес є неефективним, і супероксид в значній мірі реагує у фізіологічному компартменті, де він утворюється [28].

Супероксидний аніон-радикал $O_2^{\bullet-}$ – це відновлена форма молекулярного кисню O_2 , що складається з двох атомів кисню з 17 електронами та негативним електричним зарядом. $O_2^{\bullet-}$ утворюється у всіх аеробних організмах і може діяти як сигнальна молекула, токсична сполука або нешкідливий проміжний продукт, який спонтанно розкладається. Його рівні *in vivo* обмежуються двома типами ферментів: супероксидредуктазою і супероксиддисмутазою. Незважаючи на те, що кисень є «вільним бірадикалом», він має низьку реактивність, оскільки неспарені електрони

кожного атома кисню мають паралельні спіни. Супероксид вважається і радикалом, і аніоном із зарядом -1 . Це відносно нестабільна молекула з періодом напіврозпаду в мілісекунди, досить сильний окисник, який може відновлюватися до перекису водню, а також може діяти як відновник, перетворюючись на кисень. Оксид супероксид-аніону ($O_2 \cdot^-$) демонструє два стандартних редокс-потенціали, які показують його здатність діяти як відновлювач або окиснювач. Перший потенціал, $E'(O_2 / O_2 \cdot^-) = 0.33 \text{ V}$, вказує на те, що супероксид може виступати відновлювачем, а другий потенціал, $E'(O_2 \cdot^- / H_2 O_2) = 0.93 \text{ V}$, свідчить про його здатність діяти як окиснювач, перетворюючи супероксид на перекис водню ($H_2 O_2$) [29].

Супероксид-аніон ($O_2 \cdot^-$) є відносно малим аніоном, добре розчинним у воді, де він гідратується чотирма молекулами води, міцно зв'язаними водневими зв'язками. Ця гідратація дозволяє йому активно взаємодіяти з протонами або донорами протонів, що призводить до утворення гідропероксидного радикала ($HO_2 \cdot$), який є важливим проміжним продуктом у ланцюгу реакцій активних форм кисню, що мають значний біологічний вплив.

У багатьох хімічних реакціях органічні та неорганічні сполуки можуть виступати джерелами протонів. Супероксидний радикал є кон'югованою основою слабкої кислоти – гідропероксидного радикала ($HO_2 \cdot$), pK_a якого становить 4,88. Розподіл між $HO_2 \cdot$ та $O_2 \cdot^-$ регулюється рівнем pH , де на низькому pH , характерному для мембрани, переважатиме кислотна форма – гідропероксидний радикал. Завдяки своїй неіонній природі $HO_2 \cdot$ може проникати через клітинну мембрану, викликаючи процеси пероксидації ліпідів. Хоча гідропероксидний радикал є набагато реактивнішим і сильнішим окиснювачем, ніж супероксидний радикал, на фізіологічному рівні pH в водних розчинах переважає непротонована форма супероксиду, і лише менше 1% його існує у вигляді гідропероксидного радикала. Окрім того, супероксид поглинає ультрафіолетове світло при 245 нм, в той час як гідропероксид

поглинає при 225 нм, що свідчить про їх різну оптичну активність у цьому діапазоні [30].

Супероксидний аніон ($O_2 \bullet^-$) є токсичним, насамперед через його здатність пошкоджувати білки, що містять залізо-сіркові центри, такі як аконітаза, сукцинатдегідрогеназа та NADH-убіхіноноксидоредуктаза. Крім того, супероксид може спричиняти утворення інших більш токсичних сполук, таких як гідроксильний радикал ($HO\bullet$) і пероксинітрит ($ONOO^-$). Залізо, яке вивільняється з ферментів, що містять залізо-сіркові центри, може ініціювати утворення гідроксильних радикалів через реакції Фентона, що призводить до додаткової токсичності. Супероксиддисмутаза (SOD) відіграє важливу роль у нейтралізації $O_2 \bullet^-$, перетворюючи його в менш токсичну перекис водню (H_2O_2), що може бути подальше детоксифіковано іншими антиоксидантними системами. Хоча супероксид сам по собі повільно реагує з молекулярними мішенями, його висока реактивність щодо інших радикалів дозволяє утворювати ще більш небезпечні продукти, такі як гідроксильні радикали [31].

Супероксид утворюється, коли молекула кисню набуває електрон через ферментативні або неферментативні реакції. У нормальних умовах клітини людини генерують приблизно 2 трильйони молекул супероксидного радикала ($O_2 \bullet^-$) і перекису водню (H_2O_2) на добу на кожну клітину, і основним джерелом їх утворення є мітохондрії. Ці органели використовують 80-90% кисню клітини для синтезу АТФ, відновлюючи воду в процесі. Незважаючи на високу ефективність мітохондріального дихання, близько 2% спожитого кисню частково відновлюється до $O_2 \bullet^-$ і H_2O_2 . Основним джерелом супероксиду є метаболічні процеси, що використовують молекули кисню. Біологічно супероксид утворюється під час роботи мітохондріального електронно-транспортного ланцюга, який є головним джерелом $O_2 \bullet^-$, а також через ферменти, такі як NADPH оксидаза, ксантиноксидаза, ліпооксигеназа, циклооксигеназа та цитохром P450. Окрім того, електронно-транспортні ланцюги, які знаходяться в ендоплазматичній сітці,

пероксисомах, ядерній мембрані та цитоплазматичній мембрані також перетворюють O_2 на супероксид. Також супероксид може утворюватися неферментативними шляхами [32].

Мітохондрії є основним джерелом активних форм кисню під час нормальних окисно-відновлювальних процесів метаболізму, переважно через реакції окиснення-відновлення в електронно-транспортному ланцюзі, де кисень виступає як кінцевий акцептор електронів. Комплекс I є першим мультиферментним комплексом цього ланцюга, відіграючи важливу роль у виробництві енергії клітин, а також є основним місцем утворення супероксидного радикала ($O_2 \cdot^-$). Переміщення електронів через ферментні комплекси у внутрішній мембрані генерує електрохімічний протонний градієнт, який забезпечує синтез АТФ. Однак, поряд з енергією, під час цих процесів утворюються активні форми кисню. Мітохондрії є основним біологічним джерелом супероксиду в аеробних клітинах, де цей радикал утворюється через взаємодію убісеміхінону та флавінсеміхінону NADH-дегідрогенази. Супероксид, не маючи змоги проникати через внутрішню мітохондріальну мембрану, залишається в матриксі, де він швидко взаємодіє з марганцевою супероксиддисмутазою (Mn-SOD) та оксидом азоту, утворюючи перекис водню та пероксинітрит [30]

1.4. Види та властивості супероксиддисмутази

Ферменти сімейства супероксиддисмутази (СОД) – це серія металопротейнів, які вилучають супероксид-аніон радикали. Вони мають антиоксидантний ефект, перетворюючи супероксид на O_2 та H_2O_2 шляхом реакції дисмутації. Крім того, ці ферменти захищають клітини від ушкоджень, спричинених окисативним стресом. СОД у еукаріотів залежно від зв'язаних металевих кофакторів і клітинної локалізації поділяються на три типи: мідь-цинкова супероксиддисмутаза (Cu/Zn-СОД або СОД1), яка присутня у цитоплазмі або виділяється в позаклітинну рідину; марганцева

супероксиддисмутаза (Mn-SOD або SOD2), яка знаходиться в матриксі мітохондрій та позаклітинна супероксиддисмутаза (EC-SOD або SOD3) [33].

Cu/Zn-SOD (мідь-цинкова супероксиддисмутаза) давно вважається основним мідьвмісним білком у еукаріотів, але її ферментативна функція не була виявлена до тих пір, поки МакКорда та Фрідович у 1969 році не виявили, що «купроцинкова аміноксидаза» може дисмутувати супероксид [34]. SOD1 є основним внутрішньоклітинним ферментом SOD, широко поширеним у цитоплазмі, ядрі та клітинній мембрані. Він існує як гомодимер з молекулярною масою 32 кДа, який здебільшого локалізується в цитоплазмі, а меншою мірою – в міжмембранному просторі мітохондрій.

Ферментативна активність SOD1 залежить від наявності міді та цинку, однак цинк стосується лише молекулярної структури ферменту і не має каталізаторної активності. Він бере участь у правильному згортанні білка та забезпеченні його стабільності. Активність супероксиддисмутази у реметалізованих похідних пропорційна кількості зв'язаної міді на природному мідному сайті. Крім того, мідь не може бути замінена іншим металом, тоді як цинк може бути замінений кобальтом або міддю. Активність SOD1 потребує каталізаторної міді для видалення $O_2 \cdot^-$ [35].

SOD2 — це фермент, що містить мітохондріальний марганець і локалізований у мітохондріальному матриксі, який складається з 96 кДа гомотетрамера. Марганець пов'язаний з каталізаторною активністю ферментів. SOD2 синтезується в цитоплазмі і транспортується в мітохондрії за допомогою сигнальних пептидів, які беруть участь у дисмутації кисню, що утворюється дихальними ферментативними ланцюгами. Він знаходиться в усіх мітохондріях і клітинних рідинах, окрім еритроцитів, і його молекулярна маса змінюється залежно від розподілу та джерела [33].

SOD3, що має Cu^{2+}/Zn^{2+} як допоміжну групу, належить до Cu/Zn-SOD, яка розподіляється в крові, лімфі, синовіальній рідині та тканинах. Секретована позаклітинна мідь/цинк-вмісна супероксиддисмутаза (ecSOD, або SOD3) є 135-кДа гомотетрамером, що складається з двох димерів,

з'єднаних між собою дисульфідними зв'язками у більшості видів. Вона усуває активні форми кисню, що утворюються в процесі метаболізму, та захищає клітини від ушкодження супероксид-іонами у клітинному, так і в позаклітинному середовищі [36].

1.5. Структура та каталітичні функції супероксиддисмутази

Загальна структура показує, що СОД1 і СОД2 складаються з гомотетрамерів з молекулярною масою 32 кДа і 96 кДа відповідно, тоді як SOD3 складається з діаметрально зв'язаних дисульфідів. Білок СОД1 містить дві функціональні ділянки: ділянка зв'язування амінокислот включає амінокислоти 1–10, а ділянка зв'язування Cu/Zn включає амінокислоти 11–154. Мідь розташована в активному центрі СОД1. Активність супероксиддисмутази еритрокортину (та основних мідьвмісних білків майже у всіх тканинах) інгібує відновлення цитохрому c за допомогою екзогенно доданого супероксиду або *in situ* продукції супероксиду. Ця реакція є основою для визначення ферментів, що все ще широко використовується сьогодні. Подібно до білка СОД1, білок СОД2 також має дві функціональні ділянки. Окрім Mn/Fe каталізаторної ділянки (1~198 амінокислот), є мітохондріальна транспортна ділянка пептиду до 24 амінокислот у амінокислотних і Mn/Fe каталізаторних ділянках. СОД2 синтезується у вигляді прекурсору з сигнальним пептидом, що націлюється на мітохондрії у клітинах, і входить у мітохондріальний матрикс через свою 2 кДа лідер-послідовність. Потім пептид розщеплюється з утворенням зрілих та ензимно активних білків, які відіграють ключову роль у мітохондріях [37].

Незрілий СОД3 містить чотири функціональні домени: сигнальний пептид амінотермінальної екскреції, домен глікозилювання (1–95 амінокислот), каталізаторний домен з активними та Cu^{2+} / Zn^{2+} зв'язуючими сайтами (96–194 амінокислот), і домен, що зв'язується з гепарином (195~222 амінокислот). СОД3 є секретованим білком, що містить гіпотетичний сигнальний пептид з 18 амінокислот на N-кінці, який направляє фермент специфічно в позаклітинний простір. Білок СОД3 також складається з трьох

функціональних доменів. Амінотермінальний залишок (1–95 амінокислот) містить сайт N-глікозилювання на Asp-89, що сприяє відділенню СОД3 від цитоплазматичного СОД1 і значно покращує розчинність білка. Амінотермінальний залишок (96–194 амінокислот) містить активний центр і має близько 50% гомології з СОД1, а амінотермінальний залишок (195–222 амінокислот) містить С-термінальну ділянку, що відповідає домену, що зв'язується з гепарином, який має позитивно заряджений кластер залишків, що є необхідним для зв'язування з гепаран-сульфат-протеогліканами [35].

Хоча гепарин СОД 3 не бере участь у ферментативній активності СОД3, його гепаринова ділянка необхідна для зв'язування з колагеном типу I та білком, асоційованим з рецепторами ліпопротеїнів низької щільності, який поглинається і інтерналізується в клітини через шляхи ендоцитозу, опосередковані адгезійними білками та білками, асоційованими з рецепторами ліпопротеїнів низької густини [38].

1.6. Металотіонеїни: метаболізм та функції

Металотіонеїни (МТ) – це сімейство невеликих, багатих на цистеїн білків, які виконують ряд функцій, включаючи детоксикацію токсичних металів, захист від окислювального стресу, а також металохаперони, що беруть участь у гомеостазі цинку та міді. Найбільш вивчений компонент родини є металотіонеїни ссавців, який складається з двох доменів: β -домену з 9 залишками цистеїну, що зв'язує 3 іони Cd^{2+} або Zn^{2+} чи 6 іонів Cu^{+} , і α -домену з 11 залишками цистеїну, що зв'язує 4 іони Cd^{2+} або Zn^{2+} чи 6 іонів Cu^{+} [39].

МТ складаються з одного ланцюга, і їхній амінокислотний склад досить консервативний. Незалежно від джерела отримання, білки, вилучені з органів різних видів тварин, відрізняються між собою лише незначно за амінокислотним складом. Характерною особливістю ланцюга металотіонеїнів є послідовність Cys-X-Y-Cys, або Cys-X-Cys, Cys-X-Cys де X і Y позначають амінокислоту, відмінну від цистеїну. Дослідження металотіонеїнів показують,

що розподіл цистеїну має дуже консервативний характер як за його розташуванням, так і за послідовністю. Кількість цистеїну стабільно становить 20 залишків (30% від загального амінокислотного складу). До складу молекули також входять інші амінокислоти: 6-8 залишків лізину, 7-10 залишків серину, а N-кінцевою амінокислотою є ацетильований метіонін. Ароматичні амінокислоти та гістидин у складі металотіонеїнів відсутні. Цистеїн виступає постійним структурним елементом металотіонеїнів у всіх видів тварин [40].

Електрофільний характер сірки в сульфгідрильних групах амінокислоти зумовлює високу спорідненість до іонів металів. Металотіонеїни мають найвищу спорідненість до металів перехідних груп, таких як цинк, кадмій, ртуть, мідь і срібло. Зв'язаний метал утворює тетраедричні структури, де чотири залишки цистеїну беруть участь у координаційному зв'язуванні металу. Спорідненість до металів наступна: $\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Co} = \text{Ni}$. Одна молекула металотіонеїну може зв'язати 7 атомів двовалентних металів (цинк або кадмій) або більше (до 12 атомів) одновалентних металів, таких як срібло [41].

Металотіонеїни відіграють важливу роль у метаболізмі металів, необхідних для росту, розвитку і функціонування організму. МТ слугують резервуаром іонів цинку та міді, забезпечуючи ними макромолекули, які потребують цих мікроелементів. Крім того, МТ здатні відновлювати функції металовмісних ферментів, які були інактивовані важкими металами. Наприклад, білки, які втратили активність через вплив кадмію, відновлювали свою функцію після інкубації з цинковим металотіонеїном (ZnMT), а далі металотіонеїн бере участь у цинк-кадмієвому обміні. Таким чином, металотіонеїни не лише зв'язують надлишкову кількість металів усередині клітини, але й відновлюють функціональність білків, інактивованих іншими металами [42].

Металотіонеїни присутні у високих концентраціях у клітинах, що активно діляться і трансформуються. Під час ембріонального розвитку

концентрація металотіонеїнів висока і знижується в міру зменшення розмірів тимуса. У дорослих людей рівень МТ зростає під час регенерації, наприклад, після резекції печінки. Ці дані вказують на участь МТ у процесах проліферації та диференціації клітин. Нещодавно відкриті молекулярні форми МТ-3 і МТ-4, які не індукуються традиційними факторами, що активують металотіонеїни типу 1 і 2, можуть бути важливими для дозрівання клітин [43].

Ще однією важливою функцією МТ є їхня участь в антиоксидантній системі організму. Велика кількість тіольних груп у молекулах МТ, що мають нуклеофільні властивості, дозволяє їм зв'язувати не тільки катіони металів, але й активні форми кисню та органічні радикали (вільні електронні пари біля атома сірки легко взаємодіють з елементами, які мають електронну дірку). Індукція синтезу МТ корелює зі збільшенням вмісту алкілюючих агентів або вільних радикалів у середовищі. Таким чином, металотіонеїни захищають клітину від летальних сполук. Їх розподіл у клітині дозволяє захищати всі клітинні структури від згаданих вище загроз [44].

Численні дослідження вказують на вплив МТ на апоптоз. Дослідження на клітинних культурах показали, що підвищена експресія МТ блокує процес апоптозу, тоді як у клітинах, позбавлених генів металотіонеїну, апоптоз посилюється. Це пов'язано зі зміною концентрації внутрішньоклітинного цинку. Інші дослідження, використовуючи антисмислові олігонуклеотиди, показали, що зниження рівня МТ у клітинах не тільки зупиняє ріст клітин, але й ініціює апоптоз. Було також виявлено, що металотіонеїни блокують апоптоз, асоціюючись у ядрі з субодиницею p50 транскрипційного фактора NF-карра В, стабілізуючи його зв'язок з ядерною ДНК [45].

NF-карра В є білковим комплексом, що складається з субодиниць p50 і p65 і розташований у цитоплазмі у формі неактивного комплексу разом з інгібітором I-карра В. У цьому комплексі є дві уразливі цистеїнові залишки в субодиниці p50, які чутливі до окислення. Окислення цих залишків активними формами кисню (АФК) активує протеїнкіназу, яка фосфорилує молекули інгібітора, що призводить до його дисоціації та подальшої деградації через

убіквітинування. Вивільнений від інгібітора NF-каппа В переміщується в ядро, де він відновлюється тіoredоксином і зв'язується з ДНК за допомогою механізму, залежного від цинку та металотіонеїну. NF-каппа В індукує транскрипцію багатьох генів, що призводить до інгібування апоптозу [44].

Хоча металотіонеїни не мають специфічної послідовності для транспортування в ядро (NLS або сигнал ядерної локалізації), їх транспортування часто описується як ко-транслокація. Білки, що беруть участь у цьому процесі, поки що не ідентифіковані. Цікаво, що синтез NF-каппа В і металотіонеїнів стимулюється однаковими факторами, такими як TNF (фактор некрозу пухлин), інтерлейкін-1, гіпоксія і активні форми кисню [45].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи досліджень

Для досліджень використовували білих безпородних щурів віком 140-150 днів та масою 150-180 г, яких утримували у віварії кафедри біохімії та біотехнології ННІБХБ. При здійсненні усіх необхідних процедур над щурами було чітко дотримання вимог європейської конвенції, яка була прийнята у Страсбурзі в 1986 році, щодо захисту хребетних тварин, які використовуються у наукових дослідженнях та експериментах, регулює етичні принципи та встановлює вимоги до їхньої охорони. Цей документ спрямований на захист тварин, залучених до дослідів, зокрема через обмеження щодо умов їх утримання, необхідності зменшення страждань, а також зобов'язання зменшувати використання тварин шляхом впровадження альтернативних методів. Також це передбачено у «Загальних етичних принципах проведення експериментів на тваринах», ухвалених під час VI Національного конгресу з біоетики в Києві у 2016 році.

Протягом усього експерименту контролювали споживання щурами раціону, що дозволяло коригувати їхнє харчування за принципом «парного харчування».

Токсичне ураження індукували шляхом перорального введення суспензії парацетамолу з дозуванням 1250 мг на кілограм маси тіла тварин, розчиненого в 2%-му розчині крохмального гелю.

Дослідні щури були поділені на такі групи:

- перша група (контрольна) – інтактні щури, яким проведено часткову гепатектомію (К/ЧГЕ).
- друга група – щури з частковою гепатектомією та токсичним ураженням, спричиненим ацетамінофеном (ТУ/ЧГЕ).

Тварин піддавали умертвінню шляхом цервікальної дислокації під впливом легкого інгаляційного наркозу після 24, 48, 72 та 168 годин. Усі дослідження проводили з дотриманням встановлених біоетичних норм.

2.2. Метод часткової гепатектомії

Часткова гепатектомія (ЧГ) — це стандартна хірургічна процедура для видалення 2/3 маси печінки, що використовується для вивчення процесів регенерації печінки в лабораторних умовах. Цей метод заснований на описі С. Mitchell і Н. Willenbring (2008) і проводили виключно в стерильних умовах з метою мінімізації ризиків інфекцій. У цій процедурі використовували лише стерильні хірургічні інструменти.

Перед початком хірургічного втручання тварина повинна бути повністю знеболена. Перевірка адекватності анестезії проводиться за допомогою ущипування за палець на лапі тварини. Лише за відсутності педального рефлексу можна розпочинати подальші дії.

Для доступу до печінки позначали місце розрізу під грудиною. Розріз проводили вздовж лінії під мечоподібним відростком, перпендикулярно до грудної клітки. Довжина розрізу становить 2-3 см. Після цього акуратно відокремлюють шкіру від підшкірного шару м'язів за допомогою зволжених стерильних ватних паличок.

Після доступу до печінки видаляють середню і ліву бічну частки, що разом становлять близько 2/3 загальної маси печінки. Процедура включає наступні етапи:

1. Витягнення лівої частки печінки з черевної порожнини за допомогою змочених фізіологічним розчином ватних дисків.
2. Накладення стерильної петлі з нейлонової нитки розміром 4-0 (діаметр 0,15 мм) навколо основи виділеної частки.
3. Перев'язка петлі та формування вузлів для перетискання кровоносних судин, що зменшує кровотечу.
4. Відрізання перев'язаної частки мікрохірургічними ножицями.

Аналогічно проводили видалення серединної частки печінки з дотриманням тих самих заходів безпеки.

Після видалення часток печінки очеревину зашивали безперервним швом за допомогою розсмоктуючої хромової нитки розміру 4-0. Потім шкіру закривали переривчастим швом, що забезпечує надійне з'єднання тканин та сприяє загоєнню.

Печінка лабораторних щурів, як і у мишей, складається з чотирьох часток: середньої, правої бічної, лівої бічної і хвостатої. Співвідношення їх мас складає приблизно 40%, 20%, 30% та 7% відповідно до загальної маси печінки [46].

2.3. Виділення мітохондріальної фракції

Для проведення досліджень брали зразки печінкової тканини, які спершу промивали в охолоджену 0,9% розчині хлориду натрію для видалення крові. Потім виконували гомогенізацію в розчині на основі сахарози, після чого фільтрували через чотиришарову марлю. Було приготовано розчин для гомогенізації, який складався з 1 мМ EDTA, 250 мМ сахарози, 10 мМ буфер трис-HCl доведеного до рН 7,4.

Центрифугуванням при 1000 g протягом 10 хвилин виділяли ядра та залишки клітин. Для отримання мітохондріальної фракції повторно проводили центрифугування на 12000 g протягом 15 хвилин. З метою підвищення чистоти фракції мітохондрії промивали в сахарозному розчині та знову піддавали центрифугуванню за тих самих умов. Згодом мітохондрії суспендували в 3 мл розчину сахарози.

2.4. Виділення цитозольної фракції

Зразки печінкових тканин піддавали дезінтеграції в 0,25 М розчині сахарози. Отриману суміш пропускали через чотиришарову марлю для фільтрації. Ядерну та мітохондріальну фракції осаджували одночасно шляхом центрифугування при 12 000 g протягом 15 хвилин.

До супернатанту додавали кальцій і магній (до кожних 9 частин супернатанту додавали 1 частину 80 мМ розчину CaCl_2 та 1 частину 160 мМ

розчину MgCl_2 , які були приготовані буферному розчині трис- HCl (10 мМ із значенням рН 7,4). Потім отримані дослідні зразки перемішували за допомогою магнітної мішалки протягом 10 хвилин при температурі 4°C , а далі проводили центрифугування при 10 000 g впродовж 10 хвилин.

Утворений осад, що виник після додавання двовалентних іонів Ca^{2+} і Mg^{2+} , представляв собою мікросомну фракцію у вигляді агрегатної суспензії, оскільки ці іони знижували негативний заряд мікросом. Після видалення мікросомної фракції надосадову рідину збирали та використовували як цитозольну (постмікросомну) фракцію для подальших досліджень [47].

2.5. Визначення швидкості генерації супероксиду

Для визначення генерації кисню (O_2) цитохромом P450 спочатку готуємо цитозольну та мітохондріальну фракції клітин. Після виділення фракцій їх суспендуємо у фосфатному буфері (рН 7,4) у співвідношенні 0,05 мл. Додаємо до кожної проби 0,05 мл суспензії відповідної фракції і 0,05 мл 3% розчину НАДН. Після перемішування проби інкубуються при температурі 37°C протягом 10 хвилин. Потім додаємо 0,05 мл 0,2% розчину нітросинього тетразолію (НСТ) та відповідний об'єм трис-буферу (рН 7,4), знову перемішуємо. Проби повторно інкубуються протягом 5 хвилин при 37°C . Після інкубації до проб додаємо по 2 мл розчинювача (хлороформ–диметилсульфоксид 1:2) і взбовтуємо протягом хвилини. Суміші центрифугуються при 1500 об/хв протягом 5 хвилин. Після центрифугування обережно відбираємо супернатант для подальшого аналізу. Оптичну густину супернатанту вимірюємо на фотоколориметрі при довжині хвилі 540 нм, порівнюючи з контролем [48].

2.6. Визначення супероксиддисмутази активності

Визначення активності супероксиддисмутази (СОД1 та СОД2) у цитозольній та мітохондріальних фракціях печінки застосовували методику [35], яка ґрунтується на здатності СОД пригнічувати аутоокислення

адреналіну. Суть методу полягає в наступному: до 2,5 мл карбонатного буфера з концентрацією 0,2 М з значенням рН 10,65 додавали 0,1 мл досліджуваного зразка та 0,1 мл адреналіну (0,1%), після чого зразок швидко змішували. Зміну поглинання досліджували відносно контрольного буфера (0,2 М карбонатний буфер, рН=10,65), реєструючи оптичну щільність через кожні 60 секунд протягом 3 хвилин після додавання адреналіну. Вимірювання проводили при довжині хвилі $\lambda=347$ нм [31]. Активність ферменту СОД обчислювали в умовних одиницях на міліграм білка за допомогою спеціальної формули:

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

$\Gamma\%$ – це відсоток гальмування, виражений у вигляді десяткового дробу;

N – розчинення;

a – концентрація білка в вихідному біологічному матеріалі [49].

2.7. Визначення вмісту металотіонеїнів

Вміст металотіонеїнів у мітохондріальних і цитозольних фракціях визначали за методикою, описаною А. Viarengo та інші. Цей підхід базується на кількісній оцінці тіолових груп за допомогою 5,5'-дитіобіснітробензойної кислоти (ДТНБ) після проведення екстракції в системі етанол/хлороформ. Після відцентрового розділення до 0,3 мл конкретної фракції (цитозольної або мітохондріальної) додавали 3 мл буферу, що містив 20 мМ трис і сахарозу, рН 8,6, а також 0,05 мл 0,01% розчину β -меркаптоетанолу. Потім суміш центрифугували протягом при 14 000 g протягом 45 хвилин (температура 4°C).

Наступний етап екстракції полягав у додаванні суміші охолодженого етанолу (-20°C) та хлороформу, після чого проводили центрифугування при 6000 g впродовж 10 хв. Отриманий супернатант змішували з 3 мл холодного етанолу, перемішували протягом 15 секунд та залишали інкубуватися на 1 год при -20°C. До зразків додавали по 1 мл фосфатного буфера з концентрацією 0,2 М та рН 8,0, після чого проводили центрифугування протягом 12 хвилин при 6000 g.

Супернатант декантували, преципітат промивали у 2 мл буферної суміші, після чого знову проводили центрифугування протягом 20 хвилин при 3000 gт (4°C). Після повторного декантування супернатанту осад ресуспендували в 0,3 мл трис-ЕДТА буферу з рН 7,0. До суміші додавали 4,2 мл розчину ДТНБ з концентрацією 0,43 мМ, приготованого на 0,2 М фосфатному буфері. Оптичну щільність досліджуваних проб вимірювали при довжині хвилі 412 нм.

Для розрахунку кількості металотіонеїнів використовували калібрувальну криву, побудовану на основі концентрації глутатіону (GSH), з подальшим вираженням результатів у мкг/г вологої маси тканини [50].

2.8. Визначення вмісту вільних тіольних груп

Для визначення тіольних груп зразки піддають кількох етапам обробки. Спочатку до 0,1 мл зразка додають 1 мл 20% ТХО, потім центрифугували (3000 об/хв протягом 10 хвилин). Далі до осаду додають 2 мл суміші 0,3 М HClO_4 і 5 мМ ЕДТА, знову центрифугують. Потім додають 2 мл етанолетилацетату і повторно центрифугують. У наступному етапі до осаду додають 5 мл 8 М сечовини та 4 мл буферу KH_2PO_4 (50 мМ) з 5 мМ ЕДТА (рН 7,4). Розчин підігрівають на водяній бані до повного розчинення. Після цього знову центрифугували (3000 об/хв протягом 10 хвилин). Отримані проби розподіляють по чотирьох пробірках: дві контрольні та дві дослідні. У контрольну пробірку додають 1 мл буферного розчину, в дослідну – 2 мл розчину. Потім до кожної пробірки додають 0,02 мл реактиву Елмана. Через 30 хвилин після інкубації вимірюють поглинання при 412 нм за допомогою спектрофотометра, що дозволяє визначити концентрацію тіольних груп у зразках [51].

Кількість білка визначали за допомогою методу Лоурі, який базується на реакції білків з реактивом Фоліна–Чокалтеу. Цей підхід дозволяє кількісно оцінити концентрацію білка завдяки утворенню забарвленого комплексу, інтенсивність якого пропорційна вмісту білка в пробі.

2.9. Статистичні методи дослідження

Для обробки отриманих експериментальних даних використовували електронні таблиці програмного забезпечення Microsoft Excel (Microsoft Office 2013), що дозволяло проводити статистичний аналіз. Значення результатів подавали у вигляді $M \pm m$, де M — це середнє арифметичне, а m — стандартна похибка. Для порівняння між групами було використано t-тест Ст'юдента для параметричних даних. Статистично значущими вважали різниці з рівнем значущості $p < 0,05$. Аналіз результатів та побудову графіків виконували за допомогою інструментів пакету Microsoft Office.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Клітини печінки здатні до швидкої регенерації та відновлення. Коли відбувається часткова резекція печінки або некроз клітин печінки, клітини печінки, що залишилися, регенеруються та відновлюються, відновлюючи не лише нормальну функцію печінки, але й нормальну вагу та об'єм печінки. Регенерація печінки суворо регулюється, при цьому проліферація гепатоцитів припиняється, як тільки співвідношення печінки/маси тіла повертається до норми. Дорослі гепатоцити можуть швидко повернутися до клітинного циклу після часткової резекції печінки, але вони проліферують з низькою швидкістю для гомеостазу. Швидкість заміни гепатоцитів відносно низька під час гомеостазу, лише приблизно 20% замінюється протягом року [52].

Останнім часом регенерацію печінки розділили на три основні процеси: підготовка до регенерації печінки, яка включає секрецію цитокінів і факторів росту, які активують асоційовані сигнальні шляхи та змінюють активність клітин; відновлення печінки, яке починається після активації сигнального шляху, змінюється клітинний цикл спокійних гепатоцитів, і гепатоцити ініціюють проліферацію для повторного заселення пошкодженої печінки; та припинення регенерації печінки, що включає припинення проліферації гепатоцитів шляхом регулювання сигнальних шляхів після повернення співвідношення маси печінки/маси тіла до вихідного рівня [53].

Активні форми кисню (АФК) синтезуються у відповідь на ушкодження тканин і відіграють важливу роль у процесах їх відновлення та регенерації. Окислювальний стрес – це складний захисний механізм, який включає численні сигнальні шляхи та пов'язані білки. Внутрішньоклітинний окисно-відновний баланс відіграє ключову роль у регуляції сигнальних шляхів, що контролюють апоптоз, проліферацію та диференціацію клітин.

Фактор 2, пов'язаний з ядерним фактором E2 (фактор 2, пов'язаний з NF-E2, Nrf2), є внутрішньоклітинним фактором транскрипції, який дуже чутливий до окислювального стресу, головним чином у метаболічних органах, таких як печінка [54].

Мітохондрії в умовах стресу стають основним джерелом активних форм кисню (АФК), серед яких ключова роль належить супероксидному аніон-радикалу. Супероксид-аніон (O_2^-) – це реактивний кисневий метаболіт, залучений до клітинної сигналізації, але при надмірному продукванні він сприяє окислювальному стресу. У печінці це може призвести до запалення, порушення функціонального стану печінки та загибелі клітин.

Результати досліджень показали, що в мітохондріальній фракції печінки контрольних тварин після часткової гепатектомії (група К/ЧГ) рівень супероксидного аніон-радикала підвищується впродовж 48 годин відновлення паренхіми печінки (рис. 3.1.1). Можна припустити, що на ранній фазі регенерації (24 години) та під час активного клітинного поділу (48 годин).у групі К/ЧГ такі зміни пов'язані з ініціацією процесів відновлення органу, а також регулюванням сигнальних шляхів. Існують переконливі докази того, що активні форми кисню можуть відігравати роль у ініціації регенерації печінки через опосередкований клітинами Купфера механізм, що включає TNF-а та NF-каппа В [55]. Так, отримані нами результати в даній групі щурів підтверджуються зростанням рівня TNF- α у сироватці крові щурів після часткової гепатектомії в процесі репаративної регенерації, що відображено в попередніх роботах наукової групи в розрізі даної проблематики.

Водночас у групі щурів ТУ/ЧГ підвищене утворення супероксиду в мітохондріях печінки спостерігається протягом усього періоду експерименту, і навіть на пізніх етапах регенерації (168 годин) (рис. 3.1.1), що може свідчити про тривале порушення окислативного балансу за умов попереднього ацетамінофен-індукованого ушкодження.

Надмірне накопичення супероксидного радикалу у групі ТУ/ЧГ свідчить про окислювальний стрес, додатково індукований гепатотоксичністю. У відповідь на пошкодження клітини печінки активують детоксикаційні механізми, але надмірне утворення супероксиду порушує функціонування мітохондрій, зокрема дихального ланцюга, що призводить до витоку електронів і посилення продукції супероксиду. Печінкове пошкодження також

запускає запальну реакцію: макрофаги та нейтрофіли виділяють активні форми кисню, включаючи супероксид, як частину імунної відповіді на травму [56].

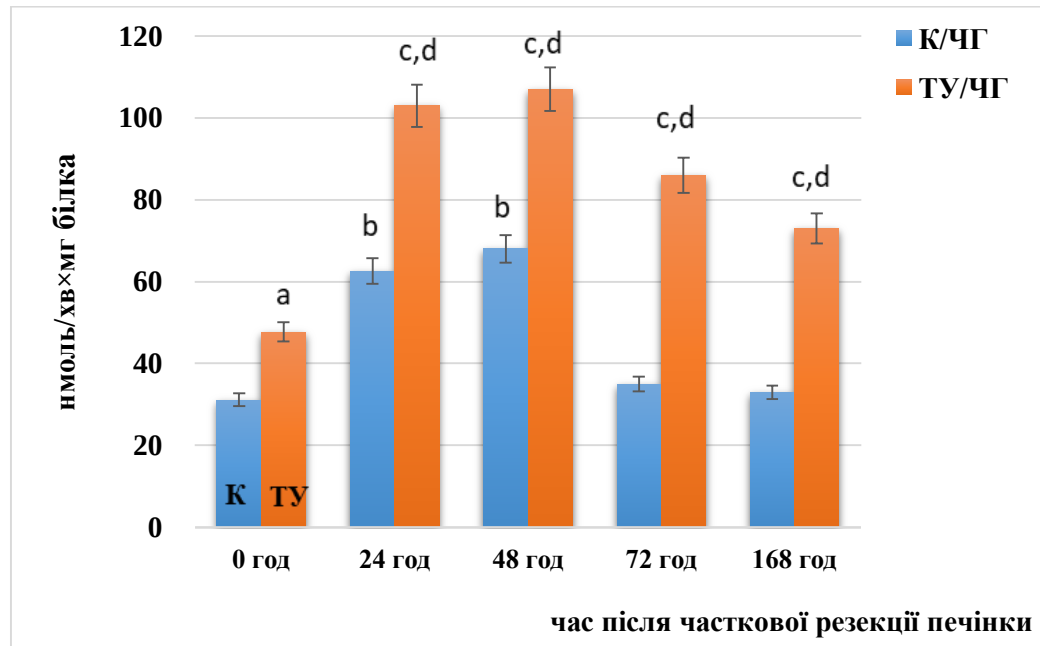


Рис. 3.1.1. Швидкість генерації супероксиду в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів із ацетамінофен-індукованим ураженням після часткової гепатектомії

Примітка (тут і надалі): **К** – контрольні щури; **ТУ** – щури з індукованим токсичним ураженням ацетамінофеном; **К/ЧГ** – контрольні щури з частковою гепатектомією; **ТУ/ЧГ** – тварини з індукованим токсичним пошкодженням, яким виконували сегментарну часткову гепатектомію; **a** – статистично значуща різниця між показниками тварин з токсичним ураженням (ТУ) та контрольної групи (К), $P \leq 0,05$; **b** – статистично значуща різниця між показниками групи з частковою гепатектомією у контрольних тварин (К/ЧГ) порівняно з їх значеннями контролю на 0 годину, $P \leq 0,05$; **c** – статистично значуща різниця між показниками групи з токсичним ураженням та частковою гепатектомією (ТУ/ЧГ) порівняно з показниками щурів групи з токсичним ураженням (ТУ) на 0 годину, $P \leq 0,05$; **d** – статистично значуща різниця між показниками групи щурів із токсичним ураженням та частковою гепатектомією (ТУ/ЧГ) порівняно з групою з частковою гепатектомією у контрольних тварин (К/ЧГ), $P \leq 0,05$.

Додатковим чинником накопичення супероксидів є процес регенерації, який запускається частковою гепатектомією у щурів. Видалення частини печінки стимулює проліферацію гепатоцитів для відновлення її маси, що супроводжується зростанням споживання кисню та підвищенням метаболічної активності. Це може призвести до надмірного утворення

активних форм кисню, включаючи супероксидні аніони. Тому збільшення вмісту супероксиду в групах із ЧГ зумовлене сукупністю цих процесів, які поєднують окислювальний стрес та метаболічні зміни, пов'язані з регенерацією тканин, але лише на початкових етапах (24 та 48 год) [55].

З іншого боку, поєднана дія токсичного ураження ацетамінофеном та часткової гепатектомії викликає запальну реакцію. Запалення, в свою чергу, активує імунні клітини, такі як клітини Купфера, які вивільняють аніони супероксиду як частину свого окислювального вибуху для підтримки регенеративного процесу та усунення пошкоджених клітин.

У групі ТУ/ЧГ печінка вже перебуває в стані окислювального стресу через токсичність ацетамінофену. Після часткової гепатектомії регенеративний процес, намагаючись відновити пошкоджену тканину, посилює окислювальний метаболізм. Цей подвійний вплив може переважити антиоксидантний захист печінки, що призводить до більш значного накопичення АФК.

Посилене утворення супероксид-аніону викликає активацію систем антиоксидантного захисту печінки, зокрема ферменту супероксиддисмутази (СОД). Супероксиддисмутаза відіграє ключову роль у детоксикації супероксид-аніонів, перетворюючи їх на менш реактивний пероксид водню, який потім нейтралізується каталазою або глутатіонпероксидазою.

Активність СОД залежить від конкретного каталітичного іона металу, який може бути манганом ($MnCOD$), ферумом ($FeCOD$), нікелем ($NiCOD$) або купрумом ($Cu/ZnCOD$). Ці класи молекули СОД еволюціонували в різних організмах; в еукаріот $MnCOD$ і $Cu/ZnCOD$ є основними ізоформами.

Усі ссавці (включаючи людей) мають три ізоформи супероксиддисмутази: $Cu/ZnCOD$ (СОД1), мітохондріальну $MnCOD$ (СОД2) і позаклітинну $Cu/ZnCOD$ (СОД3) [57].

Нами встановлено, що в групі щурів К/ЧГ підвищення Mn -залежної супероксиддисмутази активності відбувається лише на початкових етапах

регенерації (24 год) та в період активної проліферації клітин (48 год) порівняно зі значеннями контролю на 0 год (рис. 3.1.2).

Клітинні АФК утворюються ендогенно шляхом мітохондріального окисного фосфорилування або екзогенно стимулюються ксенобіотиками, цитокінами та бактеріальною інфекцією. Супероксид і пероксид водню визнані найбільш фізіологічно відповідними АФК. $O_2^{\bullet-}$ в основному генерується нікотинамідаденіндинуклеотидфосфатоксидазами (NOX) або комплексами I і III мітохондріального ланцюга транспортування електронів. H_2O_2 утворюється супероксиддисмутазами, NOX4, моноаміноксидазами та ксантиноксидазами в кількох різних органелах (ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії та пероксисоми).

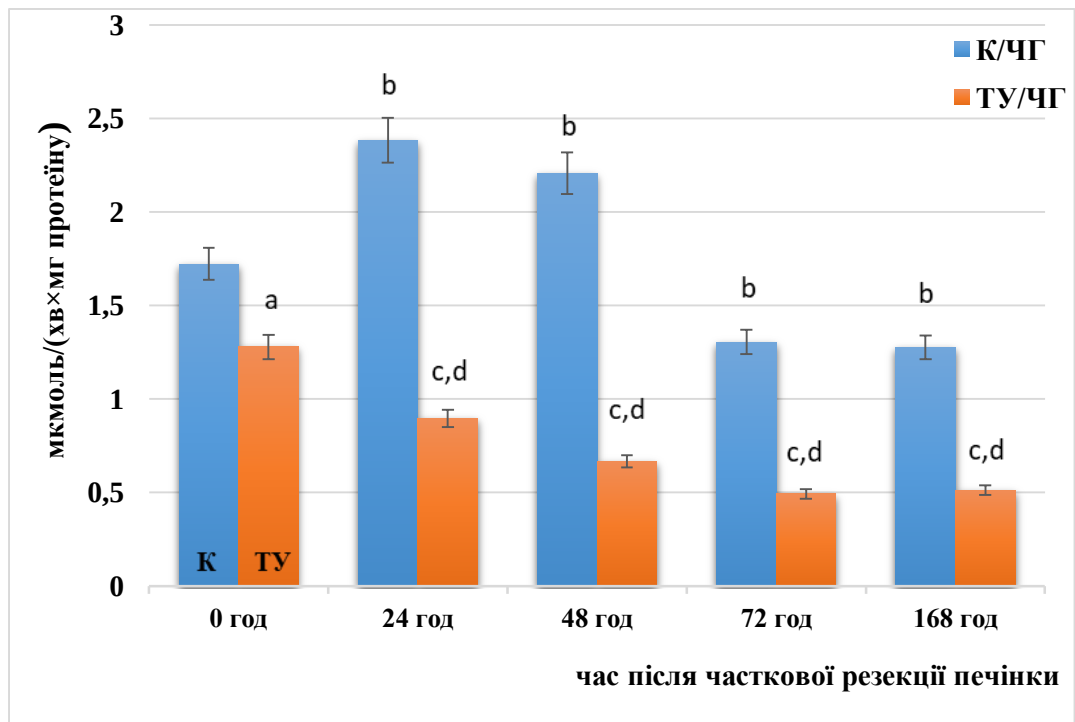


Рис. 3.1.2. Активність Mn-супероксиддисмутази в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

MnСОД – це ядерно-кодований фермент, який транслокується в мітохондріальний матрикс. Він утворений гомотетрамером, що містить активний центр із марганцем як кофактором. Незважаючи на свою

ферментативну антиоксидантну функцію, MnСОД легко зв'язується із залізом, і вироблений залізозаміщений фермент досягає пероксидазної активності, яка генерує високореактивні гідроксильні радикали. Тому для захисту від окислювального стресу марганець здається ідеальним металом, тоді як четвертинна структура MnСОД відповідально підтримує каталітичну та дисмутазну активність [58].

Така диференційована відповідь антиоксидантного захисту підкреслює складні механізми боротьби печінки з окислювальним стресом на ранніх стадіях регенеративної відповіді за умов, викликаних частковою резекцією органу.

Натомість у тварин групи ТУ/ЧГ активність Mn-залежної супероксиддисмутази в мітохондріальній фракції печінки знижується впродовж всього періоду відновлення органу порівняно з 0 год групи ТУ. Як видно з рисунку 3.1.2, активність даного ферменту знижується вже в групі щурів, яким моделювали токсичне ураження (група ТУ) порівняно з контролем на 0 год. Найнижчі значення активності Mn-СОД зареєстровані на завершальних термінах регенераційного процесу (72 та 168 год) (рис. 3.1.2).

Експресія та активність MnСОД регулюється на багатьох рівнях, від транскрипції та трансляції до посттрансляційних модифікацій. NF-κB, специфічний білок 1 (Sp1), активуючий білок-1 (Ap1), p53 і CCAAT-зв'язуючий білок (C/EBP) є основними факторами транскрипції, які регулюють експресію гена MnСОД шляхом безпосереднього зв'язування зі специфічними елементами ДНК. Крім того, посттрансляційні модифікації регулюють експресію та активність білка MnСОД шляхом нітрування, фосфорилування та ацетилювання [59].

Mn-супероксиддисмутаза є одним із критичних ферментів, який нітрується та інактивується *in vivo* за патологічних умов. MnСОД знаходиться в мітохондріальному матриксі еукаріот і в різних прокаріотах, де він каталізує диспропорціонування супероксиду до пероксиду водню та кисню. Слід зазначити, що MnСОД, як видається, є гіперчутливим до нітрування, що

становить до 20 % від загального нітрування протеїнів за умов окисного стресу. MnСОД пригнічує утворення пероксинітриту в мітохондріях шляхом видалення його попередника $\bullet\text{O}_2^-$. Надмірна експресія MnСОД може пригнічувати пошкодження клітин через нітрозативний стрес. Однак MnСОД може бути інактивована внаслідок нітрування критичних залишків тирозину [60].

Ця інактивація може призвести до посиленого утворення пероксинітриту та збільшення пошкодження клітин. Вважається, що MnСОД відіграє певну роль у клітинному циклі через контроль над утворенням активних форм кисню (АФК). Відомо, що пригнічення MnSOD проапоптичними генами p53 і c-Myc індукує апоптоз через збільшення АФК. Нітрування MnСОД також призводить до втрати активності, показуючи, що він також може відігравати роль в індукції апоптозу [61].

Враховуючи результати попередніх досліджень в розрізі наукової проблематики кафедри, очевидним за даних умов стає утворення потужного метаболіту – пероксинітрит-аніону, оскільки O_2^- зі швидкістю дифузії реагує з NO, гіперпродукція якого встановлена в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів із токсичним ураження ацетамінофеном [62]. MnСОД нітрується та інактивується *in vivo*, за Tyr34 як ключовим окислювально модифікованим амінокислотним залишком [63].

Нітрування MnСОД *in vivo* може відбуватися внаслідок прямої реакції з пероксинітритом або через вільну дифундію $\bullet\text{NO}_2$. Є чіткі докази того, що позиційна селективність нітрування тирозину для шляхів пероксинітриту та $\bullet\text{NO}_2$ значно відрізняється. З літературних джерел [60, 63] відомо, що позиційна селективність нітрування тирозину протеїну пероксинітритом може відрізнятися від $\bullet\text{NO}_2$. Було використано відмінності в селективності між цими агентами щодо MnСОД, щоб визначити шляхи, що ведуть до нітрування. Встановлено, що пряма реакція з пероксинітритом призводить до нітрування Tyr34, поблизу активного центру мангану, як з додаванням CO_2 , так і без нього, тоді як реакція з вільно дифундуючим $\bullet\text{NO}_2$ призводить до нітрування

найбільш доступних для розчинника залишків тирозину (Tyr9 і Tyr11). Крім того, нітрування Tyr34 викликає інактивацію ферменту, тоді як нітрування поверхневих залишків ні.

Водночас нами встановлено, що в цитозольній фракції клітин печінки контрольних щурів (група К/ЧГ) спостерігається аналогічна тенденція змін активності Cu,Zn-супероксиддисмутази, яка зростає лише в період 24 год та 48 год після часткової гепатектомії (рис. 3.1.3). Це вказує на активну відповідь антиоксидантних ресурсів гепатоцитів у відповідь на інтенсифікацію утворення супероксиду за даних умов.

Cu/Zn супероксиддисмутаза (СОД1) є висококонсервативним антиоксидантним ферментом, який детоксикує супероксидні радикали ($O_2^{\cdot-}$), каталізуючи їх диспропорціонування до пероксиду водню (H_2O_2) і молекулярного кисню (O_2). СОД1 є одним з найбільш поширених розчинних білків, на нього припадає $> 80\%$ внутрішньоклітинної активності СОД, і його важливість у захисті від окисного стресу підкреслюється зниженням проліферації, зменшенням тривалості життя та метаболічними дефектами [64]. Окрім того, реакція, що каталізується СОД1, є надзвичайно ефективною, протікаючи з майже обмеженою дифузією швидкістю $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, що приблизно в 10^4 разів перевищує константу швидкості для спонтанної дисмутації.

Водночас у групі щурів із токсичним ураженням, яким проводили часткову гепатектомію, спостерігається підвищення активності супероксиддисмутази. Такі зміни зареєстровані нами впродовж всього експериментального періоду з вищезгаданими значеннями на початкових етапах (24, 48 год), а також віддалений термін (168 год) регенеративного процесу (рис. 3.1.3), що може свідчити про активацію антиоксидантних механізмів у результаті пошкодження, спричиненого ацетамінофеном.

В літературі [64] зазначено, що Cu/ZnСОД надмірно експресується за умов підвищення рівнів прозапальних факторів IL-1 β і TNF- α . Це достовірно узгоджується із результатами попередніх досліджень щодо активації

запальних процесів у печінці щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії, спровокованими прозапальними цитокінами.

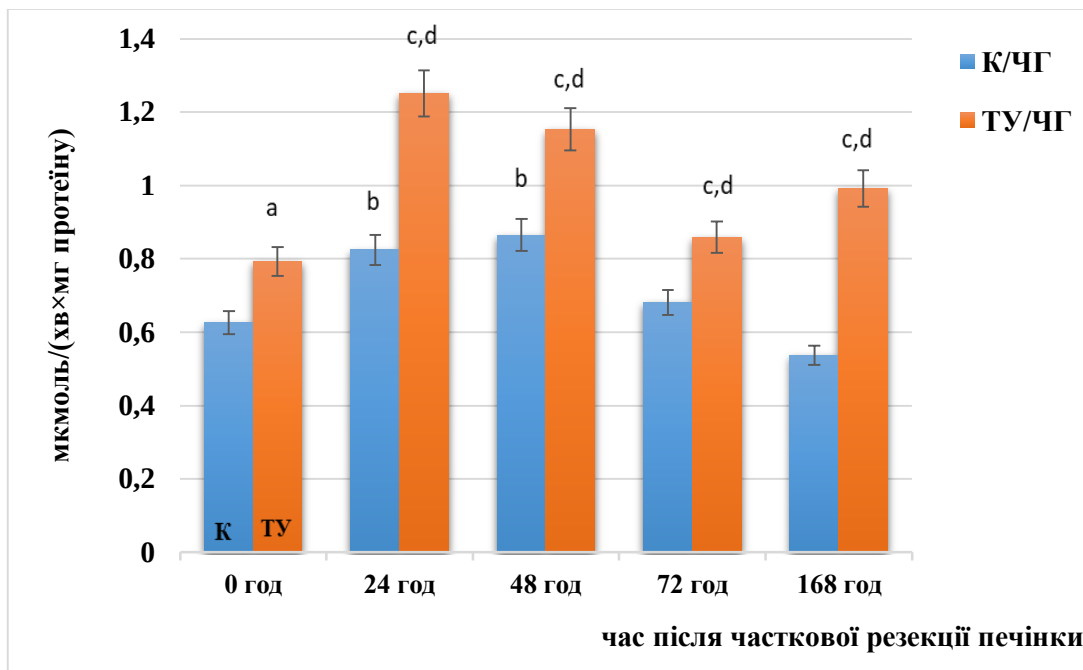


Рис. 3.1.3. Активність Cu,Zn-супероксиддисмутази у цитозольній фракції печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Як зазначалося раніше, O_2^- є найпоширенішим АФК. СОД є металоферментом, який формує механізм антиоксидантного захисту першої лінії та є одним із основних ферментативних компонентів для детоксикації супероксидних радикалів. Виробництво АФК – це каскадний ефект, який спочатку починається з виробництва O_2^- , але може бути нейтралізовано СОД як засобом захисту клітин. Це робить потенційно шкідливий O_2^- менш небезпечним. Вилучивши O_2^- , СОД знижують ризик утворення $OH^\bullet$ через реакцію Габера–Вайса, яка має в 10 000 разів більшу швидкість, ніж спонтанна дисмутація, і натомість реагує в присутності Fe^{2+} через реакцію Фентона з утворенням водню перекис (H_2O_2) і кисень (O_2). Цей фермент унікальний тим, що його активність визначає концентрації O_2^- і H_2O_2 , два субстрати реакції Хабера-Вейса, і тому, ймовірно, є центральним у механізмі антиоксидантного захисту. СОД може усунути O_2^- швидко через його здатність перетворювати

реакцію другого порядку в реакцію першого порядку. Однак, якщо концентрація вільних радикалів перевищує здатність ферменту, O_2^- може поєднуватися з NO з утворенням пероксинітриту або проходити реакцію Фентона з утворенням радикалів $OH^\bullet$ [65], який є сильнішим окислювачем і набагато більш шкідливим, ніж O_2^- , що, в свою чергу, може пригнічувати активність даного ензиму.

У сукупності ці результати свідчать про те, що зміни в дихальних функціях мітохондрій на ранній стадії гепатектомії в групі контрольних тварин зумовлені пошкодженням тканини, викликаним тимчасовим підвищенням вільних радикалів. Потім ці вільні радикали швидко детоксикуються завдяки постійно зростаючій активності Mn-СОД і Cu,Zn-СОД, таким чином захищаючи печінку від подальшого пошкодження та прискорюючи процес регенерації органу. Водночас ацетамінофен-індуковане ураження погіршує цей захист, що, ймовірно, сприяє подальшому пошкодженню печінки в даній групі з розвитком печінкової недостатності.

Отже, у контрольних щурів після часткової резекції печінки активація Mn- і Cu,Zn-супероксиддисмутази відбувається лише на ранніх етапах (24 та 48 год) регенераційного процесу, що очевидно спрямовано на зростання рівня супероксиду. У тварин із токсичним ураженням перебіг репаративної регенерації супроводжується інтенсифікацією генерації супероксиду впродовж всього експериментального періоду та тлі зниження активності Mn-СОД у мітохондріях та активації Cu,Zn-СОД у цитозолі.

Ще одним важливим компонентом антиоксидантної системи печінки є металотіонеїни (MT). Металотіонеїни — це невеликі білки, багаті на цистеїн, які відіграють важливу роль у гомеостазі та детоксикації іонів важких металів завдяки своїй здатності їх зв'язувати. Високий вміст цистеїнових SH-груп надає їм потужні антиоксидантні властивості, що дозволяє нейтралізувати вільні радикали та захищати клітини від окислювального пошкодження.

Відомо, що при впливі токсичних агентів може відбуватися індукція металотіонеїнів. У цитозолі печінки синтезуються ізоформи MT-1 та MT-2. Ці

ізоформи мають здатність зв'язувати токсичні метали та інші шкідливі речовини, сприяючи їх нейтралізації [66].

Нами встановлено, що в цитозольній фракції клітин печінки щурів групи К/ЧГ вміст металотіонеїнів підвищується лише на 24 год та 48 год порівняно зі значеннями 0 год групи контролю (рис. 3.1.4). Водночас у щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової резекції тканин печінки зростання рівня МТ відбувалося впродовж усього експериментального періоду з максимальними значеннями під час фази активної проліферації клітин (48 год) (рис. 3.1.4).

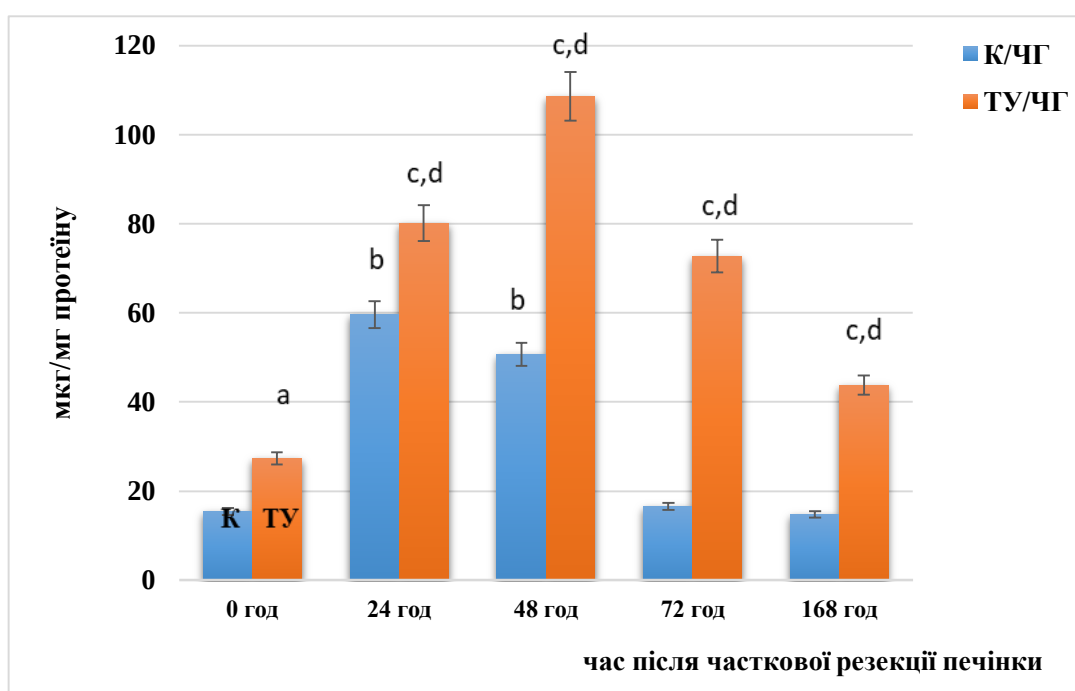


Рис. 3.1.4. Вміст металотіонеїнів у цитозольній фракції клітин печінки щурів із токсичним ураженням після часткової резекції

Збільшення вмісту МТ у цитозолі відповідає гострій фазі відповіді – періоду, що характеризується посиленими захисними механізмами клітини. Транскрипційна активація МТ під час цієї фази, ймовірно, відбувається під впливом цитокінів і транскрипційних факторів (наприклад, Nrf2, активаторний білок-1), які посилено регулюються у відповідь на гепатоцелюлярний стрес. Ця швидка мобілізація МТ у цитозолі слугує для захисту життєво важливих клітинних компонентів і підтримання окисно-

відновного балансу, забезпечуючи першу лінію захисту від окиснювального пошкодження і токсичних ушкоджень. Загалом, МТ локалізується в цитоплазмі і може транслокуватися в ядро, щоб захистити ДНК від пошкоджень і взаємодіяти з факторами транскрипції. Взаємодія та поглинання АФК та інших окислювачів свідчить про те, що МТ також є окисно-відновним буфером. Окислення тіолу за допомогою реактивних метаболітів вивільняє іони цинку, які можуть індукувати сигнали цинку, а отже також експресію додаткового тіонеїну (T_{red}) для подальшого очищення реактивних форм кисню та азоту [67].

Поступове зниження рівня МТ у цитозолі клітин печінки щурів групи К/ЧЕ, починаючи від 48 год, може свідчити про зміну клітинної стратегії. Коли початкові прооксидантні процеси знижуються і печінка вступає в пізні стадії репарації, потреба в цитозольних МТ зменшується. Це зменшення відображає динамічну адаптацію клітинного захисту за фізіологічних умов, коли МТ більше не потрібні у високих концентраціях, як тільки негайні окислювальні загрози стримуються, що дозволяє стабілізувати їх рівень. Тим не менш, цього не можна сказати про групу щурів із токсичним ураженням парацетамолом, яким здійснювали часткову гепатектомію.

Крім того, на клітинному рівні дефіцит або надлишок цинку впливає на окисно-відновний гомеостаз і окисно-відновну передачу сигналів. Зміни в статусі цинку можуть призвести до надмірного виробництва кисневих метаболітів і, таким чином, до окислювального стресу. Відповідно, активність антиоксидантних ферментів, таких як Cu,Zn-СОД, підвищується під час дефіциту цинку, діючи як захисний механізм проти окисного пошкодження. Навпаки, активність Cu,Zn-СОД знижується під час надлишку цинку, оскільки купрум необхідний для активності Cu,Zn-СОД, а підвищений рівень цинку може призвести до дефіциту міді. Нормальний рівень цинку необхідний для експресії антиоксидантних молекул, що призводить до значного зсуву прооксидантного/антиоксидантного балансу в бік прооксидантних умов під час дефіциту цинку. Ці окислювальні умови впливають на різні клітинні

шляхи або фактори транскрипції, які беруть участь у таких механізмах, як клітинна проліферація або апоптоз. Наприклад, дефіцит цинку знижує фосфорилування тирозину сигнальних перетворювачів транскрипційних факторів і активаторів транскрипції STAT 1 і STAT 3, тоді як фосфорилування серину збільшується через активацію MAPK p38 окисним стресом. Крім того, умови окислення під час дефіциту цинку погіршують транслокацію STAT 1 і STAT 3 в ядро. Крім того, активність зв'язування інших факторів транскрипції, таких як білок-активатор 1 (AP-1) або NF-κB, підвищується або знижується відповідно через дефіцит цинку. Це відповідає теорії вищих рівнів АФК або меншої кількості антиоксидантів під час дефіциту цинку, оскільки порушення регуляції окисно-відновної рівноваги модулює ці фактори транскрипції [68].

Щодо рівня металотіонеїнів у мітохондріальній фракції клітин печінки, то у контрольних щурів із ЧГ нами виявлена аналогічна тенденція змін, що характеризується зростанням їх концентрації на початкових етапах регенерації (24 та 48 год) порівняно із контролем 0 год (рис. 3.1.5). У групі ТУ/ЧГ нами зареєстровано протилежну тенденцію змін, що характеризується зниження рівня МТ впродовж всього експерименту із мінімальними значеннями на завершальних етапах регенераційного процесу (рис. 3.1.5).

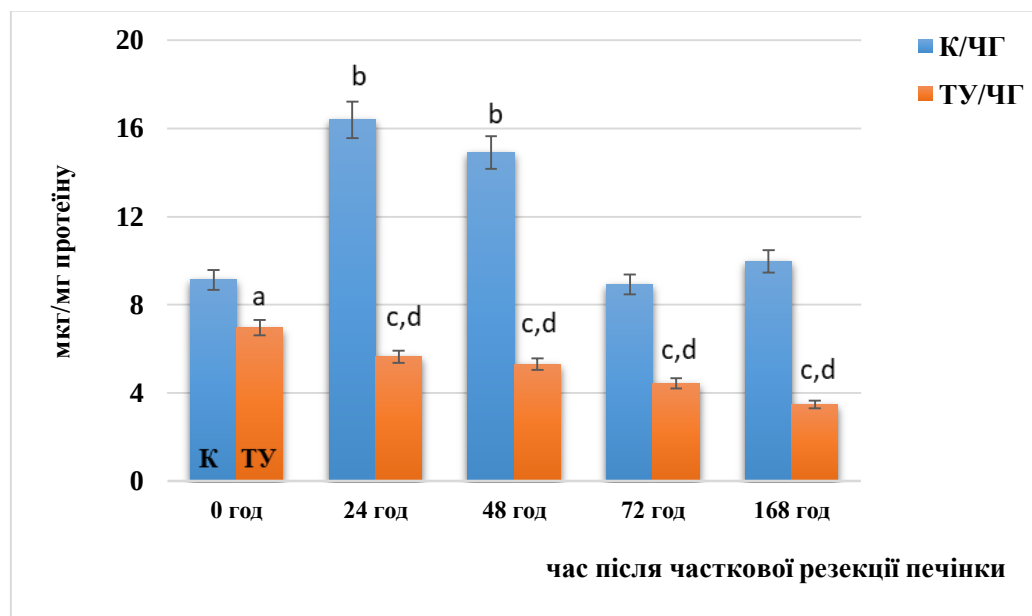


Рис. 3.1.5. Вміст металотіонеїнів у мітохондріальній фракції печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Зазвичай у мітохондріях виявляється ізоформа МТ-3, однак її експресія може бути меншою порівняно з МТ-1 та МТ-2. Вірогідно, тривале зниження рівня МТ в мітохондріях дестабілізує окисно-відновне середовище під час проходження печінкою фаз репарації та регенерації [69].

Поєднання фізичного пошкодження від резекції та хімічного стресу від ацетамінофену призводить до значного сплеску мітохондріального АФК, що вимагає посиленої антиоксидантної відповіді. Зниження рівня МТ вказує на порушення адаптивної відповіді, спрямованої на стабілізацію функцій мітохондрій і захист гепатоцитів від апоптозу або некрозу, викликаного мітохондріальним стресом.

Таким чином, зниження МТ у мітохондріях клітин печінки щурів із ацетамінофен-індуковним ураженням пояснює довготривалу захисну адаптацію проти постійного утворення АФК. Це може бути спричинено як зниженням синтезу металотіонеїнів, що призводить до зменшення кількості молекул, які депонують метали в клітині, так і окисненням їх функціональних груп, що знижує здатність протеїну до депонування.

Усі ізоформи МТ мають молекулярну масу приблизно 7 кДа і не містять ароматичних амінокислот. Крім того, вони мають двадцять залишків цистеїну, які надають МТ особливі властивості на основі атрибутів тіолових груп, що відіграють ключову роль для їх антиоксидантної функції [70].

Отже, в мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки контрольних тварин, яким здійснювали часткову гепатектомію лише на початковому етапі (24 год) та в період активної проліферації (48 год) відбувається зростання рівня металотіонеїнів. У субклітинних фракціях печінки щурів із токсичним ураженням за умов операційних утручань зареєстровано різнонаправлені зміни вмісту металотіонеїнів: у цитозольній фракції печінки – підвищення вмісту МТ, а в мітохондріях – зниження даного показника впродовж досліджуваного періоду регенераційного процесу.

Ще одним із завдань нашої роботи стала оцінка рівня вільних SH-груп в мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки щурів обох дослідних груп після часткової гепатектомії.

У мітохондріальній фракції печінки групи щурів К/ЧГ зниження вмісту SH-груп спостерігається на початкових етапах регенерації печінки – 24 та 48 год, тоді як в групі тварин із ацетамінофен-індукованим ураженням печінки (ТУ/ЧГ) після часткової резекції таке зниження простежується впродовж всього експерименту (рис. 3.1.6).

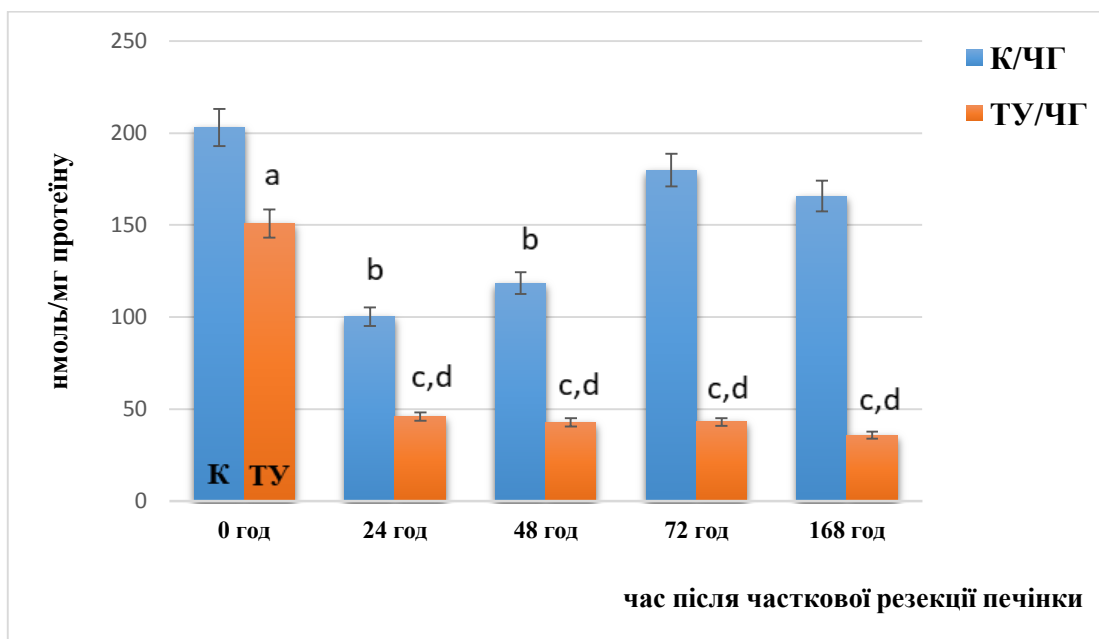


Рис. 3.1.6. Вміст вільних SH-груп у мітохондріальній фракції печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Отримані нами дані свідчать про високу чутливість мітохондріальних білків до оксидативного стресу, оскільки мітохондрії є основними місцями утворення АФК. Часткова гепатектомія ще більше посилює оксидативний стрес, який може перевантажити антиоксидантну здатність мітохондрій, що призводить до значного окислення SH-груп.

Тіольні групи можуть бути окислені та зустрічатися в різних ступенях окислення ($-SH$, $-SS-$, $-SO-$, $-SO_2^-$, $-SO_3^-$). Окислення тіюлатної групи до сульфенової кислоти (RSO^-) є проміжною стадією, яка може зазнавати

подальшого окислення до сульфїнової кислоти (RSO_2^-) і сульфонової кислоти (RSO_3^-) або реагувати з іншою сульфгїдрильною/азотною групою з утворенням дисульфїду/сульфенамїд. Нижчі ступені окислення ($-\text{SS}-$, $-\text{SO}-$) можуть бути відновлені назад до сульфгїдрильних груп, наприклад, за допомогою системи GSH/GSSG. На відміну від цього, зниження RSO_2^- і RSO_3^- є проблемою, за допомогою чого було показано відновлення RSO_2^- сульфїредоксинами. Оборотноє окислення тіолів є однією з найважливіших реакцій залишків цистеїну *in vivo*. Перенесення електронів між двома тіоловими модифікаціями або однією тіоловою модифікацією та окислювально-відновними парами, такими як NAD^+/NADH , бере участь у таких процесах, як окисне згортання білка, підтримка клітинного окислювально-відновного потенціалу або регуляція передачі сигналів і експресії генів, викликаних експозомом [71].

У цитозольній фракції печінки контрольної групи щурів нами виявлена аналогічна тенденція змін вмісту вільних SH-груп порівняно із показниками 0 год у контролю (рис. 3.1.7) та зниження рівня даного показника в групі щурів ТУ/ЧГ впродовж всього експерименту.

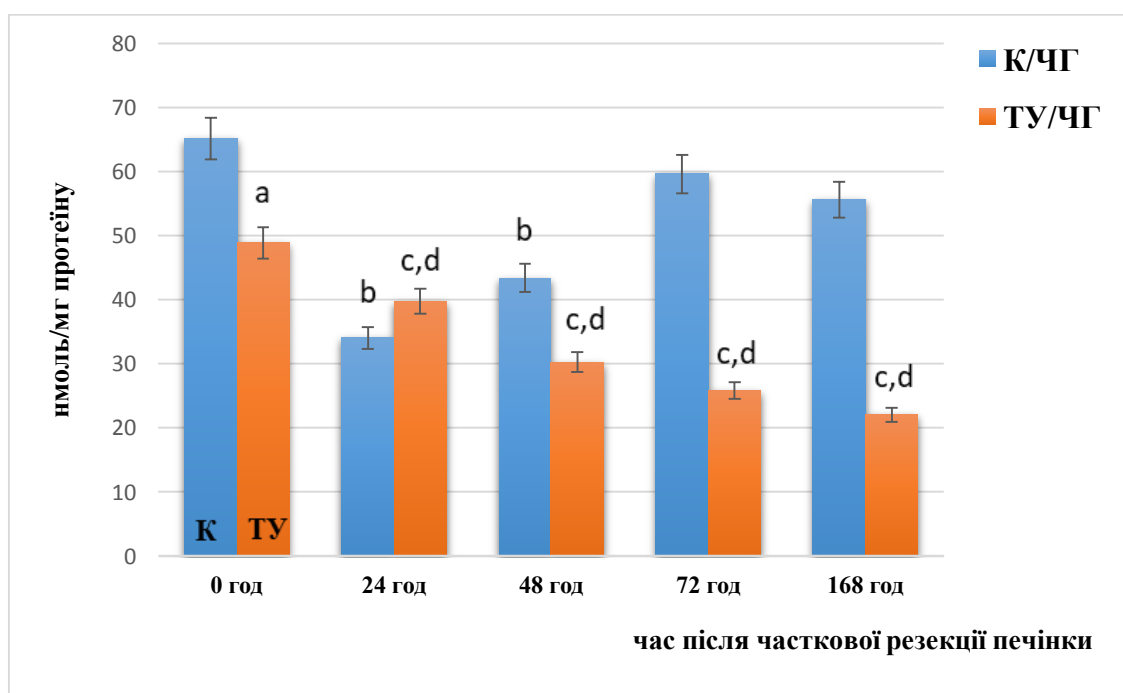


Рис. 3.1.7. Вміст вільних SH-груп у цитозольній фракції печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Завдяки своїй нуклеофільності тіольна група цистеїну хімічно дуже універсальна. Отже, цистеїн часто виконує важливі функції в білку, будь то як активний центр або, у позаклітинних білках, як частина структурного дисульфїду. У цитозолі цистеїни зазвичай відновлюються. Але нуклеофільність його тіолової групи робить його також особливо схильним до посттрансляційних окисних модифікацій. Ці модифікації часто призводять до зміни функції ураженого білка та є оборотними *in vivo*, наприклад, системою тіоредоксину та глутаредоксину. Оборотна природа цих модифікацій *in vivo* та їх генез у присутності локалізованих високих рівнів оксидантів призвела до парадигми регуляції редокс-відновлення на основі тіолів, адаптації та модуляції клітинного метаболізму у відповідь на окислювальні стимули шляхом окислення тіолів у регулятивних білки [72]. Таким чином зниження вмісту рівня вільних SH-груп узгоджується із результатами, виконаними паралельно в групі щурів із ацетамінофен-індукованим ураженням, де встановлено зниження рівня тіоредоксину в цитозольній фракції печінки щурів.

Отже, зниження вмісту вільних SH-груп в мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії відображає посилення окислювальних процесів у тканинах печінки, що призводить до пригнічення регенераційних процесів.

ВИСНОВКИ

1. У контрольних щурів після часткової резекції печінки активація Mn- і Cu,Zn-супероксиддисмутази та зростання вмісту металотіонеїнів в мітохондріальній та цитозольній фракціях та відбувається лише на ранніх етапах (24 та 48 год) регенераційного процесу, що очевидно спрямовано на нейтралізацію підвищеного рівня супероксиду.
2. Перебіг репаративної регенерації печінки в тварин із токсичним ураженням супроводжується інтенсифікацією генерації супероксиду впродовж всього експериментального періоду та тлі зниження активності Mn-СОД та вмісту металотіонеїнів, що вказує на посилення вільнорадикальних процесів у мітохондріях печінки.
3. Упродовж всього періоду регенерації в цитозольній фракції печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії відбувається активація Cu,Zn-СОД та підвищення вмісту металотіонеїнів, що, ймовірно, відображає компенсаторну реакцію антиоксидантних ресурсів гепатоцитів у відповідь на їх виснаження в мітохондріях.
4. Зниження вмісту вільних SH-груп в мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії відображає посилення окислювальних процесів у тканинах печінки, що призводить до пригнічення регенераційних процесів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. Y. Tao et al. *Mediators of Inflammation*. 2017. Vol. 2017. P. 1–9.
2. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. Y. Tao et al. *Mediators of Inflammation*. 2017. Vol. 2017. P. 1–9.
3. Bhushan B., Apte U. Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity. *The American Journal of Pathology*. 2019. Vol. 189. P. 719–729.
4. Subramanian Vignesh K., Deepe Jr. G. Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18. P. 2197.
5. Ulrich K., Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019. Vol. 140. P. 14–27.
6. Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. S. Yagi et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. P. 8414.
7. Michalopoulos G.K. Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2013. Vol. 3. P. 485–513.
8. A.Cienfuegos J., Rotellar F., Baixauli J., Martínez-Regueira F., Pardo F., Hernández-Lizoáin J.L. Liver Regeneration – The Best Kept Secret. A Model of Tissue Injury Response. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2014. Vol. 106. 3. P. 171–194.
9. Michalopoulos G.K. Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2013. Vol. 3. P. 485–513.
10. Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. Liver Regeneration. *Journal of Hepatology*. 2012. Vol. 57. P. 692–694.
11. Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. Y. Miyaoka et al. *Current Biology*. 2012. Vol. 22, no. 13. P. 1166–1175.

12. Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. R. Barbalat et al. *Annual Review of Immunology*. 2011. Vol. 29, no. 1. P. 185–214.
13. Michalopoulos G. K., Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020. Vol. 18, no. 1. P. 40–55.
14. Michalopoulos G. K. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *The American Journal of Pathology*. 2010. Vol. 176, no. 1. P. 2–13.
15. Kurinna S., Barton M. C. Cascades of transcription regulation during liver regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2011. Vol. 43, no. 2. P. 189–197.
16. Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. Y. Miyaoka et al. *Current Biology*. 2012. Vol. 22, no. 13. P. 1166–1175.
17. Frequent Aneuploidy Among Normal Human Hepatocytes. A. W. Duncan et al. *Gastroenterology*. 2012. Vol. 142, no. 1. P. 25–28.
18. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. B.-S. Ding et al. *Nature*. 2010. Vol. 468, no. 7321. P. 310–315.
19. Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. H. Azuma et al. *Nature Biotechnology*. 2007. Vol. 25, no. 8. P. 903–910.
20. Gentric G., Celton-Morizur S., Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2012. Vol. 36, no. 1. P. 29–34.
21. Michalopoulos G. K. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*. 2017. Vol. 65, no. 4. P. 1384–1392.
22. Hu B., Colletti L. M. Stem cell factor and c-kit are involved in hepatic recovery after acetaminophen-induced liver injury in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008. Vol. 295, no. 1. P. G45–G53.

23. Beta-Catenin Activation Promotes Liver Regeneration after Acetaminophen-Induced Injury. U. Apte et al. *The American Journal of Pathology*. 2009. Vol. 175, no. 3. P. 1056–1065.
24. Bhushan B., Apte U. Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity. *The American Journal of Pathology*. 2019. Vol. 189, no. 4. P. 719–729.
25. Pro-Regenerative Signaling after Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury in Mice Identified Using a Novel Incremental Dose Model. B. Bhushan et al. *The American Journal of Pathology*. 2014. Vol. 184, no. 11. P. 3013–3025.
26. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. R. Vona et al. *Antioxidants*. 2021. Vol. 10, no. 2. P. 201.
27. Li Y. R., Trush M. Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species*. 2016. Vol. 1, no. 1.
28. Hancock J. T. Oxygen Is Instrumental for Biological Signaling: An Overview. *Oxygen*. 2021. Vol. 1, no. 1. P. 3–15.
29. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. E. Brglez Mojzer et al. *Molecules*. 2016. Vol. 21, no. 7. P. 901.
30. Superoxide Anion Chemistry—Its Role at the Core of the Innate Immunity. C. M. C. Andrés et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 3. P. 1841.
31. Hayyan M., Hashim M. A., AlNashef I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*. 2016. Vol. 116, no. 5. P. 3029–3085.
32. Sharma L., Lu J., Bai Y. Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2009. Vol. 16, no. 10. P. 1266–1277.

33. Flynn J. M., Melov S. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013. Vol. 62. P. 4–12.
34. J.M., Fridovich I. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. 1969. Vol. 244. P. 6049–6055.
35. Sirt3 Impairment and SOD2 Hyperacetylation in Vascular Oxidative Stress and Hypertension . A. E. Dikalova et al. *Circulation Research*. 2017. Vol. 121, no. 5. P. 564–574.
36. Jung I., Kim T.-Y., Kim-Ha J. Identification of Drosophila SOD3 and its protective role against phototoxic damage to cells. *FEBS Letters*. 2011. Vol. 585, no. 12. P. 1973–1978.
37. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. M. Zheng et al. *Antioxidants*. 2023. Vol. 12, no. 9. P. 1675.
38. Endocytosis of Extracellular Superoxide Dismutase Into Endothelial Cells. Y. Chu et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006. Vol. 26, no. 9. P. 1985–1990.
39. Sutherland D. E. K., Stillman M. J. The “magic numbers” of metallothionein. *Metallomics*. 2011. Vol. 3, no. 5. P. 444.
40. Residue Modification and Mass Spectrometry for the Investigation of Structural and Metalation Properties of Metallothionein and Cysteine-Rich Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, no. 5. P. 913.
41. Florianczyk B. Metallothioneins and Its Role in Metal Regulation, Binding of Reactive Oxygen Species, Apoptosis and Cell Differentiation . *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2007. Vol. 1, No. 1. P. 16–18.
42. Ziller A., Fraissinet-Tachet L. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics*. 2018. Vol. 10, no. 11. P. 1549–1559.

43. Shabb J. B., Muhonen W. W., Mehus A. A. Quantitation of Human Metallothionein Isoforms in Cells, Tissues, and Cerebrospinal Fluid by Mass Spectrometry. *Methods in Enzymology*. 2017. P. 413–431.
44. Mammalian Metallothionein-2A and Oxidative Stress. X.-B. Ling et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17, no. 9. P. 1483.
45. Subramanian Vignesh K., Deepe Jr. G. Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, no. 10. P. 2197.
46. Generation of a Rat Model of Acute Liver Failure by Combining 70% Partial Hepatectomy and Acetaminophen. P. Sahay et al. *Journal of Visualized Experiments*. 2019. No. 153.
47. Schenkman J.B., Cinti D.L. Preparation of microsomes with calcium. *Methods Enzym.* 1978. Vol. 52. P. 83–89.
48. Human Recombinant Cytochrome P450 Enzymes Display Distinct Hydrogen Peroxide Generating Activities During Substrate Independent NADPH Oxidase Reactions. V. Mishin et al. *Toxicological Sciences*. 2014. Vol. 141, no. 2. P. 344–352.
49. Goldring J. P. D. Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY, 2018. P. 31–39.
50. О. Цудзевич, І. В. Калінін Металозв'язувальна здатність металотіонеїнів печінки щурів за отруєння важкими металами *Укр. біохім. журн.* Vol. 483(4). P. 108-112.
51. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959. Vol. 82, no. 1. P. 70–77.
52. Rudnick D. A., Davidson N. O. Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *International Journal of Hepatology*. 2012. Vol. 2012. P. 1–8.

53. Liver Regeneration: Changes in Oxidative Stress, Immune System, Cytokines, and Epigenetic Modifications Associated with Aging. C. Tang et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022. Vol. 2022. P. 1–12.

54. Assessing the Role of Nrf2/GPX4-Mediated Oxidative Stress in Arsenic-Induced Liver Damage and the Potential Application Value of *Rosa roxburghii* Tratt. Y. Xu et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022. Vol. 2022. P. 1–15.

55. Ueno S., Campbell J., Fausto N. Reactive Oxygen Species Derived From NADPH Oxidase System is Not Essential for Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. *Journal of Surgical Research*. 2006. Vol. 136, no. 2. P. 260–265.

56. Hayyan M., Hashim M. A., AlNashef I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*. 2016. Vol. 116, no. 5. P. 3029–3085.

57. SOD1, more than just an antioxidant. E. C. A. Eleutherio et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021. Vol. 697. P. 108701.

58. In vitro preparation of iron-substituted human manganese superoxide dismutase: Possible toxic properties for mitochondria. F. Yamakura et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007. Vol. 43, no. 3. P. 423–430.

59. Dhar S. K., St. Clair D. K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. Vol. 52, no. 11-12. P. 2209–2222.

60. Mechanism of the Reaction of Human Manganese Superoxide Dismutase with Peroxynitrite: Nitration of Critical Tyrosine 34. V. Demicheli et al. *Biochemistry*. 2016. Vol. 55, no. 24. P. 3403–3417.

61. Demicheli V., Moreno D. M., Radi R. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: a paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration in vitro and in vivo. *Metallomics*. 2018. Vol. 10, no. 5. P. 679–695.

62. Копильчук Г. П., Николайчук І. М., Коханюк Ю. І. Вміст оксиду азоту в гепатоцитах щурів за умов аліментарної депривації протеїну та токсичного ураження. *Biological systems*. 2017. Vol. 9, no. 2. P. 159-165.

63. The role of Tyr34 in proton-coupled electron transfer of human manganese superoxide dismutase. Gloria Borgstahl, Jahaun Azadmanesh, Katelyn Slobodnik, Lucas Struble, Erika Cone, Medhanjali Dasgupta, William Lutz, Siddhartha Kumar, Amarnath Natarajan, Leighton Coates , Kevin Weiss, Dean Myles, Thomas Kroll. *Res Sq. Preprint*. 2024. doi:10.21203/rs.3.rs-4494128/v1

64. Cu/Zn Superoxide Dismutase (Sod1) regulates the canonical Wnt signaling pathway. B. Chandrasekharan et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021. Vol. 534. P. 720–726.

65. Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: Role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria. M. Xiao et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. Vol. 111. P. 316–327.

66. Kaspar J. W., Niture S. K., Jaiswal A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009. Vol. 47, no. 9. P. 1304–1309.

67. Hübner C., Haase H. Interactions of zinc- and redox-signaling pathways. *Redox Biology*. 2021. Vol. 41. P. 101916.

68. 64. Oteiza P. Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000. Vol. 28, no. 7. P. 1091–1099.

69. Metallothionein isoforms as double agents – Their roles in carcinogenesis, cancer progression and chemoresistance. M. A. Merlos Rodrigo et al. *Drug Resistance Updates*. 2020. Vol. 52. P. 100691.

70. Subramanian Vignesh K., Deepe Jr. G. Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, no. 10. P. 2197.

71. Miller G. W., Jones D. P. The Nature of Nurture: Refining the Definition of the Exposome. *Toxicological Sciences*. 2013. Vol. 137, no. 1. P. 1–2.

72. Knoke L. R., Leichert L. I. Global approaches for protein thiol redox state detection. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2023. Vol. 77. P. 102390.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях

Загальні вимоги

1. Дана інструкція є обов'язковою при виконанні всіх видів робіт у навчальних на науково-навчальній лабораторіях (далі – лабораторіях) кафедри біохімії та біотехнології.

2. Відповідальним за організацію роботи в лабораторіях у відповідності з нормами і правилами техніки безпеки, охорони праці і протипожежної безпеки є завідувач лабораторіями і викладач, який проводить лабораторні роботи.

3. Робота у біохімічній лабораторії пов'язана з використанням шкідливих горючих (далі ГР), пожежо-небезпечних, легкозаймистих (далі ЛЗР), токсичних речовин у газоподібному, рідкому або твердому стані. При виконанні лабораторних робіт використовуються електронагрівальні та вимірювальні прилади. У мікробіологічній лабораторії робота проводиться з використанням культур мікроорганізмів, що вимагає умов дотримання стерильності.

4. До роботи в лабораторії допускаються студенти, які пройшли вступний первинний інструктаж та згідно з навчальним планом мають лабораторні заняття чи виконують заплановану науково-дослідну роботу.

5. До роботи в біохімічній лабораторії не допускаються працівники з поганим самопочуттям, у хворобливому стані, при медичних протипоказаннях.

6. Будь-які роботи потрібно виконувати точно та акуратно, не допускаючи поспішності та безпорядку. Всі необхідні розрахунки треба робити наперед і тільки в робочих журналах. Робити записи і розрахунки на чернетках або випадкових папірцях не дозволяється.

7. На робочому місці повинні знаходитися тільки необхідні для виконання конкретної роботи реактиви, прилади та обладнання, зошит для

записів спостережень та інструкція до лабораторної роботи. Все, що могло би завадити своєчасній ліквідації наслідків можливої аварії, повинно бути забрано. Мінімальний запас посуду необхідний, але він повинен зберігатись окремо. Якщо посуд не має постійного місця, зберігається неакуратно, він обов'язково розіб'ється.

8. Дослідні роботи, результат яких неможливо передбачити наперед, не слід проводити з великими кількостями речовин. Проте, навіть якщо дослідні проби з малими кількостями проходять добре, то при переході до великих наробок треба дотримуватись обережності.

9. Основними небезпечними й шкідливими факторами при роботі в лабораторіях є:

- небезпека опіку хімікатами через порушення правил техніки безпеки при проведенні дослідів;
- загазованість приміщення токсичними, пожежо- і вибухонебезпечними речовинами виникає при роботі з леткими й газоподібними речовинами поза витяжною шафою, при раптовому руйнуванні лабораторного обладнання, при проливі летких рідин;
- небезпека ураження електричним струмом може бути у випадку відсутності або неполадках заземлення, неполадок роз'ємів і пускових пристроїв, при порушенні правил користування електрообладнанням і приладами;
- небезпека пораненням склом зумовлена застосуванням скляного посуду, скляних приладів і устаткування у випадку порушення цілісності цих виробів, при використанні частково зруйнованих або надколотих скляних виробів, при неправильному їх застосуванні або використанні не за призначенням;

10. Кожен працівник повинен мати спецодяг – бавовняний халат (але не синтетичний), волосся повинне бути зібране в пучок або мати хустинку на голові. При потребі необхідно використовувати захисну маску. Необхідно

враховувати високу сорбційну здатність текстильних матеріалів по відношенню до отруйних газів і речовин. Вони виділяються із пор забрудненого одягу і можуть шкідливо діяти на організм. Тому спецодяг треба регулярно прати. У випадку попадання будь-яких хімічних речовин на одяг, його треба негайно замінити. Не можна зберігати разом робочі халати та особистий одяг. Працювати, навіть, знаходитися в лабораторії без спецодягу та головного убору заборонено.

11. У лабораторіях суворо ЗАБОРОНЕНО:

- працювати при несправній вентиляції;
- виконувати будь-які роботи, не пов'язані безпосередньо з виконанням завдань;
- курити, зберігати та споживати їжу;
- працювати без спецодягу;
- шуміти, голосно розмовляти, бігати, робити різкі рухи;
- мобільні телефони повинні бути вимкнені;
- зберігати особистий одяг, сумки;
- працювати в лабораторії одному;
- залишати без нагляду працюючі установки, нагрівальні прилади, відкрите полум'я. Якщо треба ненадовго відлучитись від працюючої установки, потрібно **ОБОВ'ЯЗКОВО** доручити нагляд за нею іншому досвідченому працівнику.

Вимоги безпеки перед початком роботи

1. Заходити до лабораторії і приступати до роботи можна тільки з дозволу викладача або завідувача лабораторіями і проходження вступного, первинного чи цільового інструктажу з охорони праці з відміткою у журналі.
2. Не дозволяється самостійно включати електроприлади.

3. Перед початком роботи потрібно включити витяжну вентиляцію. Проводити роботи за відсутності примусової вентиляції категорично забороняється.

4. Перед початком робіт необхідно одягнути спецодяг, а при необхідності - додаткові захисні засоби (гумові рукавиці, респіратори, окуляри тощо).

Вимоги безпеки під час виконання роботи

1. Виконавець робіт повинен знати про небезпечні фактори, які виникають при роботі в біохімічній лабораторії.

2. Студенти зобов'язані виконувати тільки ті досліді, які вказані в інструкції до певної лабораторної роботи чи до певного експерименту.

3. Всі роботи, пов'язані з виділенням шкідливих речовин або газів повинні проводитися під витяжною шафою.

Основні правила з користування центрифугою

Користувач повинен уважно прочитати керівництво користувача перед початком роботи на центрифугу!

1. Перед початком роботи користувач повинен переконатися, що кабель живлення є цілим та не пошкодженим.

2. Перевірити ротор центрифуги на наявність сторонніх предметів чи забруднення. Якщо такі присутні, видалити їх та очистити роторну камеру та ротор від забруднень.

3. Використовувати тільки ті типи пробірок, які вказані в інструкції користувача та дозволені уповноваженим регіональним представником, або виробником центрифуги.

4. Не можна використовувати скляні пробірки з видимими дефектами та пошкодженнями.

5. Пробірки (окрім пластикових пробірок з кришкою на 15 мл) необхідно встановлювати в спеціальні захисні.

6. Перед початком роботи користувач повинен перевіряти стан утримувача пробірок, їх наявність в роторі та їх чистоту. При необхідності адаптери повинні бути очищені та знезаражені дезінфікуючим розчином згідно чинного регламенту медичного закладу. Якщо адаптер має пошкодження, користувач повинен його замінити на новий.

7. Пробірки повинні бути встановлені симетрично, одна навпроти одної, для запобігання дисбалансу ротору під час роботи центрифуги. Дисбаланс ротору призведе до ушкодження центрифуги, ротору та роторної камери, або навіть ушкодження персоналу, який знаходиться поряд.

8. Якщо користувач використовує одну пробірку або декілька та для балансу ротора йому не вистачає кількості пробірок з дослідним матеріалом, він повинен встановити додаткову пробірку з дистильованою водою або речовиною, яка буде однакової ваги з іншими пробірками.

9. Якщо пробірка має малі розміри та не досягає дна утримувача необхідно використовувати спеціальні адаптери, які встановлюються в середину утримувача пробірок та виконують функцію зменшення довжини утримувача для пробірки, що дає змогу пробірці надійно зафіксуватися.

10. Центрифуга працює тільки із закритою кришкою. Не можна відкривати кришку під час роботи, переміщувати її.

11. Після закінчення встановленого часу центрифугування потрібно дочекатися повної зупинки ротору центрифуги та відкриття її кришки, тільки потім виймати пробірки з дослідним матеріалом.

12. Після закінчення роботи потрібно уважно оглянути центрифугу на наявність зовнішніх та внутрішніх пошкоджень та забруднень.

13. Якщо Ви виявили забруднення, потрібно відключити центрифугу від живлення, видалити забруднення та продезінфікувати.

Порядок дій при виявленні проблем під час роботи на центрифугі.

Якщо користувач виявив ушкодження ротора або роторної камери, він повинен негайно звернутися до регіонального представника виробника та

повідомити про випадок, детально описати ситуацію та пошкодження центрифуги.