

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

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

**АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ КАТАБОЛІЗМУ ЦИСТЕЇНУ В ПЕЧІНЦІ
РІЗНОВІКОВИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ
ДИКВАТОМ**

Дипломна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 А групи

Світлана ГРОМОВА

Керівник: кандидат біологічних наук,
асистент **Іванна НИКОЛАЙЧУК**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2025 р.

Зав. кафедрою _____ доцент Волощук О.М.

Чернівці – 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню особливостей катаболізму цистеїну в печінці щурів різного віку за умов гострого токсичного ураження дикватом. У роботі досліджено концентрацію цистеїну та активність ензимів катаболізму даної амінокислоти – γ -глутамілцистеїнсинтетази та цистеїндиоксигенази в різновікових щурів – підліткових (60 днів), репродуктивних (150 днів) та зрілих (360 днів).

Встановлено, що за умов токсичного ураження дикватом – ксенобіотиком промислового походження – в цитозольній фракції печінки спостерігається зниження активності γ -глутамілцистеїнсинтетази на тлі зменшення вмісту цистеїну в щурів репродуктивного (150 днів) та зрілого (360 днів) віку.

Показано, що за умов токсичного ураження дикватом у цитозольній фракції печінки різновікових щурів активність цистеїндиоксигенази зростає лише у тварин зрілого (360-денного віку), що може бути компенсаторним механізмом, спрямованим на посилення катаболізму цистеїну та детоксикацію продуктів його окислення.

Ключові слова: цистеїн, γ -глутамілцистеїнсинтетаза, цистеїндиоксигеназа, токсичне ураження, дикват, печінка.

ABSTRACT

The bachelor's thesis is dedicated to the study of cysteine catabolism features in the liver of rats of different ages under acute toxic exposure to paraquat. The work investigates the concentration of cysteine and the activity of enzymes involved in the catabolism of this amino acid – γ -glutamylcysteine synthetase and cysteine dioxygenase – in adolescent (60 days), reproductive (150 days), and mature (360 days) rats.

It was established that under toxic exposure to paraquat – a xenobiotic of industrial origin – there is a decrease in the activity of γ -glutamylcysteine synthetase in the cytosolic fraction of the liver, accompanied by a reduction in cysteine content in reproductive (150 days) and mature (360 days) rats.

It was shown that under toxic exposure to paraquat, the activity of cysteine dioxygenase in the cytosolic fraction of the liver increases only in mature (360-day-old) rats, which may represent a compensatory mechanism aimed at enhancing cysteine catabolism and detoxification of its oxidation products.

Key words: cysteine, γ -glutamylcysteine synthetase, cysteine dioxygenase, toxic exposure, paraquat, liver.

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

_____ С.В. Громова

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Структурно-функціональна характеристика цистеїну	7
1.2. Біохімічні особливості катаболізму цистеїну	8
1.3. Дикват як гербіцид і його токсичний вплив на організм	12
1.4. Механізми токсичності диквату	13
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	17
2.1. Об'єкти та методи дослідження	17
2.2. Отримання цитозольної фракції	17
2.3. Визначення активності γ -глутамілцистеїнсинтетази	18
2.4. Визначення активності цистеїндіоксигенази	18
2.5. Визначення концентрації цистеїну	19
2.6. Визначення кількості білка за методом Лоурі	19
2.7. Статистична обробка результатів	19
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	20
ВИСНОВКИ	29
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	30
ДОДАТКИ	34

ВСТУП

Цистеїн – сульфуровмісна протеїногенна амінокислота, яка відіграє ключову роль у підтриманні гомеостазу клітини, функціонуванні антиоксидантної системи та підтриманні здатності гепатоцитів регулювати основні біохімічні процеси залежно від фізіологічного або токсичного навантаження [21]. Його участь у синтезі глутатіону, таурину, сульфату та інших сульфуровмісних сполук зумовлює критичне значення в регуляції редокс-стану клітини, транскрипційної активності, апоптозу, проліферації та загального обміну речовин. Особливу біохімічну важливість має ферментативний шлях катаболізму цистеїну з утворенням 3-сульфіноаланіну під дією цистеїндиоксигенази, що є ключовим етапом у біосинтезі таурину – фізіологічно активної аміносурьфонової кислоти [5].

Системна дія токсинів екзогенного походження, зокрема біпіридилових гербіцидів, становить серйозну загрозу біохімічній рівновазі в клітині. Дикват (1,1'-етилен-2,2'-біпіридиліум) – потужний індуктор окисного стресу, що реалізує свою токсичність шляхом активації окисно-відновного циклу з посиленням утворення активних форм кисню [14]. Відомо, що дикват спричиняє uszkodження печінки через порушення антиоксидантного захисту, зокрема за рахунок виснаження внутрішньоклітинного пулу глутатіону. Проте вплив цієї речовини на метаболізм цистеїну, зокрема на ферментативні ланки його катаболізму, залишається недостатньо вивченим, особливо у віковому аспекті [26]. Оскільки печінка є ключовим органом метаболізму сульфуровмісних амінокислот, оцінка її функціонального стану за дії диквату має важливе наукове значення [38]. Вивчення вікових особливостей змін активності γ -глутамілцистеїнсинтетази та цистеїндиоксигенази, а також концентрації цистеїну за умов дикват-індукованого токсичного ураження дозволяє глибше зрозуміти адаптивні можливості клітини в регуляції антиоксидантного захисту [31].

Дана робота присвячена вивченню особливостей катаболізму цистеїну в печінці щурів різного віку за умов токсичного ураження дикватом із

визначенням біохімічних маркерів, що характеризують функціонування антиоксидантної системи та метаболізм сульфуровмісних сполук.

Мета роботи – дослідити особливості катаболізму цистеїну в печінці різновікових щурів за умов токсичного ураження дикватом.

Для досягнення мети поставлені наступні завдання:

- ✓ дослідити вміст цистеїну в цитозольній фракції печінки різновікових щурів за умов дикват-індукованого ураження;
- ✓ оцінити активність γ -глутамілцистеїнсинтетази та цистеїндиоксигенази в цитозольній фракції печінки різновікових щурів за умов дикват-індукованого ураження.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структурно-функціональна характеристика цистеїну

Цистеїн – це напівнезамінна протеїногенна амінокислота. Цистеїн є попередником кількох сульфуровмісних молекул, таких як газоподібна сигнальна молекула сірководень, лантіонін, таурин, коензим А та біотин. Незважаючи на те, що цистеїн відносно невеликий, він зазнає максимальної кількості посттрансляційних модифікацій. Порушення регуляції метаболізму цистеїну та сірководню часто зустрічається при деяких нейродегенеративних розладах [29]. Цистеїн є однією з двох сірковмісних амінокислот, які відіграють ключову роль у регуляції окисно-відновного процесу клітин, метаболічних перетвореннях, синтезі білка. Цистеїн відіграє ключову роль у структурі білка завдяки своїй здатності утворювати дисульфідні містки в кислому середовищі [2]. Завдяки своїй високій реакційній здатності цистеїнові тіоли можуть реагувати з активними формами кисню, утворюючи сульфенову, сульфїнову та сульфонову кислоти, причому останні дві вважаються продуктами необоротного окислення [8]. Цистеїн також використовується як джерело Сульфуру для різних типів кофакторів, таких як кофермент А, біотин або кластери Fe-S [21].

Цистеїн – один із найменш поширених, але найбільш консервативних амінокислотних залишків у білках і виконує різноманітні функціональні ролі, включаючи регулювання каталізу, структури, окисно-відновної чутливості. Важливо, що цистеїн з його високоіонізованим і чутливим до окислення атомом Сульфуру, реагує на різні рН і окисно-відновні умови еукаріотичних субклітинних органел. Залишки цистеїну зосереджені в ключових функціональних місцях у білках, виконуючи різні ролі у зв'язуванні металів, каталізі та окисно-відновній хімії [7].

У клітинах є безліч механізмів для підтримки постійного запасу цистеїну, який використовується для різних цілей. Цистеїн може надходити з їжею, а також синтезуватися ендогенно за допомогою цистатіонін- γ -ліази. Цистеїн також може бути отриманий шляхом розпаду глутатіону і білків при

аутофагії [12]. Утворений цистеїн споживається різними метаболічними шляхами, такими як синтез білків та утворення сульфуровмісних молекул, таких як глутатіон, таурин, лантіонін, коензим А та сірководень (H_2S) [15].

Важливо, що цистеїн є важливою складовою кератину, основного білка волосся, нігтів та екзоскелету кількох видів тварин. Шкіра та волосся містять майже 10-14 % цистеїну. Багата на цистеїн природа кератину дозволяє утворювати численні дисульфідні зв'язки, які впливають на цілісність і стабільність кератину. Відомо, що лікування препаратами, які містять цистеїн, допомагає протидіяти випаданню волосся [30].

1.2. Біохімічні особливості катаболізму цистеїну

Цистеїн є напівнезамінною сульфуровмісною амінокислотою, що надходить з їжею або може бути синтезована *de novo* з метіоніну в процесі транссульфурації. У позаклітинному середовищі цистеїн окиснюється до цистину – димерної форми, яка виступає основною транспортною формою вільного, не зв'язаного з білками, цистеїну [21].

Процес транссульфурації регулюється активацією ферменту цистатіонін- β -синтази та одночасним інгібуванням метилентетрагідрофолат-редуктази у відповідь на підвищення рівня S-аденозилметіоніну. Такий механізм сприяє зниженню концентрації гомоцистеїну в умовах надлишку метіоніну та підтриманню гомеостазу метаболітів сульфуровмісних амінокислот.

Катаболічні шляхи цистеїну передбачають два принципово відмінні напрямки метаболічних перетворень:

- 1) шляхи, що починаються з окиснення тіолової групи до сульфінової кислоти;
- 2) шляхи, за яких атом сульфуру вивільняється ще до його окиснення.

Основним шляхом катаболізму цистеїну за умов надходження достатньої кількості сульфуровмісних амінокислот є його окиснення до

3-сульфіноаланіну під дією цистеїндиоксигенази, яка має високу спорідненість до цистеїну ($K \approx 0,5$ ммоль/л) [35].

Надалі 3-сульфіноаланін метаболізується такими шляхами: або декарбоксілюється до гіпотаурину, під дією декарбоксилази сульфїнової кислоти цистеїну, з подальшим перетворенням на таурин, або трансамінується з 2-оксоглутаратом за участі цитозольної та мітохондріальної форм аспартатамінотрансферази з утворенням 3-сульфїнілпірувату, який спонтанно розпадається на піруват і сульфїт [27]. Експресія та активність цистеїндиоксигенази, яка найінтенсивніше проявляється в печінці, нирках, підшлунковій залозі, жировій тканині та легенях, зростає зі збільшенням внутрішньоклітинної концентрації цистеїну. Надлишок цистеїну гальмує деградацію цього ферменту та сприяє його стабілізації. За порушення функції цистеїндиоксигенази спостерігається гіперцистеїнемія та зниження синтезу таурину [3]. Метилування промоторної ділянки гена ферменту характерне для багатьох злоякісних новоутворень, і може бути прогностичним маркером пухлинного процесу. Синтез таурину істотно залежить від активності цистеїндиоксигенази, а розподіл 3-сульфіноаланіну між метаболічними шляхами, частково регулюється рівнем декарбоксилази сульфїнової кислоти цистеїну. У печінці гризунів вміст таурину обернено корелює з експресією гена декарбоксилази [35].

Підвищена концентрація внутрішньоклітинного цистеїну індукує експресію цистеїндиоксигенази, який відіграє ключову роль у підтриманні гомеостазу сульфуровмісних амінокислот у більшості ссавців і деяких грибів [1]. Дисфункція цистеїндиоксигенази асоціюється з розвитком патологічних станів, де кінцеві продукти її активності є ключовими факторами тяжкості клінічного перебігу [19]. Зокрема, цистеїндиоксигеназа виконує функції гена-супресора пухлин, а зниження її активності встановлено при низці злоякісних новоутворень. Тому вивчення механізмів регуляції активності цього ферменту становить значний інтерес для молекулярної онкології та патобіохімії метаболізму амінокислот [38].

У ссавців фермент цистеїндіоксигеназа експресується переважно в адипозній тканині, печінці, головному мозку, тонкому кишечнику, легенях і нирках [23]. За фізіологічних умов фермент цистеїндіоксигеназа каталізує окиснення L-цистеїну з утворенням цистеїнсульфінової кислоти. Надалі вона метаболізується до таурину та сульфату, що сприяє зменшенню концентрації вільного цистеїну в клітині [9].

Хоча цистеїндіоксигеназа є критично важливою для контролю рівня вільного цистеїну, механізми її регуляції залишаються недостатньо вивченими. З моменту відкриття патофізіологічна роль цього ферменту досліджена на різних моделях порушень, властивих як організму людини, так і тваринному світу [33]. Цистеїндіоксигеназа широко вивчалася при раку, метаболічних розладах та нейродегенеративних захворюваннях. Недостатність або порушення активності цього ферменту асоціюється з накопиченням цистеїну, що може спричинити нейротоксичні ефекти, зокрема підвищення ризику розвитку таких захворювань, як хвороба рухових нейронів, хвороба Паркінсона та хвороба Альцгеймера [25].

Окрім катаболізму, цистеїн виступає попередником у низці біосинтетичних процесів. Зокрема, він є попередником у синтезі: цистеїніл-тРНК, необхідної для білкового синтезу; глутатіону – ключового внутрішньоклітинного антиоксиданту; коензиму А; сульфуровмісних компонентів клітини, таких як Fe-S кластери, молібденові кофактори та тіол-модифіковані тРНК, при цьому транспорт Сульфуру забезпечується ферментом NFS1 [4].

γ -Глутамілцистеїнсінтетаза (КФ 6.3.2.2, γ -ГЦС) – ключовий ензим у біосинтезі глутатіону – трипептиду, що функціонує як ключовий компонент системи антиоксидантного захисту та підтриманні редокс-гомеостазу. γ -ГЦС каталізує перший, швидкість-лімітуючий етап біосинтезу глутатіону – утворення γ -глутамілцистеїну, після чого глутатіонсінтетаза завершує синтез глутатіону, шляхом приєднання залишку гліцину.

γ -Глутамілцистеїнсинтетаза є гетеродимерним ферментом, що складається з каталітичної субодиниці, яка кодується геном *Gclc*, та модифікуючої субодиниці, яка кодується геном *Gclm*. Фізіологічні концентрації глутатіону пригнічують активність γ -глутамілцистеїнсинтетази за алостеричним механізмом. Активність цього ензиму є критичною для забезпечення ефективного антиоксидантного захисту клітини [13].

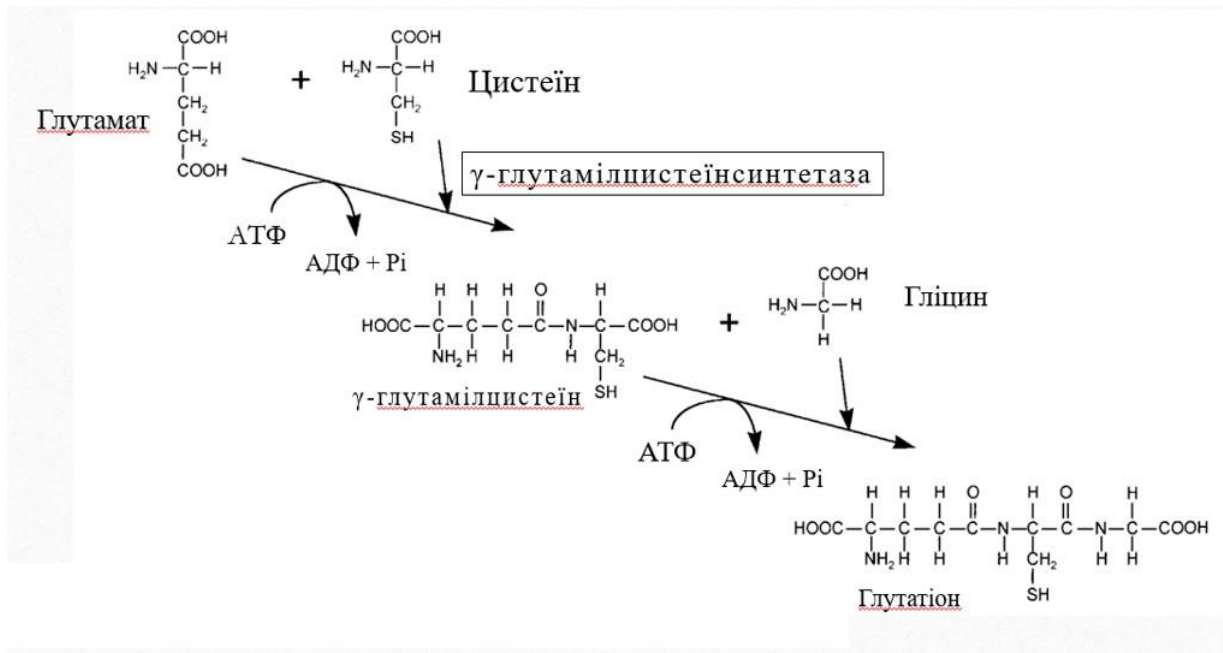


Рис. 1.2.1. Біосинтез глутатіону з амінокислот-попередників

Глутатіон є основною системою детоксикації для кон'югації ксенобіотичних сполук, а також відіграє важливу роль у підтримці окисно-відновного стану клітин, діючи як ендogenous антиоксидант [5].

Метаболізм білків і глутатіону сприяє регенерації вільного цистеїну. Натомість розщеплення коензиму А супроводжується утворенням цистеаміну – декарбоксільованого похідного цистеїну. Надалі цистеамін метаболізується до гіпотаурину, з якого утворюється таурин – аміносурфонові кислота з численними фізіологічними функціями.

1.3. Дикват як гербіцид і його токсичний вплив на організм

Дикват (1,1'-етилен-2,2'-біпіридиліум) – неселективний біпіридиловий гербіцид, структурно подібний до параквату [20]. Він використовується як контактний гербіцид, а також як десикант перед збиранням урожаю, переважно в сільському господарстві [14].

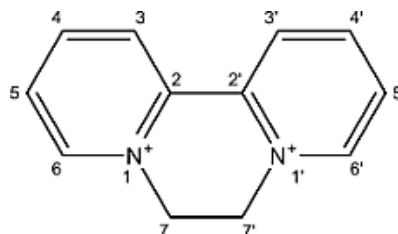


Рис. 1.3.1 Структурна формула диквату

Його вперше синтезував доктор Філден у лабораторіях Відділу барвників Імперської хімічної промисловості (Блеклі, Англія). На той час було відомо, що четвертинні амонієві сполуки, які належать до класу поверхнево-активних речовин, мають потужнішу фітотоксичну дію, ніж аніонні або неіонні сполуки, що викликало інтерес до створення програми для оцінки їхньої гербіцидної активності [26].

У 1955 році дикват був синтезований, згодом виявили його ефективність як осушувача та гербіциду, що призвело до виведення препарату на ринок у 1958 році. Хоча використання диквату є менш поширеним порівняно з паракватом, відсутність ефективних антидотів при отруєнні та високий рівень смертності спричинили заборону використання гербіциду в багатьох країнах світу [31].

Отруєння дикватом може спричинити ураження багатьох тканин і органів. Найчастіше уражаються травний тракт і нирки, у тяжких випадках також печінка, легені та серце. Важливо зазначити, що дикват чинить токсичний вплив і на центральну нервову систему, що проявляється такими клінічними симптомами, як запаморочення, сонливість, судоми, кома, дратівливість та дезорієнтація [26]. Після потрапляння в організм дикват

швидко розподіляється кровотоком у різні органи і тканини. Радикали диквату здатні взаємодіяти з різними клітинними нуклеофілами, спричиняючи пряме ушкодження клітинних структур [20].

1.4. Механізми токсичності диквату

Дикват є потужним окисно-відновним циклізатором і легко перетворюється на вільний радикал, здатний віддавати електрон молекулярному кисню з утворенням супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\cdot -}$). Подальші реакції утворюють інші активні форми кисню, які ініціюють ліпідну пероксидацію в мембранах клітин і спричиняють цитотоксичність, що, у свою чергу, може призводити до загибелі клітин. Після обмеження використання параквату, кількість випадків отруєння дикватом почала зростати [33].

Основним механізмом цитотоксичної дії диквату вважається індукція окисно-відновного циклу з подальшим утворенням активних форм кисню (АФК). Генерація АФК призводить до оксидативного стресу, пошкодження клітинних мембран, білків і нуклеїнових кислот, що зумовлює загибель клітин [26].

Дикват може потрапляти в організм через шлунково-кишковий тракт, дихальні шляхи, слизові оболонки очей або пошкоджену шкіру. Всмоктування диквату через шкіру та легені є обмеженим, однак при порушенні цілісності шкірного покриву абсорбція значно зростає. Найпоширенішим і найнебезпечнішим шляхом надходження диквату в організм при гострому отруєнні є пероральний [36]. У шлунково-кишковому тракті дикват частково деградує під впливом мікробіоти кишечника, що обмежує його абсорбцію до рівня менше 10 %. Після проникнення в організм дикват швидко розподіляється кровотоком у різні органи й тканини [33]. Найвищі концентрації речовини фіксуються в печінці та нирках, а також у легенях, шлунково-кишковому тракті та центральній нервовій системі, де максимальне накопичення спостерігається через 2 години після потрапляння, після чого рівень поступово знижується. Попри низьку швидкість абсорбції, дикват

характеризується інтенсивним і системним розподілом по організму [10]. Патологоанатомічні дослідження пацієнтів, які померли в різні терміни після отруєння дикватом, показали варіативність концентрацій речовини у біологічних рідинах і тканинах. Так, у випадках смерті через 14 годин спостерігався такий порядок накопичення: сеча – склоподібне тіло ока – легені – печінка – мозкова тканина – нирки. Натомість при летальних випадках через 143 години максимальні концентрації фіксувалися у печінці, скелетних м'язах, легенях, нирках, мозковій тканині та серці відповідно [16].

Дикват є хімічною сполукою, що характеризується відносною стабільністю в організмі людини. Лише незначна його частка піддається метаболічному перетворенню в печінці шляхом епоксидування піридинового кільця за участю ферментів цитохрому P450, унаслідок чого утворюються менш токсичні похідні – йодопіридин та дипіридин, які надалі також метаболізуються [6].

Основна частина диквату, що надходить до організму через шлунково-кишковий тракт, виводиться з каловими масами протягом перших 24 годин (приблизно 90–95 %), приблизно 45 % виводиться із сечею протягом 48 годин після абсорбції. Невелика частина виводиться з жовчю, близько 2 % диквату абсорбується в системний кровообіг з подальшим розподілом по тканинах [37]. Порівняно з паракватом, рівень виведення диквату з сечею не демонструє суттєвих відмінностей, однак концентрація диквату в жовчі, як правило, вища, що може свідчити про можливу участь жовчі у зниженні рівня диквату в сироватці крові та тканинах при тривалому надходженні речовини. При гострому надходженні диквату всередину організму може спостерігатися короткочасна стимуляція окисно-відновної активності, однак у тяжких випадках це може призвести до летального наслідку [31]. У щурів введення високих доз диквату призводить до розвитку некротичних уражень печінки, деструктивних змін у легенях і загибелі тварин внаслідок інтенсивного гострого оксидативного стресу [17].

Дикват і паракват є структурно подібними сполуками, що належать до класу біпіридилових катіонів, які зазвичай представлені у формі солей броміду або хлориду.

Також механізм токсичної дії диквату полягає у здатності цієї сполуки брати участь в окисно-відновному циклі, що базується на перенесенні одного електрона за участі НАДФН+H⁺ та ферменту цитохром Р450-редуктази.

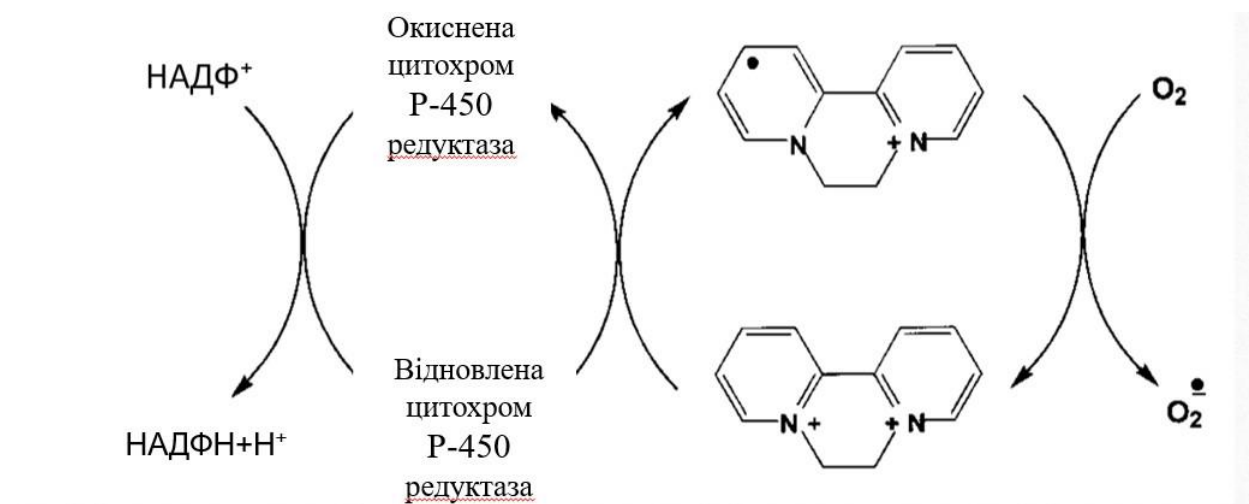


Рис. 1.4.1 Окисно-відновний цикл диквату

На цьому етапі утворюється нестабільний радикал диквату, який швидко реагує з молекулярним киснем, генеруючи супероксидний аніон. Внаслідок цього відбувається безперервне чергування процесів відновлення й окиснення, відоме як «окисно-відновний цикл».

Ці радикали можуть взаємодіяти з утворенням перекису водню як спонтанно, так і за участі ферменту супероксиддисмутази. За фізіологічних умов перекис водню знешкоджується ферментами каталаза та глутатіонпероксидаза. Проте за надмірного утворення активних форм кисню ці антиоксидантні системи виснажуються, що сприяє накопиченню перекису водню. У присутності іонів Феруму перекис водню бере участь у реакції Фентона з утворенням гідроксильного радикала – одного з найагресивніших вільних радикалів, який ініціює перекисне окислення ліпідів, ушкоджує біомембрани та спричиняє некроз клітин.

У печінці окислювальний стрес, індукований дикватом, супроводжується вивільненням іонів Феруму з феритину, зниженням вмісту глутатіону та виснаженням НАДФН+Н⁺. Це порушує функціонування антиоксидантної системи клітини. Доведено, що введення каталази, особливо у поєднанні з хелаторами Феруму (наприклад, дефероксаміном), значно знижує гепатотоксичність диквату, що вказує на ключову роль перекису водню та іонів перехідних металів у реалізації його токсичного ефекту [14].

Основний механізм ураження печінки пов'язаний з надмірним утворенням активних форм кисню, зокрема супероксиду, що порушує функціональний стан органу – метаболічну, детоксикаційну та імунну активність. Внаслідок цього в печінці розвиваються дегенеративні зміни гепатоцитів, запалення, мітохондріальна дисфункція та апоптоз [6]. Зниження рівня глутатіону та активація проапоптотичних факторів, таких як білки p53 і Вах, поглиблюють апоптоз гепатоцитів. У свою чергу, надмірне утворення активних форм кисню у мітохондріях ще більше посилює оксидативний стрес [14].

На сьогоднішній день лікування отруєння дикватом залишається експериментальним, а ефективного специфічного антидоту не існує. Застосовувані терапевтичні стратегії спрямовані переважно на підтримання функцій органів і зменшення оксидативного ушкодження [11].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи дослідження

У дослідженні використано білих безпородних щурів віком 60, 150 та 360 днів із масою тіла відповідно 92 ± 7 г, 141 ± 12 г та 228 ± 8 г. Тварин утримували в стандартних пластикових боксах з вільним споживанням води протягом усього періоду дослідження на дерев'яній підстилці. Годування здійснювалося згідно зі стандартним раціоном віварію.

Усі тварини утримувалися у віварії кафедри біохімії та біотехнології ЧНУ імені Ю. Федьковича. Усі маніпуляції проводилися відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (7-ма Національна конференція з біоетики, 2018) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Моделювання гострого токсичного ураження проводили шляхом перорального введення дослідним тваринам диквату, використовуючи зонд в дозі 115,5 мг на кг маси тварин, що становить $\frac{1}{2} LD_{50}$ [18]. У ході проведення експерименту тварин трьох вікових категорій поділили на дві групи:

1-ша група (K) – інтактні щури (контрольна група);

2-га група (DQ) – тварини, яким експериментально моделювали токсичне ураження шляхом введення диквату.

Умертвіння тварин проводили під легким наркозом, використовуючи хлороформ.

2.2. Отримання цитозольної фракції

Печінку гомогенізували в 0,25 М розчині сахарози. Отриманий гомогенат фільтрували через чотиришарову марлю. Ядерні та мітохондріальні структури осаджували центрифугуванням при 12 000 g протягом 15 хвилин. До супернатанту додавали 1 частину 80 мМ $CaCl_2$ та 1 частину 160 мМ $MgCl_2$ у 10 мМ буферному розчині трис-НСl з рН 7,4 у співвідношенні 9:1 до надосадової рідини. Суміш перемішували 10 хв на магнітній мішалці при

температурі 4°C, після чого здійснювали центрифугування при 10 000 g (10 хвилин). Утворений осад – мікросомна фракція, яка формується внаслідок нейтралізації зарядів мікросом двовалентними катіонами. Надосадову рідину після виділення мікросом використовували як постмікросомальну (цитозольну) фракцію [24].

2.3. Визначення активності γ -глутамілцистеїнсинтетази

Активність γ -глутамілцистеїнсинтетази (КФ 6.3.2.2) визначали шляхом кількісного аналізу неорганічного фосфату (P_H), який утворюється внаслідок ферментативного розщеплення АТФ. Реакційна суміш містила: 0,1 мл 0,01 М L-глутамату, 0,1 мл 0,01 М L-амінобутирату, 0,1 мл 0,02 М $MgCl_2$, 0,1 мл 0,005 М Na-АТФ, 2,5 мл 0,2 М трис-НСl (рН 8,2). Для зупинки реакції додавали 0,5 мл 10% ТХО.

Кількість P_H у надосаді визначали колориметрично за методом Фіске-Суббароу. Метод базується на утворенні фосфомолібденової кислоти при взаємодії фосфату з молібдатом амонію у кислому середовищі, подальшому відновленні аскорбатом до синьої сполуки. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації фосфору. Кількісний аналіз проводили за калібрувальним графіком із використанням калій дигідрофосфату (30 мкг/мл) [28].

2.4. Визначення активності цистеїндиоксигенази

Цистеїндиоксигеназу (КФ 1.13.11.20) досліджували в системі, що містила 0,5 мМ цистеїну, 40 мкМ дитіотреїтолу та буфер трис-НСl концентрацією 0,47 мМ з показником рН 7,4. До суміші додавали цитозольну фракцію та інкубували 30 хв на водяній бані. Реакцію зупиняли 10% ТХО. Після центрифугування 1500 g, 20 хв визначали залишкову кількість цистеїну у супернатанті.

Концентрацію цистеїну визначали за кольоровою реакцією з кислотним нінгідрином, вміст пробірок набуває рожевого забарвлення. До проб додавали

кислотний нінгідриновий реагент, інкубували при 100°C протягом 10 хв, охолоджували та вимірювали екстинкцію за довжини хвилі 560 нм. Концентрацію цистеїну визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої на основі стандартних розчинів (100 мкг/мл).

2.5. Визначення концентрації цистеїну

Кількісний вміст цистеїну визначали за його здатністю утворювати рожево забарвлену сполуку в результаті реакції з кислотним нінгідриновим реагентом.

До цитозолю додавали 1 мл 10% ТХО, після центрифугування 1500 g, 20 хв у надосадовій рідині вміст цистеїну визначали спектрофотометрично: 1,5 мл супернатанту змішували з 1,5 мл нінгідринового реагенту, інкубували при 100°C, охолоджували, реєстрували оптичну густина при 560 нм [22].

2.6. Визначення кількості білка за методом Лоурі

Кількість білка оцінювали за методом Лоурі. Суть методу полягає у взаємодії білків з іонами міді (Cu^{2+}) у лужному середовищі, з утворенням комплексів, які далі реагують із реактивом Фоліна, утворюючи забарвлений продукт із максимумом поглинання при 750 нм.

Для реакції у 0,1 мл гомогенату вводили 0,9 мл води та 2 мл реактиву С, ретельно перемішували й інкубували 10 хв. Потім додавали 0,2 мл реактиву Е, витримували 30 хв у темряві. Колориметрію проводили при 750 нм у кюветах 0,5 мм, порівнюючи з контролем [28].

2.7. Статистична обробка результатів

Аналіз результатів проводили з використанням Microsoft Excel та функціоналу пакету «Аналіз даних». Вірогідність відмінностей визначали за допомогою t-критерію Стьюдента (двовибірковий t-тест), вважаючи значущими значення при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Цистеїн є замінною сірковмісною амінокислотою, яка відіграє ключову роль у підтриманні редокс-гомеостазу клітини, участі в біосинтезі глутатіону, коферментів, металотіонеїнів, та в детоксикаційних процесах [21]. Його катаболізм відбувається переважно в печінці за участі ферментативних систем, зокрема γ -глутамілцистеїнсинтетази та цистеїндиоксигенази. Вікові зміни в організмі супроводжуються перебудовою метаболічних шляхів, що може суттєво впливати на інтенсивність катаболізму амінокислот, зокрема цистеїну, і, як наслідок, на здатність до антиоксидантного захисту [27].

У літньому віці відзначають зниження активності ферментів антиоксидантної системи, зменшення пулу відновленого глутатіону та накопичення продуктів оксидативного стресу [31]. Водночас у молодому організмі ферментативні системи, як правило, функціонують ефективніше, що забезпечує високий рівень метаболічної пластичності. Тому дослідження особливостей катаболізму цистеїну в печінці у тварин різного віку є важливим для розуміння вікових аспектів регуляції антиоксидантного захисту, метаболічної адаптації та механізмів відповіді на токсичне навантаження [5].

З огляду на широке застосування токсичних сполук, зокрема гербіцидів на основі диквату, що здатні індукувати оксидативний стрес і вражати печінку, вивчення впливу токсикантів на обмін цистеїну набуває особливої актуальності. Отже, аналіз змін у катаболізмі цистеїну залежно від віку є не лише теоретично важливим для розуміння фундаментальних процесів старіння, але й має прикладне значення для оцінки вікової вразливості до дії ксенобіотиків і розробки корекційних стратегій [11].

Цистеїн – це сульфуровмісна амінокислота, яка відіграє ключову роль у регуляції клітинного метаболізму, є попередником у біосинтезі глутатіону, бере участь у синтезі таурину, сульфату, а також у забезпеченні сульфуровмісних метаболічних реакцій. Підтримка оптимального рівня вмісту цистеїну в гепатоцитах є критично важливою для функціонування антиоксидантної системи клітини, зокрема глутатіон-залежного захисту [21].

Результати проведених досліджень показали, що в цитозольній фракції печінки щурів 360-денного віку (зрілі) вміст цистеїну знижується порівняно з 60-денними тваринами (підліткові) на 13% та 150-денними щурами (репродуктивними) на 31% відповідно (рис 3.1).

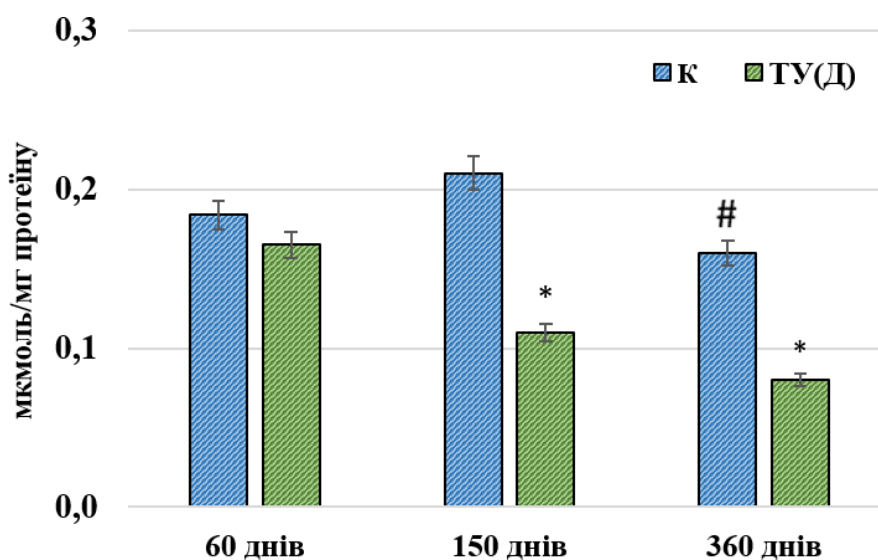


Рис. 3.1. Концентрація цистеїну в цитозольній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження дикватом

*Примітка (тут і далі) : К – контроль, ТУ(Д) – тварини, яким моделювали токсичне ураження дикватом; # – статистично достовірна різниця порівняно з контрольними щурами 60-денного та 150-денного віку; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем кожної вікової групи, $p \leq 0,05$.*

Наукові дослідження показують, що рівень цистеїну в печінці може змінюватись з віком, але ці зміни не є однозначними і можуть відрізнятися залежно від виду, досліджуваної тканини та інших факторів [27].

По-перше, у процесі старіння спостерігається активація оксидативного стресу, що може стимулювати ферментативні шляхи катаболізму цистеїну — передусім за участі цистеїндіоксигенази, яка каталізує перетворення цистеїну на сульфінілпіруват, сульфід та, зрештою, сульфат. Цей шлях забезпечує ефективно знешкодження надлишку цистеїну, однак за умов хронічного окисного навантаження може спричинити його виснаження [1].

По-друге, з віком відзначається зниження експресії ферментів, відповідальних за синтез глутатіону, зокрема γ -ГЦС, що опосередковано впливає на збереження пулу вільного цистеїну. При цьому можливе порушення регенерації цистеїну з гомоцистеїну через неефективність шляху транссульфурації (в якому беруть участь цистатіонін- β -синтаза та цистатіонін- γ -ліаза) [27]. Вікове зменшення інтенсивності протеолізу: у молодому віці активніший внутрішньоклітинний протеоліз (включаючи аутофагію), який є джерелом амінокислот, зокрема цистеїну. У старшому віці зниження інтенсивності деградації білків може обмежувати ресинтез амінокислот.

По-третє, може відбуватися підвищене використання цистеїну в детоксикаційних процесах. У зрілому віці зростає потреба у зв'язуванні ксенобіотиків та продуктів перекисного окиснення ліпідів, що стимулює витрати цистеїну на синтез глутатіону, металотіонеїнів та інших низькомолекулярних тіолів. Це зумовлює зменшення пулу вільного цистеїну в печінці [12].

Водночас у щурів, яким моделювали токсичне ураження дикватом, концентрація цистеїну статистично достовірно знижувалася у вікових групах 150 та 360 днів на 48% та 50% відповідно порівняно з контрольними величинами вказаних вікових груп (рис. 3.1). Особливо виражене зниження спостерігалось у 360-денних тварин. З огляду на те, що дикват є індуктором оксидативного стресу, такий ефект можна пояснити активним використанням цистеїну на синтез глутатіону в умовах антиоксидантної відповіді, а також можливим порушенням транспорту амінокислот і виснаженням внутрішньоклітинних резервів сульфурвмісних сполук [26]. У щурів 150-денного (репродуктивного) віку за інтенсивного оксидативного стресу потреба в глутатіоні різко зростає, що супроводжується виснаженням внутрішньоклітинного пулу вільного цистеїну як субстрату для його синтезу.

Оксидативне ушкодження мембранних білків і ліпідів може знижувати активність транспортерів цистеїну (антипорт глутамат/цистеїн), що обмежує надходження амінокислоти в клітини печінки [1]. Це ще більше поглиблює її

внутрішньоклітинний дефіцит. Цистеїн також може брати участь у кон'югації з електрофільними метаболітами диквату, що утворюються в процесі його біотрансформації. Це реакції фази II детоксикації, що супроводжуються зменшенням пулу вільного цистеїну [6].

За умов токсичної дії можливе порушення білкового метаболізму, що знижує надходження цистеїну з внутрішньоклітинного протеолізу або посилює використання інших амінокислот, обмежуючи ресурси для транссульфураційного перетворення гомоцистеїну в цистеїн [27]. Таким чином, зниження вмісту цистеїну у щурів репродуктивного віку за дії диквату є комплексним наслідком інтенсивного використання цистеїну на потреби антиоксидантного захисту, ферментативного катаболізму, кон'югації токсикантів і порушення транспорту, що перевищує швидкість його ресинтезу або надходження.

У щурів 360-денного віку базовий рівень оксидативного стресу вже підвищений, а дія диквату ще більше індукує генерацію АФК, зростає потреба у глутатіоні, а отже – й у цистеїні. Через вже наявний дефіцит антиоксидантних резервів, навіть помірна токсична дія призводить до диспропорційно високого виснаження внутрішньопечінкового цистеїну. У зрілому віці переважають катаболічні метаболічні програми над анаболічними. Дикват, як оксидант, стимулює активацію ферментів катаболізму цистеїну, особливо цистеїндіоксигенази [9]. Це призводить до швидкого його розщеплення на сульфінілпіруват, сульфід та сульфат, без достатнього синтетичного поповнення. На відміну від молодих тварин, у зрілих щурів знижується аутофагічна та лізосомальна активність, що зменшує розпад внутрішньоклітинних білків, які могли б служити джерелом вільного цистеїну [12].

Отже, у щурів зрілого віку (360 днів) токсична дія диквату призводить до більшого дефіциту цистеїну, ніж у молодших груп, оскільки вичерпані або знижені адаптивні механізми, які в репродуктивному віці ще зберігають відносну ефективність. Це робить зрілий організм особливо вразливим до

порушень обміну сірковмісних амінокислот та зниження антиоксидантного захисту.

γ -Глутамілцистеїнсинтетаза (КФ 6.3.2.2, γ -ГЦС) – ключовий ензим у біосинтезі глутатіону – трипептиду, який є ключовим компонентом системи антиоксидантного захисту клітин та підтриманні редокс-гомеостазу. γ -ГЦС каталізує перший, швидкість-лімітуючий етап біосинтезу глутатіону – утворення γ -глутамілцистеїну. Тому функціональна активність цього ензиму є критичною для забезпечення ефективного антиоксидантного захисту клітини [13].

Нами встановлено, що в тварин контрольної групи з віком активність γ -глутамілцистеїнсинтетази в цитозольній фракції печінки знижується (360 днів) порівняно з показниками 60-денних (підліткові) та 150-денних (репродуктивні) щурів. Наприклад, це може бути пов'язано зі зменшення доступності ключових амінокислот, зокрема цистеїну, через зниження ефективності його транспортування та метаболізму [31]. Натомість активність γ -ГЦС у цитозольній фракції печінки щурів, яким моделювали токсичне ураження дикватом, знижується в тварин репродуктивного (150 днів) та зрілого (360 днів) віку на 30% та 44% рази у відповідності з даними порівняння з показниками контролю зазначених вікових груп (рис. 3.2).

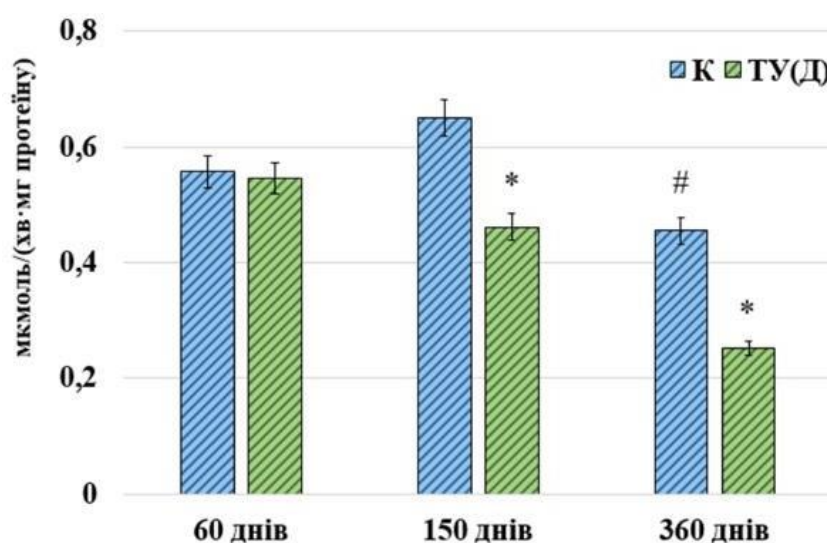


Рис. 3.2. Активність γ -глутамілцистеїнсинтетази в цитозольній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження дикватом

Зниження вмісту γ -глутамілцистеїнсинтетази у цитозольній фракції печінки тварин репродуктивного віку за умов токсичної дії диквату можна пояснити розвитком оксидативного стресу, зумовленого надмірним утворенням активних форм кисню під дією зазначеного гербіциду. Утворення АФК викликає ушкодження клітинних мембран, білків та ДНК, що супроводжується порушенням функціонування гепатоцитів та, як наслідок, зниженням експресії гена GCLC, який кодує γ -глутамілцистеїнсинтетазу. Крім того, з огляду на високу метаболічну активність печінкової тканини в репродуктивному віці, клітини більш чутливі до токсичного навантаження, що посилює деструктивні процеси. Зменшення пулу вільного цистеїну як основного субстрату для синтезу глутатіону також може сприяти зниженню активності ферменту [21]. У комплексі ці порушення призводять до пригнічення біосинтезу глутатіону – ключового компонента антиоксидантної системи клітини.

У тварин зрілого віку зниження вмісту γ -глутамілцистеїнсинтетази зумовлене комплексом вікових та патологічних змін, що впливають на ферментативну систему печінки [12]. У процесі старіння відбувається поступове зниження функціональної активності гепатоцитів, що супроводжується зменшенням синтезу багатьох ферментів, зокрема γ -глутамілцистеїнсинтетази. Це пов'язано зі зниженням експресії відповідних генів та зменшенням ефективності трансляції білків. Водночас, у зрілому організмі спостерігається підвищений рівень оксидативного стресу через накопичення реактивних форм кисню, які ушкоджують клітинні структури та ферменти, що може призводити до деструкції ферменту або порушення його синтезу. Крім того, з віком знижується регенеративний потенціал печінки і порушується баланс антиоксидантної системи, що додатково послаблює підтримку нормального рівня γ -глутамілцистеїнсинтетази [27]. Таким чином, зниження вмісту цього ферменту у тварин зрілого віку є результатом поєднання вікових змін, оксидативного ушкодження і порушення регуляції синтезу ферменту.

Зниження активності γ -глутамілцистеїнсинтетази (ГЦС) при зниженому рівні цистеїну в репродуктивних та зрілих щурів за умов токсичної дії диквату можна пояснити механізмами зворотного регулювання, характерними для ферментів, що беруть участь у метаболізмі амінокислот [21]. Цистеїн є одним із субстратів для синтезу γ -глутамілцистеїну, тому його дефіцит призводить до зменшення доступності субстрату для ферменту, що безпосередньо впливає на активність ГЦС.

Крім того, зниження рівня цистеїну може сигналізувати клітині про необхідність зниження синтезу ферменту, щоб уникнути неефективного використання ресурсів. Такий механізм зворотного зв'язку реалізується через регуляцію експресії генів, які кодують ГЦС, або через алостеричне пригнічення ферменту [38]. Внаслідок цього активність ГЦС знижується, що відповідає зменшенню рівня субстрату і адаптує метаболізм до наявних умов.

Отже, за умов токсичного ураження дикватом – ксенобіотиком промислового походження, в цитозольній фракції печінки спостерігається зниження активності γ -глутамілцистеїнсинтетази на тлі зменшення вмісту цистеїну в щурів репродуктивного (150 днів) та зрілого (360 днів) віку.

Таким чином, під дією диквату зниження активності γ -глутамілцистеїнсинтетази може бути результатом комбінованого впливу дефіциту субстрату (цистеїну), прямого ушкодження ферменту оксидативним стресом та пригнічення синтезу ферменту, що разом призводить до порушення гомеостазу сульфуровмісних амінокислот і зниження антиоксидантного потенціалу печінки.

Водночас активність цистеїндіоксигенази в цитозольній фракції печінки щурів також демонструє вікову залежність та чутливість до токсичного впливу диквату. Як видно з рисунку 3.3, зростання цистеїндіоксигеназної активності спостерігається лише в щурів 360-денного віку, яким моделювали гостре токсичне ураження промисловим ксенобіотиком дикватом, на 46% порівняно з показниками контролю відповідної вікової групи [9].

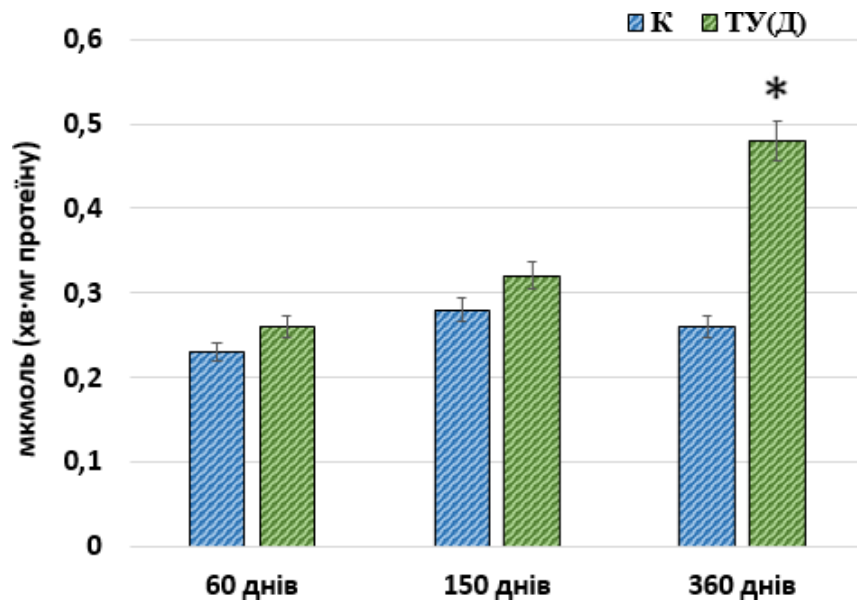


Рис 3.3. Активність цистеїндиоксигенази в цитозольній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження дикватом

ЦДО – фермент, що каталізує перший етап деградації цистеїну, перетворюючи його на цистеїнсульфінат [35]. Зростання активності цистеїндиоксигенази на тлі зниження активності γ -глутамілцистеїнсинтетази (ГЦС) у зрілих щурів за умов токсичного ураження дикватом при одночасному зниженні рівня цистеїну, ймовірно, можна пояснити адаптивними метаболічними перебудовами, спрямованими на підтримку гомеостазу сульфуровмісних амінокислот і детоксикацію організму [19].

Перш за все, зниження активності ГЦС свідчить про обмеження синтезу γ -глутамілцистеїну, а отже, і глутатіону – ключового антиоксиданту, що захищає клітини від оксидативного стресу. В умовах токсичного ураження дикватом і дефіциту цистеїну організм активує альтернативні шляхи метаболізму цистеїну, зокрема підвищує активність цистеїндиоксигенази – ферменту, який каталізує окиснення цистеїну до таурину і сульфату [1].

Це підвищення активності цистеїндиоксигенази може бути компенсаторною реакцією, що сприяє ефективнішому виведенню надлишкових або токсичних продуктів метаболізму цистеїну, а також регуляції рівня сульфуровмісних сполук у печінці [3]. Паралельно це може

бути механізмом, який обмежує накопичення надмірно токсичних проміжних метаболітів, що утворюються внаслідок порушення синтезу глутатіону через зниження активності ГЦС [14].

Отже, за умов токсичного ураження дикватом у цитозольній фракції печінки різновікових щурів активність цистеїндіоксигенази зростає лише у тварин зрілого (360-денного віку), що може бути компенсаторним механізмом, спрямованим на посилення катаболізму цистеїну та детоксикацію продуктів його окислення [26].

Таким чином, підвищення активності цистеїндіоксигенази при одночасному зниженні активності ГЦС і рівня цистеїну відображає складну адаптивну відповідь печінки на токсичний вплив диквату. Ця відповідь спрямована на підтримання метаболічного балансу сульфуровмісних амінокислот і мінімізацію токсичного навантаження в умовах порушеного антиоксидантного захисту [31].

ВИСНОВКИ

1. За умов токсичного ураження дикватом – ксенобіотиком промислового походження – в цитозольній фракції печінки спостерігається зниження активності γ -глутамілцистеїнсинтетази на тлі зменшення вмісту цистеїну в щурів репродуктивного (150 днів) та зрілого (360 днів) віку.

2. Токсичне ураження дикватом призводить до активації цистеїндиоксигенази у цитозольній фракції печінки тварин лише зрілого віку (360 днів), що може бути спрямованим на посилення катаболізму цистеїну з утворенням таурину та сульфатів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Banerjee R. Catalytic promiscuity and heme-dependent redox regulation of H₂S synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2017. V. 37. P. 115–121.
2. C. E. Hughes et al. Cysteine Toxicity Drives Age-Related Mitochondrial Decline by Altering Iron Homeostasis . *Cell*. 2020. V. 180, no. 2. P. 296–310.e18.
3. C. Hine et al. Endogenous Hydrogen Sulfide Production Is Essential for Dietary Restriction Benefits. *Cell*. 2015. V. 160, no. 1-2. P. 132–144.
4. C. L. Quinlan et al. Targeting S-adenosylmethionine biosynthesis with a novel allosteric inhibitor of Mat2A. *Nature Chemical Biology*. 2017. V. 13, no. 7. P. 785–792.
5. Chai Y.-C., Mieczal J. J. Glutathione and Glutaredoxin—Key Players in Cellular Redox Homeostasis and Signaling. *Antioxidants*. 2023. V. 12, no. 8. P. 1553
6. Choi S. E., Park Y. S., Koh H. C. NF- κ B/p53-activated inflammatory response involves in diquat-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Environmental Toxicology*. 2018. T. 33, № 10. C. 1005–1018.
7. D. W. Bak et al. Cysteine reactivity across the subcellular universe. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2019. V. 48. P. 96–105.
8. E. Dongó et al. The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide*. 2018. V. 81. P. 75–87.
9. G. Ma et al. Cysteine dioxygenase 1 attenuates the proliferation via inducing oxidative stress and integrated stress response in gastric cancer cells. *Cell Death Discovery*. 2022. V. 8, no. 1.
10. G. Yu et al. Acute diquat poisoning resulting in toxic encephalopathy: a report of three cases. *Clinical Toxicology*. 2022. V. 60, no. 5. P. 647–650.
11. G. Z. Fortenberry et al. Magnitude and characteristics of acute paraquat- and diquat-related illnesses in the US: 1998–2013. *Environmental Research*. 2016. V. 146. P. 191–199.

12. Huang G.-T., Yu J.-S. K. Enzyme Catalysis that Paves the Way for S-Sulfhydration via Sulfur Atom Transfer. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2016. V. 120, no. 20. P. 4608–4615.
13. Ikeda Y., Fujii J. The Emerging Roles of γ -Glutamyl Peptides Produced by γ -Glutamyltransferase and the Glutathione Synthesis System. *Cells*. 2023. T. 12, № 24. C. 2831.
14. J. Chen et al. Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021. V. 8.
15. J. K. M. Lim et al. Cystine/glutamate antiporter xCT (SLC7A11) facilitates oncogenic RAS transformation by preserving intracellular redox balance *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. V. 116, no. 19. P. 9433–9442.
16. J. Xing et al. Lethal diquat poisoning manifesting as central pontine myelinolysis and acute kidney injury: A case report and literature review. *Journal of International Medical Research*. 2020. V. 48, no. 7.
17. J.-Q. Zhang et al. Chronic Exposure to Diquat Causes Reproductive Toxicity in Female Mice *Plos one*. 2016. V. 11, no. 1. P. e0147075.
18. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett*. 1990 Jul. V. 268, no. 1. P. 69–71.
19. K. Warnhoff et al. Hypoxia-inducible factor induces cysteine dioxygenase and promotes cysteine homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *eLife*. 2024. V. 12.
20. Kidney and lung injury in rats following acute diquat exposure Y. Wu et al. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022. V. 23, no. 4.
21. Kohl J. B., Mellis A.-T., Schwarz G. Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism. *British Journal of Pharmacology*. 2018. V. 176, no. 4.

22. Kopylchuk H. P., Mykolaichuk I. M. Basic components of glutathion system in rat erythrocytes under conditions of toxic damage on the background of an alimantal protein lack (2020). T.12, №1.
23. Kruger W. D. Cystathionine β -synthase deficiency: Of mice and men. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017. T. 121, № 3. C. 199–205.
24. Laplante M., Sabatini D. M. (2014). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293. V. 149, no. 2. P. 274–293.
25. M. Chen et al. Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1): Its functional role in physiological and pathophysiological processes. *Genes & Diseases*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.12.023>
26. Magalhães N., Carvalho F., Dinis-Oliveira R. Human and experimental toxicology of diquat poisoning: Toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment. *Human & Experimental Toxicology*. 2018. V. 37, no. 11. P. 1131–1160.
27. Mammalian CSAD and GADL1 have distinct biochemical properties and patterns of brain expression I. Winge et al. *Neurochemistry International*. 2015. V. 90. P. 173–184.
28. Ostapchenko L. I., Kompanets I. V., Skopenko O. V. et al. (2018). *Biochemistry: Textbook*. Taras Shevchenko National University of Kyiv Publishing House. V. 75, no. 1. P. 59–63.
29. Paul B. D., Sbodio J. I., Snyder S. H. Cysteine Metabolism in Neuronal Redox Homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2018. V. 39, no. 5. P. 513–524
30. Poltorack C. D., Dixon S. J. Understanding the role of cysteine in ferroptosis: progress & paradoxes. *The FEBS Journal*. 2021. URL: <https://doi.org/10.1111/febs.15842>.
31. Ren Y., Guo F., Wang L. Imaging Findings and Toxicological Mechanisms of Nervous System Injury Caused by Diquat. *Molecular Neurobiology*. 2024.

32. S. Cao et al. Diquat-induced oxidative stress increases intestinal permeability, impairs mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets¹. *Journal of Animal Science*. 2018. V. 96, no. 5. P. 1795–1805.
33. S. Cao et al. Resveratrol improves intestinal barrier function, alleviates mitochondrial dysfunction and induces mitophagy in diquat challenged piglets¹. *Food & Function*. 2019. V. 10, no. 1. P. 344–354.
34. S. Hao et al. Cysteine Dioxygenase 1 Mediates Erastin-Induced Ferroptosis in Human Gastric Cancer Cells. *Neoplasia*. 2017. V. 19, no. 12. P. 1022–1032.
35. Stipanuk M. H. Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids: How the Body Copes with Excess Methionine, Cysteine, and Sulfide. *The Journal of Nutrition*. 2020. V. 150, Supplement_1. P. 2494S–2505S
36. Wang P., Lin L.-Y., Lu Y.-Q. Mid-to-late stage diquat accumulation in the central nervous system: A severe case of oral poisoning. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2023.10.005>
37. X. Wu et al. New insights into the role of spermine in enhancing the antioxidant capacity of rat spleen and liver under oxidative stress. *Animal Nutrition*. 2017. V. 3, no. 1. P. 85–90.
38. Y. P. Kang et al. Cysteine dioxygenase 1 is a metabolic liability for non-small cell lung cancer. *eLife*. 2019. V. 8.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпеки у надзвичайних ситуаціях

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватися наступних заходів безпеки:

- ✓ забороняється заходити в лабораторію в верхньому одязі
- ✓ працювати в біохімічній лабораторії можна тільки в спеціальному халаті, оскільки ймовірна можливість забруднення, псування одягу при потрапляння їдких реактивів.

Правила роботи з реактивами

- ✓ концентровані кислоти та луги повинні знаходитись під витяжною шафою;
- ✓ усі дослідження з отруйними речовинами та речовинами з їдким запахом проводити тільки під витяжною шафою;
- ✓ наливати або насипати реактиви слід тільки над столом ;
- ✓ не слід залишати відкритими банки з реактивами;
- ✓ пролиті або розсипані реактиви потрібно негайно видалити зі столу, витерти стіл ганчіркою та промити водою;
- ✓ пролиті концентровані кислоти необхідно засипати піском, потім зібрати пісок лопаткою. Дане місце необхідно промити розчином соди та витерти ганчіркою;
- ✓ під час роботи з органічними розчинниками (спирти, ефіри, ацетон, бензол тощо) не можна визначати речовину за запахом, щоб уникнути отруєнням їх парами;
- ✓ наповнення піпеток розчинами органічних розчинників, кислот, лугів проводять тільки за допомогою груші;
- ✓ уважно стежити за тим, щоб реактиви (особливо кислоти і луги) не потрапляли на обличчя, руки та одяг;
- ✓ не ходити по лабораторії з концентрованими кислотами, а наливати їх тільки в певному, відведеному для цього місці;

- ✓ не забруднювати реактиви під час роботи: не плутати пробки від склянок, які містять різні реактиви; надлишок взятого реактиву не виливати назад у посуд; набирати кожен реактив тільки призначеною для нього піпеткою і в жодному разі не плутати їх;
- ✓ у випадку потрапляння на шкіру концентрованої кислоти, уражене місце необхідно промити великою кількістю води, а потім розведеним розчином соди;
- ✓ при потраплянні розчинів лугів на шкіру уражене місце потрібно обробити спочатку розведеною кислотою, а потім водою.

Правила роботи з нагрівальними приладами

- ✓ перд тим як запалити спиртівку – переконатися, що поблизу немає легкозаймистих рідин (спирт, ефір тощо);
- ✓ запалювати спиртівку можна тільки сірником;
- ✓ у пробірці можна нагрівати лише невелику кількість розчину, рідина повинна займати не більше 1/3 об'єму пробірки;
- ✓ пробірку при нагріванні необхідно направляти в сторону від себе і людей, які знаходяться поруч;
- ✓ не можна нахилитися над спиртівкою: спочатку пробірку з розчином потрібно прогріти всю, а потім нагрівати в потрібному місці, не виймаючи з полум'я спиртівки;
- ✓ не можна нагрівати пробку довго в одному місці, оскільки рідина швидко закипить і вихлюпнеться із пробірки;
- ✓ нагрівати пробірку потрібно нижче рівня рідини в ній;
- ✓ при нагріванні рідини не можна торкатися колбою палаючого гніту, завжди дотримуватися правил безпеки при нагріванні, не допускати випліскування рідин (час від часу відводити пробірку від полум'я, не нагрівати її у вертикальному положенні);
- ✓ після нагрівання слід відразу загасити спиртівку, накривши полум'я ковпачком;
- ✓ робота з водяною банею здійснюється тільки під тягою;

- ✓ при опіках на обпечене місце потрібно покласти вату, змочену розчином перманганату калію.

Правила роботи з лабораторним обладнанням

Центрифуги

- ✓ перед центрифугуванням центрифужні пробірки врівноважують та розміщують у центрифугі симетрично;
- ✓ центрифужна камера повинна бути закрита кришкою
- ✓ під час роботи центрифуги забороняється відкривати кришку камери;
- ✓ після відключення центрифуги необхідно дати можливість ротору зупинитися, забороняється гальмувати ротор рукою.

Автоматичні піпетки

- ✓ тримаючи піпетку у вертикальному положенні натиснути кнопку до першого упору (фаза А);
- ✓ занурити наконечник в рідину на глибину 3 до 5 мм (фаза С);
- ✓ доторкнутися наконечником до внутрішньої стінки посудини і спорожнити наконечник, плавно натискаючи на кнопку до першого упору з такою ж швидкістю як при взятті проби (фаза Д);
- ✓ почекати близько 1 секунди, натискаючи кнопку піпетки до другого упору, видалити залишки рідини і вийняти піпетку, ковзаючи наконечником по внутрішній стінці посудини (фаза Е);
- ✓ після зняття наконечника піпетка готова до повторення циклу роботи;
- ✓ забороняється набирати рідину піпеткою без наконечника;
- ✓ під час роботи з рідиною, що має температуру, відмінну від температури навколишнього середовища більше 5°C рекомендується багаторазово прополоскати наконечники;
- ✓ після закінчення роботи слід помістити піпетку в штативі.