

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

АКТИВНІСТЬ СИСТЕМИ ТІОРЕДОКСИНУ В ПЕЧІНЦІ
ЩУРІВ ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ПРОТЕЇНУ ТА ГОСТРОГО
ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ

Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:
студентка 6 курсу, 611 М групи
Броневиц Христина Василівна
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 активності системи тіоредоксину в печінці щурів за умов дефіциту харчового протеїну та гострого токсичного ураження ацетамінофеном. У роботі оцінено активність тіоредоксину, тіоредоксинредуктази, вміст відновленого глутатіону, рівень цистеїну та цистину в цитозольній фракції клітин печінки протеїнодефіцитних щурів, тварин із ацетамінофен-індукованим ураження та за поєднаної дії двох чинників.

Встановлено, що за умов ацетамінофен-індукованої гепатотоксичності в клітинах печінки щурів відбувається зниження активності тіоредоксину на тлі активації тіоредоксинредуктази, що вірогідно, спрямовано на підтримання внутрішньоклітинних резервів відновленого Tgх шляхом регенерації його окисленої форми.

Токсичне ураження ацетамінофеном можна розглядати як ключовий чинник зниження вмісту відновленого глутатіону в цитозольній фракції печінки щурів із одночасним зменшенням рівня амінокислоти цистеїну на тлі зростання кількості продукту його окисної димеризації – цистину.

Ключові слова: тіоредоксин, тіоредоксинредуктаза, глутатіон, цистеїн, цистин, аліментарна депривація протеїну, ацетамінофен, печінка

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study of the activity of the thioredoxin system in the liver of rats under conditions of dietary protein deficiency and acute toxic damage by acetaminophen. The work assessed the activity of thioredoxin, thioredoxin reductase, the content of reduced glutathione, the level of cysteine and cystine in the cytosolic fraction of liver cells of protein-deficient rats, animals with acetaminophen-induced damage and under the combined action of two factors.

It was established that under conditions of acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat liver cells there is a decrease in thioredoxin activity against the background of activation of thioredoxin reductase, which is likely aimed at maintaining intracellular reserves of reduced Trx by regenerating its oxidized form.

Toxic damage by acetaminophen can be considered as a key factor in the decrease in the content of reduced glutathione in the cytosolic fraction of rat liver with a simultaneous decrease in the level of the amino acid cysteine against the background of an increase in the amount of its oxidative dimerization product - cystine.

Key words: *thioredoxin, thioredoxin reductase, glutathione, cysteine, cystine, dietary protein deprivation, acetaminophen, liver*

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

_____ **Х.В. Броневи́ч**
(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Білково-енергетична недостатність при захворюваннях печінки.....	7
1.2. Механізми гепатотоксичності ацетамінофену.....	11
1.2.1. Участь NARQI у некрозі гепатоцитів шляхом модуляції мітохондріального окисного/нітрозативного стресу.....	13
1.2.2. Наслідки мітохондріального окисного/нітрозативного стресу.....	16
1.2.3. Роль активації шляху JNK за умов токсичного ураження.....	17
1.3. Система тіоредоксину.....	18
1.3.1. Ізоформи Trx1 і Trx2: структура та функції.....	20
1.3.2. Ізоформи тіоредоксинредуктази.....	22
1.3.3. Позаклітинний Trx/TrxR.....	23
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	25
2.1. Об'єкти та методи досліджень.....	25
2.2. Отримання цитозольної (посмікросомальної) фракції печінки.....	27
2.3. Визначення активності тіоредоксину.....	27
2.4. Визначення активності тіоредоксинредуктази.....	28
2.5. Оцінка вмісту цистеїну та цистину.....	28
2.6. Визначення вмісту відновленого глутатіону.....	29
2.7. Статистична обробка результатів.....	30
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	31
ВИСНОВКИ.....	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	43
ДОДАТКИ.....	52

ВСТУП

Нині гострі чи хронічні захворювання печінки становлять все більшу загрозу розвитку печінкової недостатності в усьому світі. Білково-енергетична недостатність (БЕН) вважається серйозним ускладненням патологій печінки та пов'язана зі значно гіршими наслідками. БЕН часто недостатньо діагностується і виникає – залежно від використовуваних методів скринінгу – в 5–92 % хворих. Знижене споживання енергії та протеїну, запалення, мальабсорбція, зміна метаболізму нутрієнтів, гіперметаболізм, гормональні порушення та дисбактеріоз мікробіому кишечника можуть сприяти порушенню функціонального стану печінки [1].

Для людей похилого віку, особливо тих, хто старше 65 років, дедалі більшою проблемою стає недоїдання. Люди з недоїданням часто страждають від м'язової слабкості, зміненої імунної функції, зниження функціональності та підвищеного ризику інфікування, що може призвести до підвищеного ризику смертності. Зокрема, білково-енергетична недостатність, що виникає внаслідок зменшення споживання білка та енергії, пов'язана з низкою наслідків для функціонального стану організму та виникненням захворювань [2].

Ацетамінофен (парацетамол, N-ацетил-р-амінофенол) є найпопулярнішим безрецептурним/жарознижуючим засобом у світі. Парацетамол вважався більш безпечним препаратом порівняно з нестероїдними протизапальними препаратами, особливо з точки зору нижчого ризику ниркової дисфункції, шлунково-кишкового ушкодження та індукції астми/бронхоспазму, навіть у пацієнтів з високим ризиком, таких як люди похилого віку, діти, та вагітні жінки. З іншого боку, нещодавнє збільшення використання ацетамінофену викликало занепокоєння щодо його токсичності [3].

Гепатотоксичність парацетамолу є найчастішою причиною медикаментозної гострої печінкової недостатності. Однак його точний механізм залишається незрозумілим, і не розроблено ефективного лікування,

окрім N-ацетилцистеїну. Недавні дослідження на тваринах і клітинах продемонстрували, що деякі клітинні події, такі як активація шляху *c-jun* N-кінцевої кінази (JNK), стрес ендоплазматичного ретикулуму і мітохондріальний окислювальний стрес можуть відігравати важливу роль у розвитку медикаментозних гепатопатологій. Декілька досліджень описували популяції, чутливі до ацетамінофен-індукованого пошкодження печінки, в основному в печінці зі стеатозом. Таким чином, потрібно враховувати наявність ожиріння та інших хронічних захворювань печінки, таких як неалкогольна жирова хвороба печінки, коли призначають лікування парацетамолом. Пошкодження печінки цим препаратом генерується через його метаболіт N-ацетил-р-бензохінонімін, який детоксикується відновленим глутатіоном (GSH). Попереднє виснаження GSH у стеатотичних гепатоцитах відіграє ключову роль у гепатотоксичності, спричиненій ацетамінофеном [4].

Редокс-залежні білки відіграють значну роль у підтримці редокс-гомеостазу та редокс-залежної регуляції клітинних процесів, включаючи проліферацію/диференціацію та апоптоз [5]. В антиоксидантній системі захисту клітини, поряд з ключовими антиоксидантними ферментами, важливу роль відіграє тіоредоксин (Trx)-залежна система, яка бере участь у процесах клітинної редокс-залежної регуляції через контроль тіол-дисульфідного обміну [6]. Поєднання антиоксидантних властивостей і здатності активувати транскрипцію генів, у тому числі деяких антиоксидантних ферментів, а також пригнічувати редокс-залежні шляхи активації апоптозу вказує на важливий внесок цієї системи в систему антиоксидантного захисту, що підвищує стійкість клітин до окисного стресу/

Мета роботи – дослідити стан системи тіоредоксину в печінці щурів за умов аліментарної депривації протеїну та токсичного ураження ацетамінофеном.

РОЗДІЛ I

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Білково-енергетична недостатність при захворюваннях печінки

Етіологія білково-енергетичної недостатності (гіпотрофії) при патологічних станах печінки досить багатофакторна. Наприклад, у хворих із цирозом печінки зниження споживання енергії та білка є найпоширенішою причиною недоїдання. Відсоток пацієнтів з неадекватним споживанням енергії коливається від 9,2% до 100% у різних дослідженнях, залежно від методу оцінки та популяції. Споживання енергії зменшується на 13–34%, що свідчить про великі відмінності в різних дослідженнях. Відомо декілька механізмів як причини зниження споживання енергії та білка. Порушення моторики та розслаблення шлунка через портальну гіпертензію призводить до зниження споживання їжі. Наявність асцити може зменшити споживання їжі через раннє відчуття ситості. Зниження нюху та/або дисгевзії, які можуть бути викликані дефіцитом мікроелементів, також можуть бути причиною зниження споживання. Крім того, рекомендовані дієтичні обмеження, такі як дієта з низьким вмістом солі, обговорюються як можливі фактори неадекватного споживання їжі [7].

Цікаво, що при цирозі спостерігали високі рівні греліну. Грелін є єдиним відомим орексигенним гормоном периферичного походження, який зазвичай підвищує апетит і споживання їжі. Однак, незважаючи на високі рівні греліну, у пацієнтів з патологією печінки апетит не підвищується. Тому високий рівень греліну можна розглядати як неефективний компенсаторний механізм при цирозі [8]. На сьогоднішній день невідомо, який із цих факторів відіграє найважливішу роль. Таким чином, під час оцінки споживання їжі при захворюваннях печінки слід враховувати всі фактори як індивідуальний підхід для виявлення та адекватного лікування найбільш імовірних причин зниження споживання їжі.

При патологічних станах печінки зазвичай спостерігається порушення всмоктування ліпідів. Зміни метаболізму жовчних кислот, що впливають на

утворення міцел, необхідних для перетравлення жирів та всмоктування жиророзчинних вітамінів, а також надмірний ріст бактерій у тонкому кишечнику можуть призвести до порушення всмоктування через декон'югацію жовчних кислот [9].

На додаток до зміни всмоктування, також змінюється метаболізм жирів, білків і вуглеводів, механізми яких відрізняються залежно від етіології. Було проведено багато досліджень для з'ясування механізмів. Наприклад, хронічне вживання алкоголю змінює метаболізм ліпідів, стимулюючи ліпогенез, зменшуючи експорт ліпопротеїнів дуже низької щільності, активуючи *de novo* ліпогенез і пригнічуючи окислення жирних кислот, що також сприяє алкогольній жировій хворобі печінки. Споживання алкоголю також погіршує катаболізм жирних кислот переважно через інгібування мітохондріального β -окислення, яке є найбільш значним внеском у накопичення триацилгліцеролів у печінці [10]. Також при неалкогольній жировій хворобі печінки змінюється метаболізм жирової тканини та триацилгліцеролів у печінці [11].

Білковий обмін порушується через посилення катаболізму протеїнів та зниження їх синтезу. Крім того, при захворюваннях печінки спостерігається зниження концентрації амінокислот з розгалуженим ланцюгом у сироватці крові та підвищення рівня ароматичних амінокислот, які відіграють роль у патогенезі печінкової енцефалопатії та виснаження м'язів [12].

Метаболізм глюкози також серйозно змінюється: описано периферичну резистентність до інсуліну, але нормальне або посилене поглинання в печінці, а також зміни гліколітичних ферментів і зміни транспортерів глюкози та інсуліну. Це сприяє зниженню виробництва глюкози в печінці та зниженню запасів глікогену в печінці, що пов'язано зі збільшенням глюконеогенезу з амінокислот і вторинного розпаду білка. Вищеописані метаболічні відхилення у вуглеводному обміні також призводять до стану прискореного голодування вже після нічного сну [13].

Дефіцит мікроелементів, мінералів і вітамінів є поширеним явищем через порушення всмоктування жирів, застосування діуретиків і недостатнє споживання. Крім того, сама дисфункція печінки може призвести до змін метаболізму мікроелементів. Цинк, селен, залізо та магній зазвичай знижуються при атологіях печінки [14], тоді як мідь і марганець можуть бути збільшені [15].

Дефіцит жиророзчинних вітамінів є поширеним явищем при захворюваннях печінки, що, в свою чергу, може погіршити засвоєння інших нутрієнтів, таких як протеїни та ліпіди. Для поглинання жиророзчинних вітамінів необхідні жовчеві кислоти для утворення міцел, які поглинаються ентероцитами в кровообіг. Якщо є неадекватна доставка жовчних кислот, як це часто спостерігається у пацієнтів із патологіями печінки, це може призвести до дефіциту жиророзчинних вітамінів, особливо у пацієнтів з жовтяницею [16].

Дефіцит мікроелементів і вітамінів може, у свою чергу, негативно вплинути на споживання їжі, вказуючи на порочне коло недоїдання: дефіцит цинку і вітаміну А може погіршити смак і нюх і, отже, погіршити споживання їжі. Дефіцит вітаміну D має прогностичне значення, оскільки він пов'язаний із поганим результатом, підвищеною смертністю та вищим рівнем ускладнень, однак поки що незрозуміло, чи є рівні вітаміну D просто замінником прогресуючого захворювання печінки чи існує прямий патофізіологічний зв'язок [17]. Водорозчинні вітаміни, особливо вітаміни С, В₁, В₂, В₆ і фолієва кислота, знижуються, тоді як рівень вітаміну В₁₂ може бути хибно підвищений при захворюваннях печінки, можливо, через вплив вітаміну В₁₂ з пошкоджених клітин печінки в кровоплин [18].

Не тільки поглинання та метаболізм змінюються, але й витрати енергії сприяють білково-енергетичній недостатності: 15–30% пацієнтів із захворюваннями печінки мають гіперметаболізм із витратами енергії у стані спокою >120%, що негативно впливає на стан харчування. Гіперметаболізм погіршує загальну виживаність без трансплантації та ранню

посттрансплантаційну. Причина гіперметаболізму при захворюваннях печінки ще до кінця не з'ясована.

З літератури [19] відомо, що під час ревматоїдних захворювань запалення сприяє гіперметаболізму. Підвищені рівні інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-6 і трансформуючого фактора росту також часто зустрічаються при хронічних захворюваннях печінки. Таким чином, запалення можна розглядати як фактор, що сприяє гіперметаболізму та БЕН поряд із підвищеною бета-адренергічною активністю. Крім того, підвищений рівень прозапальних цитокінів може бути безпосередньо відповідальним за зниження апетиту. Оскільки запалення при захворюваннях печінки тісно пов'язане зі змінами в системі кишківник–печінка [20], зв'язок із гіперметаболізмом потребує подальших досліджень для з'ясування патофізіології та визначення можливих терапевтичних заходів.

Гормони, як вищий контроль за споживанням їжі та метаболізмом, також впливають на харчування при захворюваннях печінки. Крім того, грелін має широкий спектр інших метаболічних функцій у метаболізмі глюкози та контролі ваги, а посттрансляційна модифікація є важливою для здійснення його метаболічної функції. Різні ролі греліну в захворюваннях печінки нещодавно були детально розглянуті. Відомо, що грелін, а також лептин впливають на витрати енергії. Лептин, який допомагає регулювати енергетичний баланс, циркулює у вільному та зв'язаному вигляді. Базальні концентрації лептину вищі у хворих із цирозом печінки і можуть призвести до неадекватних витрат енергії [21].

Гіперінсулінемія та резистентність до інсуліну також часто зустрічаються при захворюваннях печінки; підвищений рівень інсуліну викликає насичення, що призводить до зменшення споживання енергії. Тестостерон знижується приблизно у 90 % чоловіків з цирозом печінки і відіграє важливу роль у синтезі та розпаді білка [22].

Змінений харчовий статус пов'язаний з виразним дисбактеріозом кишкового мікробіому при захворюваннях печінки. Мікробіом кишечника є

перетворювачем сигналу зі здатністю синтезувати або модифікувати сигнальні молекули поживних речовин, такі як коротколанцюгові жирні кислоти і амінокислоти з розгалуженим ланцюгом. Відомо, що кілька родів бактерій продукують коротколанцюгові жирні кислоти, такі як *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Succinivibrio* та *Butyricimonas* серед інших. Наприклад, діти, які страждають від недоїдання, показали меншу чисельність різних видів *Bacteroides*, що свідчить про втрату видів, що продукують коротколанцюгові жирні кислоти. При цирозі зменшується кількість видів бактерій, що продукують коротколанцюгові жирні кислоти [23]. Спостережувана зміна складу мікробіома кишечника при цирозі печінки пов'язана з посиленням катаболізму білка, опосередкованого запальними реакціями, що призводить до втрати м'язів [9].

Дисбактеріоз кишкового мікробіому також пов'язаний із збільшенням кишкової проникності та бактеріальною транслокацією, що пов'язано із запаленням і ускладненнями захворювань печінки. На сьогоднішній день невідомо, чи передуює дисбактеріоз кишкового мікробіому розвитку гіпотрофії при патологіях печінки, чи він є наслідком захворювання та медикаментозного лікування захворювання.

1.2. Механізми гепатотоксичності ацетамінофену

Ацетамінофен, також відомий як N-ацетил-p-амінофенол (*N-acetyl-p-aminophenol*, APAP), був схвалений для клінічного застосування Управлінням з контролю за продуктами та ліками США ще в 1950 році та широко використовується для лікування лихоманки та болю. Однак передозування APAP може спричинити печінкову та ниркову токсичність і навіть призвести до смерті. Печінка є основним органом, який метаболізує APAP. Більшість (85%) APAP може безпосередньо поєднуватися з глюкуронідними та сульфатними кофакторами, які виводяться у вигляді жовчі та сечі. Решта фракції (15%) може бути метаболізована ферментною системою цитохрому P450 (CYP450). *In vivo* CYP450 може трансформувати APAP у токсичний N-

ацетил- р -бензохінонімін (NAPQI), який згодом може викликати пошкодження клітин у печінці [24]. За нормальних умов глутатіон (GSH) у тканинах печінки полегшує виділення електрофільного NAPQI шляхом поєднання тіогліколевої кислоти з цистеїном. Добре відомо, що NAPQI може зв'язуватися з ключовими клітинними білками та викликати окислювальний стрес і мітохондріальну дисфункцію. Це може зрештою спричинити загибель клітин печінки в контексті насичення уридиндифосфату (UDP)-глюкуронової кислоти та 3'-фосфаденозин-5'-фосфосульфату та надмірного споживання GSH (більше 1/3 нормального рівня) [25].

Передозування АРАР вважається важливим фактором, який сприяє патогенезу гострої печінкової недостатності (ГПН); зокрема, разова доза понад 125 мг/кг може мати такий ефект. У США та більшості західних країн частка ураження печінки, спричиненого ацетамінофеном, сягає до 46% випадків ГПН. Ризик ацетамінофен-індукованого ураження значно підвищується в осіб з анорексією, тривалим зловживанням алкоголем і фенітоїном натрію. Це явище може бути пов'язане з недостатніми запасами GSH або підвищеною активністю ферментів CYP450, що метаболізують ліки. Близько 10% метаболізму алкоголю здійснюється за допомогою сімейства CYP450. Тому взаємозв'язок між алкоголем і АРАР/NAPQI є складним. *Hodgman* і *Garrard* в 2012 році виявили, що люди, які постійно споживають алкоголь, мають підвищений ризик ацетамінофен-індукованого медикаментозного ураження. Навпаки, гостре вживання алкоголю відіграє захисну роль проти АРАР через конкуренцію алкоголю за CYP450 [26].

Патологічний процес, що лежить в основі ацетамінофен-індукованого медикаментозного ураження, поділяється на три стадії: загибель клітин печінки, стерильне запалення та регенерація й відновлення клітин печінки [27]. Загибель гепатоцитів викликана головним чином порушенням метаболізму в гепатоцитах. Спочатку накопичення білка NAPQI в мітохондріях призводить до безперервного окислювального або нітрозативного стресу та дисфункції з наступним поступовим некрозом

клітин печінки. Згодом некротичні гепатоцити вивільняють певні молекулярні структури (*danger-associated molecular patterns*, DAMP). Потім ці DAMP рекрутують і активують клітини вродженого імунітету, такі як нейтрофіли, макрофаги, природні Т-клітини і природні клітини-кілери, і беруть участь у очищенні некротичної тканини та поширенні запальної реакції. Нарешті, клітини печінки проліферують і регенерують у присутності певних сигнальних медіаторів і непаренхімних клітин печінки [28].

1.2.1. Участь NARQI у некрозі гепатоцитів шляхом модуляції мітохондріального окисного/нітрозативного стресу

У відповідь на дію факторів, що викликають фізичне або хімічне пошкодження, підвищується проникність плазматичних мембран гепатоцитів і мембран органел. Це призводить до вивільнення органел і внутрішньоклітинного вмісту і некрозу гепатоцитів. Вважається, що індукована АРАР-гепатотоксичність призводить головним чином до некрозу гепатоцитів, але дослідження внутрішньоклітинного сигнального механізму, що лежить в основі загибелі клітин, припускають, що можуть бути залучені як апоптоз, так і некроптоз [29]. АРАР-індукований некроз гепатоцитів може збігатися з механізмами апоптозу та некроптозу, але жодні дослідження між поколіннями не підтвердили, що апоптоз чи некроптоз є основною формою загибелі гепатоцитів.

Білкові аддукти NARQI вважаються ознакою некрозу гепатоцитів, а подальша трансдукція сигналу, пов'язана зі смертю клітин, тісно пов'язана з мітохондріями. Білкові аддукти NARQI були вперше виявлені в 1970-х роках, але їх точна функція ще не була чітко визначена. Через двадцять років *Tirmenstein* і *Nelson* вказали, що у мишей, які отримували АРАР, аддукти білка NARQI накопичувалися в мітохондріях гепатоцитів, і це накопичення супроводжувалося окислювальним стресом. Крім того, у цих мишей було помітне пошкодження печінки. Однак ці дані не спостерігалися у мишей, які отримували ізомер АРАР ацетил-*m*-амінофенол. Цей результат

припустив, що аддукти мітохондріальних білків пов'язані з окислювальним стресом і патогенезом ацетамінофен-індукованого ураження. У мишей із медикаментозним ураженням утворення білкових аддуктів NAPQI з'явилося протягом 30 хвилин після введення АРАР і досягло піку приблизно через 2–3 години, тоді як у людей утворення білкових аддуктів NAPQI було відносно сповільненим [30].

Серед великої кількості потенційних патологічних факторів, пов'язаних з токсичним ураженням, білкові аддукти NAPQI можуть викликати мітохондріальний окислювальний/нітрозативний стрес. NAPQI може зв'язуватися з відповідними білками в мітохондріальному дихальному ланцюзі, викликаючи витік електронів з дихального ланцюга до кисню. Це сприяє утворенню супероксидів, які потім індукують окислювальний/нітрозативний стрес. Зазвичай супероксид каталізується до пероксиду водню та кисню за допомогою супероксиддисмутази марганцю або реагує з оксидом азоту (NO) з утворенням пероксинітриту. Перекис водню поглинається антиоксидантними ферментами або безпосередньо реагує з GSH [31].

Коли вміст GSH у мітохондріях знижується, а активність антиоксидантних ферментів пригнічується білковими аддуктами, агреговані активні форми кисню (АФК) поєднуються з NO з утворенням пероксинітриту. Це призводить до утворення білкових аддуктів нітротирозину, що впливає на функцію внутрішньоклітинних білків. Крім того, сильна полярність пероксинітриту також може спричинити пошкодження мітохондріальної ДНК (мтДНК). Крім того, NAPQI може пригнічувати синтез АТФ шляхом зв'язування з α -субодиницею АТФ-синтетази. Це викликає відкриття пор проникності мітохондріальної мембрани, що призводить до зниження потенціалу мітохондріальної мембрани та припинення синтезу енергії через цикл трикарбонових кислот. Крім того, повідомлялося, що NAPQI функціонує як інгібітор GSH-синтази шляхом зв'язування з нею. Це гальмування значно знизило швидкість секреції NAPQI і сприяло

опосередкованому АРАР пошкодженню. Таким чином, у випадках пошкодження вироблення енергії клітинами це може вплинути на потребу в енергії та викликати утворення АФК, клітинний апоптоз і дисбаланс кальцію. На підставі останнього кількісного аналізу білкової мас-спектрометрії NARQI також може утворювати аддукти після зв'язування з чотирма мітохондріальними антиоксидантними білками, що значно знижує здатність мітохондрій протистояти окислювальному стресу [32].

Все більше доказів вказує на тісний зв'язок між стресом ендоплазматичного ретикулуму і АРАР-індукованим ураженням печінки. Стрес ендоплазматичного ретикулуму пов'язаний з опосередкованим NARQI пошкодженням процесу згортання білка та окисно-відновного середовища. Узі та ін. в 2013 році повідомили, що NARQI та розгорнуті білки в ендоплазматичному ретикулумі піддаються реакції додавання Майкла. Перевантаження NARQI індукує стрес ендоплазматичного ретикулуму і стимулює експресію ССААТ/гомологічного білка, який сприяє експресії генів апоптозу та пригнічує регенерацію печінки. Крім того, синтез білка включає належне окисно-відновне середовище та гомеостаз GSH. Після споживання GSH під час стресу ендоплазматичного ретикулуму спостерігалось фосфорилування α -субодиниці фактора ініціації еукаріот 2 (eIF2 α) та активація активуючого фактора транскрипції 6 (ATF6). Торрес та ін. [33] вказали, що вальпроєва кислота може підвищувати чутливість до АРАР-опосередкованого ураження печінки у мишей. Патогенез корелює з тим фактом, що стрес ендоплазматичного ретикулуму посилює експресію гострих регуляторних білків, що виробляються стероїдами, і сприяє поєднанню пов'язаної з гомологією SH3-зв'язувальної брунтонтирозинкінази (Sab) і фосфорильованої c-Jun N-кінцевої кінази (p-JNK). Зокрема, окислювальний/нітративний стрес сприяє стресу ендоплазматичного ретикулуму, але це не вирішальний фактор, оскільки зв'язування NARQI і незрілого білка в ЕР викликає стрес ендоплазматичного ретикулуму.

1.2.2. Наслідки мітохондріального окисного/нітрозативного стресу

Мітохондріальний окисний/нітрозативний стрес і дисфункція викликають відкриття пор проникності мітохондріальної мембрани, що сприяє пошкодженню та некрозу клітин печінки. Пори, розташовані у внутрішній мітохондріальній мембрані, негайно відкриваються, коли специфічний залишок цистеїну циклофіліну D атакується АФК. У мишей, які отримували низькі дози АРАР (150 мг/кг), спостерігалася тимчасова активація JNK і оборотне відкриття пор мітохондріальної мембрани. Навпаки, у присутності високої дози АРАР (300 мг/кг) спостерігалася незворотне відкриття пор і гепатоцелюлярна смерть. Усі ці результати підтверджують, що безперервний мітохондріальний окисний/нітрозативний стрес є рушійною силою, яка відкриває пори мітохондріальної мембрани. Після відкриття пор зовнішня мітохондріальна мембрана розривається, викликаючи вивільнення багатьох молекул з молекулярною масою менше 1,5 кДа з мітохондріальних розчинених речовин у матрикс. Витік мітохондріальних білків, таких як фактор, що індукує апоптоз (AIF), цитохром *c* і ендонуклеаза G, впливає на функцію мітохондрій і індукує фрагментацію ДНК, впливаючи на мітохондрії та ядра. Це узгоджується з вимогою трансплантації печінки для пацієнтів з важким гепатитом, який спричинений головним чином необоротним некрозом гепатоцитів [34].

У матриксі гепатоцитів з великою кількістю білкових аддуктів NARQI спостерігаються пошкоджені мітохондрії та АФК, після чого в гепатоцитах активується реакція самозахисту. Утворені лізосоми викликають деградацію аномальних матричних білків і органел. Цей процес називається аутофагією гепатоцитів. Аутофагічну реакцію вважають захисним механізмом гепатоцитів. Ні та ін. в 2012 році вперше повідомили про захисні ефекти аутофагії гепатоцитів у мишей з ацетамінофен-індукованим ураженням та культивували первинні гепатоцити шляхом додавання антагоністів та активаторів аутофагії. Згодом специфічний кліренс аутофагічної здатності

гепатоцитів сприяв утворенню АФК та активації JNK у моделі миші. Ці результати підтверджують захисну роль аутофагії при медикаментозному ураженні печінки ацетамінофеном. Було визнано, що аутофагія гепатоцитів бере участь у кліренсі аномальних білкових аддуктів і мітохондрій, а також у зниженні мітохондріального стресу та стресу ЕР шляхом регулювання переходу ЕР [35].

1.2.3. Роль активації шляху JNK за умов токсичного ураження

Як зазначено вище, утворення мітохондріальних білкових аддуктів NAPQI тісно пов'язане з мітохондріальним окисним стресом і дисфункцією. У порівнянні з потужною антиоксидантною системою всередині мітохондрій, ці зміни мінімальні та короточасні. Таким чином, деякі інші потенційні механізми можуть брати участь у стійкій активації окисного стресу. *Lemasters* (1998) запропонував теорію «подвійного удару» про розлади, пов'язані з пошкодженням мітохондрій за умов ацетамінофен-індукованого ураження. Перше попадання стосувалося виснаження мітохондріального GSH NAPQI, а друге попадання стосувалося активації опосередкованого АФК сигнального шляху JNK [36].

Активация JNK безперервно посилює мітохондріальний окислювальний стрес і формує замкнутий цикл активації. Першою цікавою молекулою є кіназа-1, що регулює передачу сигналів апоптозу (ASK-1), та регулює в основному пізню активацію JNK. У цитоплазмі ASK-1 може з'єднуватися з тіоредоксином, утворюючи неактивний комплекс у нестресових умовах. Після окислювального стресу в мітохондріях відбувається тривале вивільнення мітохондріальних АФК у цитоплазму з подальшою дисоціацією та активацією ASK-1. Активована ASK-1 фосфорилує мітоген-активовану протеїнкіназу кіназу 4/7 (MKK4/7), а потім запускає активацію JNK. Нещодавно були проведені численні дослідження для вивчення кінази-3 змішаної лінії (MLK-3). Було визнано, що MLK-3 бере участь у ранній активації JNK. Крім того, на ранній стадії мітохондріального окисного стресу

цитоплазматичні АФК викликають фосфорилування глікогенсинтази кінази-3 β (GSK-3 β), яка, у свою чергу, активує MLK-3 та JNK [37].

Sun та ін. (2018) ідентифікували *unc-51*-подібну кіназу 1/2 (ULK1/2) як третю кіназу, яка бере участь у патогенезі ацетамінофен-індукованого ураження шляхом фосфорилування MAPK4/7 та JNK. Подальші процеси включають фосфорилування JNK і його швидку транслокацію в мітохондрії, де він зв'язується з білком Sab на зовнішній мембрані мітохондрій. Нарешті, ці явища призводять до дисфункції мітохондрій і вивільнення АФК. Повідомлялося, що миші-самки з низькою концентрацією білка Sab більш стійкі до ацетамінофен-індукованого ураження, ніж щури. Патологічні зміни призводять до активації сигнального шляху JNK, що призводить до генерації АФК. Потім АФК діють на сигнальний шлях JNK, вказуючи на те, що сигнальні шляхи АФК і JNK можуть утворювати замкнутий цикл [38].

Білок p53 є білком-супресором пухлин, який може активуватися у відповідь на помірну стимуляцію клітин. Він бере участь у регулюванні гліколізу та окисного фосфорилування, обмежує виробництво АФК і сприяє виживанню клітин і відновленню генетичних пошкоджень. Не дивно, що p53, як повідомлялося, блокує шлях передачі сигналів JNK під час АРАР-індукованого ураження. Хуо та ін. в 2017 році виявили, що білок p53 може захищати клітини від АРАР-індукованої токсичності печінки шляхом пригнічення активації JNK. Крім того, він бере участь у підтримці метаболічного гомеостазу та активує сигнали проліферації клітин для сприяння регенерації клітин печінки [39].

1.3. Особливості функціонування системи тіоредоксину

Система тіоредоксину (Trx) робить важливий внесок у клітинний окисно-відновний баланс і регулює клітинний ріст, апоптоз, експресію генів і антиоксидантний захист майже у всіх живих клітинах. Trx-залежна система включає дисульфідредуктазу Trx і тіоредоксинредуктазу (TrxR), яка використовує NADPH(H⁺) як косубстрат. Trx необхідний для відновлення

дисульфідів, зокрема окисленої форми пероксиредоксинів, які каталізують відновлення H_2O_2 до води та підсилюють механізм контролю рівня клітинних активних форм кисню. Внаслідок відновлення окисленого субстрату за участю Cys32 і Cys35 в активному центрі дитіолової форми Trx утворюється його окислена форма, відновлення якої здійснюється TrxR, що також створює самостійний внесок в антиоксидантний потенціал клітини шляхом відновлення гідропероксидів ліпідів [40].

Система Trx забезпечує електронами тіолзалежні пероксидази (пероксиредоксини) для видалення активних форм кисню та азоту з високою швидкістю реакції. Антиоксидантні функції Trx також проявляються шляхом участі в репарації ДНК і білка шляхом зниження рівня рибонуклеотидредуктази, метіонінсульфоксидредуктази та регулювання активності багатьох факторів транскрипції, чутливих до редоксу. Крім того, системи Trx відіграють важливу роль в імунній відповіді, вірусній інфекції та смерті клітин через взаємодію з білком, що взаємодіє з тіоредоксином. У клітинах ссавців цитозольна та мітохондріальна системи Trx, у яких TrxR є високомолекулярними селеноферментами, разом із системою глутатіон-глутаредоксин (Grx) (NADPH, глутатіонредуктаза, GSH і Grx) контролюють клітинне окисно-відновне середовище. Нещодавно було виявлено, що системи тіоредоксину та глутатіону ссавців здатні надавати електрони перехресно та служити резервною системою одна для одної. Навпаки, TrxR бактерій є низькомолекулярними ферментами зі структурою та механізмом реакції, відмінними від TrxR ссавців. Багато видів бактерій мають специфічні тіолзалежні антиоксидантні системи, і значення системи Trx у захисті від окислювального стресу різне. Зокрема, відсутність системи GSH-Grx у деяких патогенних бактерій, таких як *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* і *Staphylococcus aureus*, робить бактеріальну систему Trx необхідною для виживання в умовах окисного стресу. Це дає можливість знищити ці бактерії, націлившись на систему TrxR-Trx [41].

1.3.1. Ізоформи Trx1 і Trx2: структура та функції

У ссавців система Trx важлива для захисту від впливу АФК. Складки Trx з окисно-відновним мотивом CXXC утворюють суперсімейство білків, пов'язаних з тіол-дисульфідним обміном, який включає утворення дисульфідного містка. Цей механізм виявлено в усіх організмах. Правильне окислювальне згортання білка в клітинах є важливим для стабільності та функціонування білка, а неправильне згортання призводить до важких захворювань. Trx, найбільш репрезентативний представник цього сімейства, є білком 12 кДа, знайденим у бактеріях, рослинах і тваринах [42].

Основний складчастий мотив Trx складається з трьох α -спіралей, що оточують центральне ядро з чотирьох β -листів. На додаток до основної складки сам Trx має додатковий β -лист і α -спіраль на N-кінці. У центральній області п'ять β -ланцюгів фланковані чотирма α -спіралями. β -листи та α -спіралі складки Trx можна підрозділити на N-кінцеві β_1 α_1 β_2 α_2 β_3 та C-кінцеві β_4 β_5 α_4 мотиви, з'єднані петлею із залишків за участю α_3 -спіралі. β -ланцюги N-кінцевого мотиву проходять в одному напрямку, тоді як два β -ланцюги C-кінцевого мотиву є антипаралельними один одному. Спіралі α_2 і α_4 розташовані паралельно в одному напрямку на листі, тоді як α_3 проходить уздовж протилежної сторони β -ланцюгів і перпендикулярна до інших спіралей.

У клітинах ссавців було охарактеризовано два основних типи Trx, які відрізняються своєю внутрішньоклітинною локалізацією, тканинно-специфічними моделями експресії та субклітинною структурою: цитозольний Trx-1 і мітохондріальний Trx-2. Хоча Trx-1 в основному знаходиться в цитозолі, він може мігрувати до ядра під час нітрозативного/оксидативного стресу або виділятися з клітини. Trx-2 є життєво важливою мітохондріальною редокс-ізоформою. І Trx-1, і Trx-2 характеризуються консервативною дисульфідною послідовністю активного центру Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (WCGPC) [43].

Два залишки Cys32 і Cys35 в активному центрі (необхідному для активності та конформації Trx) легко окислюються і піддаються оборотній окисно-відновній реакції між окисленим дисульфідом і відновленим дитіолом. Інші консервативні залишки не є обов'язковими для активності, але визначають термодинамічні та окисно-відновні властивості білка.

Запропонований механізм реакції відновлення дисульфіду білка полягає в наступному: по-перше, відновлений Trx нековалентно зв'язується з окисленим білковим субстратом, що містить дисульфід, через збережену гідрофобну площу поверхні, що оточує активний центр Trx. $pK_a \sim 7$ цистеїну N-кінцевого активного центру значно нижчий, ніж pK_a вільних залишків цистеїну в розчині. У фізіологічних умовах значна частка Сульфуру в N-кінцевому цистеїні присутня у вигляді тіолату, реакційноздатної депротонованої форми тіолу. Цей тіолат може діяти як нуклеофіл для взаємодії з різноманітними субстратами, що призводить до утворення міжмолекулярного змішаного дисульфіду (Trx-S-S-протеїн) і вивільнення вільного тіолу. Навпаки, високий $pK_a \sim 9$ С-кінцевого цистеїну сприяє його існуванню як тіолу. С-кінцевий тіол повинен бути активований як тіолат, щоб полегшити наступний етап реакції, де генеруються повністю відновлений цільовий білок і дисульфід-вмісний Trx. Окислений Trx відновлюється до свого активного стану електронами з NADPH(H^+). Реакція каталізується TrxR і забезпечує початок наступного реакційного циклу [44].

Крім двох залишків цистеїну в активному центрі Trx-1, Trx-1 ссавців містить додаткові консервативні залишки цистеїну поза їх активним центром (у положеннях 62, 69 і 73 Trx-1 людини), які не зустрічаються в мітохондріальному Trx-1 ссавців або в Trx від інших видів. Cys62 і Cys69 поховані всередині білка і лежать на обох кінцях короткої $\alpha 3$ -спіралі, а Cys73 знаходиться на гідрофобній ділянці на поверхні білка. Ці додаткові залишки цистеїну беруть участь в активності Trx ссавців залежно від їх окисно-відновного стану; наприклад, дисульфід неактивного центру, що утворюється між Cys62 і Cys69, пригнічує активність Trx-1 для передачі окисно-відновних

сигналів в умовах окисного стресу. S-нітрозилювання Trx на Cys69 в базальних умовах необхідне для очищення АФК і для збереження окислювально-відновної регуляторної активності, тим самим сприяючи антиапоптотичним функціям білка [45].

1.3.2. Ізоформи тіоредоксинредуктази

Тіорексинредуктази (ЕС 1.6.4.5, TrxR) є гомодимерним флавопротеїном, що містить селеноцистеїн, який каталізує НАДФН-залежне відновлення тіоредоксину. Trx і TrxR утворюють антиоксидантну систему Trx для підтримки клітинного окисно-відновного гомеостазу. Близько 55 кДа для кожної субодиниці TrxR було ідентифіковано переважно у ссавців, а TrxR 35 кДа для кожної субодиниці присутній у бактеріях, рослинах, археях і більшості одноклітинних еукаріот. У TrxR ссавців кожен мономер включає FAD як простетичну групу, сайт зв'язування NADPH і окисно-відновний активний центр, що містить дитіол/дисульфідний мотив. Людський плацентарний TrxR був очищений і клонований і демонструє лише 31% ідентичності послідовності з прокаріотичними TrxR [46].

Каталітичний сайт -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys- TrxR людини розташований у домені FAD, тоді як відповідний сайт TrxR *E. coli*, -Cys-Ala-Thr-Cys-, є частиною домен NADPH. С-кінець TrxR ссавців має законсервований Gly-Cys-SeCys-Gly, що містить унікальний і важливий SeCys як ще один каталітично активний центр, необхідний для відновлення Trx та інших субстратів, включаючи глутаредоксин 2 (Grx-2), білкова дисульфідна ізомераза, селеніт, вітамін С і цитохром с, а також препарати, такі як мотексафін, гадоліній і алоксан. Широка субстратна специфічність TrxR ссавців пояснюється його гнучким С-кінцевим хвостом і високою реактивністю пари SeCys, якої немає у його бактеріальних аналогів.

TrxR має три ізоформи ссавців: цитозольну та ядерну TrxR-1, мітохондріальну TrxR-2 та TrxR-3 (також відому як тіоредоксинглутатіонредуктаза, TGR), остання з яких експресується лише в

яечках. Ці ізоформи кодуються трьома окремими генами, TNXRD1 , TNXRD2 і TNXRD3, відповідно. TrxR-1 і людський TrxR-2 тісно пов'язані, демонструючи 56% ідентичності та 84% схожості з первинною послідовністю амінокислот. Однак TrxR-2 відрізняється від TrxR-1 наявністю розширення з 33 амінокислот на N-кінці, яке має характерні властивості мітохондріального сигналу транслокації [47].

Перший етап відновної напівреакції TrxR включає відновлення FAD NADPH в одній субодиниці, а потім FAD згодом переносить відновні еквіваленти до N-кінця (Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys), в якому Cys59 і Cys64 утворюють мотив активного центру і відновлюють дисульфід до дитіолової пари. Ця N-кінцева пара дитіолів далі віддає електрони C-кінцевому селенілсульфіду (Cys 497–SeCys 498) іншої субодиниці та відновлює його до пари селенотіолів. Ця відновлена C-кінцева селенотіолова пара діє як другий окисно-відновний центр; електрони переносяться від окисно-відновного дисульфиду через окисно-відновний центр на C-кінці до субстратів TrxR, таких як окислений Trx, глутаредоксин 2, білкова дисульфідна ізомераза та малі молекули, наприклад селеніти, перекис водню, дегідроаскорбат, ліпоєва кислота, убіхінон, цитохром с, алоксан і мотексафін гадоліній [48].

1.3.3. Позаклітинний Trx/TrxR

Trx-1 в основному локалізується в цитозолі, але може виділятися з клітин у двох формах: повнорозмірний Trx-1 та усічена форма під назвою Trx-80. Останній не має окисно-відновної активності, але стимулює мононуклеари периферичної крові. Хоча Trx не має класичного сигнального пептиду, він експортується в позаклітинне середовище через ER/Golgi-незалежний шлях (також званий нетрадиційною або некласичною секрецією). Точний механізм секреції Trx неясний.

На сьогоднішній день не виявлено специфічних рецепторів клітинної поверхні для Trx. Trx-1 є аутокринним фактором росту для Т-лімфотропного

вірусу людини-1 і В-лімфоцитів, трансформованих вірусом Епштейна-Барр (EBV), а також діє як цитокін і хемокін для імунних клітин [49].

Повідомлялося про підвищення рівня позаклітинного Trx при багатьох патологічних станах, пов'язаних з окислювальним стресом. Наприклад, позаклітинний тіоредоксин (Etrx3/REQ_13520) необхідний для стійкості *Rhodococcus equi*, актинобактеріального патогена, до оксидантів. З'являється все більше доказів того, що позаклітинний Trx також відіграє роль в імунній відповіді завдяки своїй здатності вибірково розпізнавати C46–C99 дисульфід IL-4, таким чином інактивуючи цитокінову активність у клітинах еритролейкемії TF-1.

Позаклітинний Trx стимулює проліферацію пухлинних клітин. Механізми передбачають збільшення виробництва цитокінів (IL-1, IL-2 і TNFa), а також стимуляцію факторів росту та асоційованих з проліферацією факторів транскрипції.

Крім того, Trx був ідентифікований як білок, пов'язаний з ліпідним рафтом (LR). LRs, мікродомени плазматичної мембрани, містять сфінголіпіди та холестерол, які здатні утворювати мембранні макродомени, контролювати окислювально-відновний стан молекул клітинної поверхні та впливати на сигнальні шляхи. Зокрема, мутант Trx-C35S, у якому Cys35 активного центру був замінений на серин, швидко зв'язувався з поверхнею клітини та інтерналізувався LR-залежним способом. Це свідчить про те, що залишок цистеїну в активному центрі Trx відіграє фундаментальну роль в інтерналізації позаклітинного Trx через ліпідні рафти [50].

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти та методи досліджень

Усі експериментальні дослідження проводили, використовуючи білих безпородних щурів із масою 150-180 г та віком 3-4 місяці, яких утримували в експериментально-біологічному віварії ННІБХБ ЧНУ ім. Юрія Федьковича. Маніпуляції з лабораторними щурами проводили, посилаючись на положення «Міжнародної конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та пункти документу «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах», що були ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Моделювання парацетамол-індукованого ураження здійснювали пероральним шляхом, використовуючи дозу для введення – 1250 мг/кг маси тварин. Вводили ксенобіотик 1 раз на день 2 доби у вигляді суспензії, яку готували на 2 %-му розчині крохмалю [51].

Для створення моделі експерименту ми поділи тварин на 4 дослідні групи:

- 1 група – щури, яких утримували на збалансованому раціоні (К);
- 2 група – щури, які отримували низькопротеїновий напівсинтетичний раціон (НПР);
- 3 група – щури, яким індукували токсичне ураження ацетамінофеном (ТУ);
- 4 група – щури, яким за умов дефіциту харчового протеїну моделювали токсичне ураження (НПР/ТУ).

Тварини отримували щоденно протягом 28 днів 35 г харчового раціону, використовуючи розрахунок споживання кормів для гризунів – 200 г/кг маси тварин. Упродовж всього експерименту тварини споживали чисту простерилізовану воду, до якої завжди мали вільний доступ.

Склад напівсинтетичного раціону, який впродовж експерименту отримували щури містив:

✓ **макронутрієнти**

казеїн – 140 г/кг,
 крохмаль – 620,69 г/кг,
 сахароза – 100 г/кг,
 целюлоза – 50 г/кг,
 олія соєва – 40 г/кг;

✓ **макроелементи та мікроелементи (сольова суміш):**

калій фосфорнокислий однозаміщений – 163,3 г,
 кальцій вуглекислий – 160,2 г,
 натрій хлористий – 58,5 г,
 магній сірчаноокислий – 24, 1 г,
 ферум сульфат двоводний – 11,1 г,
 манган сульфат двоводний – 1,87 г,
 калій йодистий – 0,322 г,
 цинк сульфат семиводний – 0,23 г,
 натрій фтористий – 0,210 г,
 купрум сульфат п'ятиводний – 0,125 г,
 квасці алюмокалієві – 0,047 г,
 кобальт хлористий шестиводний – 0,010 г;

✓ **мікронутрієнти**

вітамін В₃ – 30 мг,
 вітамін В₅ – 15 мг,
 вітамін В₆ – 6,0 мг,
 вітамін В₁ – 5,0 мг,
 вітамін В₂ – 6,0 мг,
 вітамін В₉ – 2,0 мг,
 вітамін В₁₂ – 25,0 мкг,
 вітамін К – 960,0 мкг,

вітамін Е (токоферол) – 75 МО,
вітамін А (ретинол ацетат) – 4000 МО,
вітамін D – 1000 МО;
L-цистеїн – 1,8 г/кг;
холін бітарtrat – 2,5 г/кг [52].

Тварин зважували кожних 3 дні від початку експерименту.

Умертвіння дослідних лабораторних щурів здійснювали на 29-й та 31-й дні експерименту методом цервікальної дислокації.

2.2. Отримання цитозольної (постмікросомальної) фракції

Цитозольну (постмікросомальну фракцію) із печінки щурів отримували шляхом гомогенізації тканин в 0,25 М розчині сахарози. Після осадження мітохондріальної фракції до отриманої надосадової рідини вносили 1 об'єм розчину 80 ммоль/л CaCl_2 та 1 об'єм 160 ммоль/л MgCl_2 , які готували на 10 ммоль/л трис-НСІ буфері, рН 7,4. Вміст супернатанту перемішували на магнітній мішалці впродовж 10 хв, температурний режим – 4 °С. Після цього проби центрифугували 10 хв, надаючи відцентрове прискорення в 10000 g. В осаді залишалися мітохондрії, а надосадову рідину відбирали та використовували у дослідженнях як цитозольну (постмікросомальну) фракцію [53].

2.3. Визначення активності тіоредоксину

Для оцінки активності тіоредоксину використовували метод *Arnér and Holmgren*, що полягає в реєстрації зростання екстинції при довжині хвилі 650 нм внаслідок дитіотреїтол-залежного відновлення дисульфїду інсуліну тіоредоксином [54].

До складу інкубаційного середовища для визначення активності тіоредоксину входили 1,6 ммоль/л інсулін, приготовлений на 100 ммоль/л фосфатному буфері (рН 6,5), 100 ммоль/л фосфатний буфер (рН 6,5), що містив 2 ммоль/л ЕДТА та 100 ммоль/л дитіотреїтол. Ініціювання реакції

здійснювали внесенням до реакційного середовища цитозольного протеїну. Швидкість відновлення дисульфїду інсуліну за дії тіоредоксину реєстрували за збільшенням оптичної густини через осадження відновленого інсуліну при довжині хвилі 650 нм протягом 40 хв на спектрофотометрі CARY 60. Активність тіоредоксину виражали в мкмоль(хв×мг протеїну).

2.4. Визначення активності тіоредоксинредуктази

Принцип методу визначення активності тіоредоксинредуктази базується на реєстрації швидкості НАДФН-залежного перетворення 5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойної кислоти) (ДТНБ; реактив Елмана) до 5-тіо-2-нітробензойної кислоти (ТНБ) при довжині хвилі 412 нм [54]:



В пробірки вносили реакційну суміш, що містила: 62,5 ммоль/л реактив Елмана (5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойна кислота) в 95 % етанолі, 50 ммоль/л НАДФН, 100 ммоль/л фосфатний буфер (рН 7.0) із додаванням 2 ммоль/л ЕДТА та бичачий сироватковий альбумін (20 мг/мл). Реакцію запускали внесенням до інкубаційного середовища цитозольного протеїну. Швидкість відновлення НАДФН оцінювали за зростанням оптичної густини при довжині хвилі 412 нм протягом 2 хв на спектрофотометрі CARY 60. Активність тіоредоксинредуктази (в нмоль ТНБ/хв/мг протеїну) розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинції $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для 5-тіо-2-нітробензойної кислоти.

2.5. Оцінка вмісту цистеїну та цистину

Вміст цистеїну оцінювали методом *Gaitonde*, що ґрунтується на здатності даної амінокислоти взаємодіяти з нінгідринним реагентом в кислому середовищі з утворенням сполуки рожевого кольору [55].

До інкубаційної суміші, що містила 5 % HClO_4 , оцтову кислоту, нінгідринний реагент (250 мг нінгідрину, 6 мл оцтової кислоти та 4 мл

хлоридної кислоти) додавали цитозольну фракцію. Пробірки закривали алюмінієвими ковпачками, проби інкубували при 100 °C протягом 10 хв та охолоджували. В пробірки вносили 1,5 мл дистильованої води. Після центрифугування за швидкості 3000 об/хв протягом 10 хв вимірювали оптичну густину надосадової рідини на спектрофотометрі CARY 60 при 560 нм. Визначення кількості цистеїну проводили за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами цистеїну та виражали в мкмоль/мг протеїну.

З метою визначення вмісту цистину (окислена форма цистеїну), перед проведенням нінгідринової реакції, його відновлюють до цистеїну шляхом додавання до реакційної суміші розчину дитіотреїтолу. Внаслідок цього отримуємо загальний вміст цистеїну. В пробірки вносять 5 % HClO_4 , цитозольну фракцію, одну краплю фенолфталеїну та 10 н NaOH, краплями обережно додають 0,1 н NaOH. Після появи рожевого забарвлення вносять 5 мкмоль/л дитіотреїтол, проби інкубують 30 хв при кімнатній температурі, додають нінгідриновий реагент. Етапи визначення після внесення нінгідринового реактиву такі ж, як і при реєстрації рівня цистеїну. Вміст цистину оцінювали за різницею вмісту загального та відновленого цистеїну та виражали в мкмоль/мг протеїну.

2.6. Визначення вмісту відновленого глутатіону

Для визначення вмісту відновленого глутатіону (GSH) застосовували метод *Beutler*, принцип якого ґрунтується на взаємодії SH-груп відновленого глутатіону з реактивом Елмана з утворенням сполуки жовтого кольору – тіонітрофенільного аніону. Кількість забарвленого продукту відповідає кількості тіолових груп, що прореагували з 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [56].

У центрифужні пробірки вносили цитозольну фракцію та осаджуючий реактив (0,2 моль/л метафосфорна кислота, 6 ммоль/л EDTA та 5 моль/л

NaCl). Проби перемішували за допомогою лабораторного шейкера, витримували 10 хв при кімнатній температурі та центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хв. До 1 мл отриманого супернатанту вносили 4 мл 0,3 моль/л Na_2HPO_4 та 0,5 мл реактиву Елмана, приготованого на 0,1 моль/л фосфатному буфері (рН 8.0). Проби витримували 5 хв та центрифугували при 2000 об/хв протягом 5 хв. В контрольну пробу замість надосадової рідини вносили 1 мл дистильованої води. Вміст відновленого глутатіону визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм та виражали в мкмоль/мг протеїну.

Вміст білка в дослідних зразках визначали за методом Лоурі.

2.7. Статистична обробка результатів

Усі дослідження проводили у трьох біологічних повторях. Статистичне опрацювання результатів отриманих лабораторних досліджень проводили, використовуючи функціональне забезпечення пакету аналізу табличного редактора «Microsoft Excel 2020 for Windows». Дані групували та опрацьовували параметричними методами приймання та/або відхилення статистичних гіпотез, використовуючи t-критерій вірогідності різниці Стьюдента. Графічне відображення отриманих результатів представлене у вигляді діаграм, значення помилок вказують на стандартну помилку середнього арифметичного. Різницю між групами вважали статистично вірогідною при $p \leq 0,05$ [57].

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Активні форми кисню — це високореакційноздатні молекули, які містять кисень, такі як пероксид водню та супероксид серед інших. На додаток до екзогенних джерел (наприклад, забруднюючі речовини, радіація тощо), АФК також можуть виникати ендогенно через мітохондріальний дихальний ланцюг і під дією НАДФН-оксидази [58]. Незважаючи на їх важливу роль у знищенні патогенів і регуляції клітинної проліферації та диференціації, надто підвищені рівні АФК можуть спричинити пошкодження ДНК, білків і ліпідів, тим самим сприяючи старінню та загибелі клітин. Аеробні організми оснащені складною мережею антиоксидантних білків, які підтримують окисно-відновний гомеостаз. Порушення цього окисно-відновного балансу в бік окислення, відоме як «оксидативний стрес», пов'язане з різними патологіями [59].

Система тіоредоксину (Trx) є одним із основних клітинних антиоксидантних шляхів, які контролюють окисно-відновний гомеостаз. Ця система включає NADPH, Trx-редуктазу (TrxR), сам Trx і білок, що взаємодіє з Trx негативним регулятором (також відомий як активований вітаміном D₃ білок 1; кодується геном TXNIP). TXNIP зв'язується з відновленим Trx через міжмолекулярні дисульфідні взаємодії та блокує його активність [60].

Результати досліджень показали, що зміни активності тіоредоксину в цитозольній фракції клітин печінки щурів відбуваються лише за умов введення токсичних доз ацетамінофену незалежно від кількості споживання харчового протеїну (рис. 3.1). Як видно з даного рисунку в групах щурів ТУ та НПР+ТУ рівень тіоредоксину знижується в 8,4 та 5 разів відповідно порівняно зі значеннями контролю.

Оксидативний стрес – це стан, який стосується підвищеного утворення та накопичення АФК, які є природними побічними продуктами аеробного дихання та вилучення енергії. До них належать вільні радикали, такі як супероксид-аніони ($O_2^{\bullet-}$), гідроксильні радикали ($\bullet OH$) і нерадикальні

молекули, такі як пероксид водню H_2O_2 і синглетний кисень 1O_2 , які становлять частково відновлені форми молекулярного кисню (O_2). У фізіологічних умовах клітини ссавців виробляють низькі базальні рівні АФК для забезпечення різноманітних фізіологічних реакцій, включаючи ріст, міграцію та диференціювання. Однак надлишок АФК може пошкодити ДНК, білки та ліпіди та призвести до загибелі клітин, раку та/або старіння. Для того, щоб уникнути або повернути назад викликане АФК пошкодження макромолекул, необхідно підтримувати належні окисно-відновні умови [61].

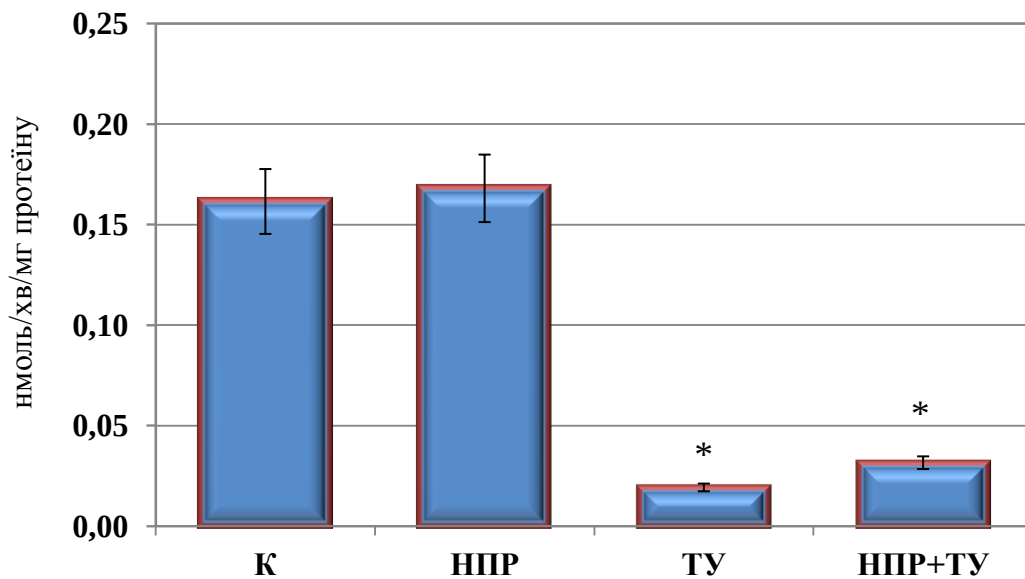


Рис. 3.1. Активність тiorедоксину в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дефіциту протеїну та токсичного ураження

Примітка (тут і надалі):

К – щури, яких утримували на збалансованому раціоні;

НПР – щури, які отримували низькопротеїновий напівсинтетичний раціон;

ТУ – щури, яким індукували токсичне ураження ацетамінофеном;

НПР + ТУ – щури, яким за умов дефіциту харчового протеїну моделювали токсичне ураження;

***** – статистично вірогідна різниця порівняно з контрольними величинами, $P \leq 0,05$.

З літератури [62] відомо, що мітохондріальна дисфункція є центральною в патофізіології АРАР. Активація JNK у цитозолі та її транслокація до мітохондрій ініціює порочне коло мітохондріального дистресу, де інгібування мітохондріального транспорту електронів посилює

реактивну генерацію кисню та утворення пероксинітриту, що викликає мітохондріальний оксидативний та нітрозативний стрес. Це, в свою чергу, додатково підсилює цитозольний каскад MAP-кінази, активуючи JNK і зберігаючи його транслокацію до мітохондрій. Стійкий мітохондріальний оксидативний і нітрозативний стрес, про який свідчить збільшення дисульфідіу глутатіону (GSSG) і пероксинітриту, у поєднанні з транслокацією BAX до мітохондрій, зрештою, індукує перехід мітохондріальної проникності. Це призводить до вивільнення мітохондріальних білків, таких як SMAC, цитохром c, фактор, що індукує апоптоз (AIF) і ендонуклеазу G (ENDOG), у цитозоль. AIF і ENDOG транслокуються в ядро, щоб викликати фрагментацію ДНК і, зрештою, некроз гепатоцитів.

Мітохондріальні білки є мішенями для утворення аддуктів NAPQI, що викликає мітохондріальний оксидативний стрес. Однак існують дві чіткі фази посиленого утворення мітохондріальних вільних радикалів. Початкова фаза, ініційована білковими аддуктами, включає раннє вивільнення супероксидних радикалів з мітохондріального респіраторного комплексу III у напрямку до цитозолу, що відбувається без порушення мітохондріальної функції, і індукує передачу сигналів мітоген-активованої протеїн (MAP) кінази в цитозолі активація c-jun N-кінцевої кінази (JNK). Транслокація JNK до мітохондрій ініціює посилення окислювального стресу і, зрештою, порушує мітохондріальне дихання [62].

Тому для захисту від надмірно накопичення АФК у клітині діють численні антиоксидантні захисні системи, включаючи систему тіоредоксину, глутатіону та ферментні поглиначі АФК (наприклад, глутатіонпероксидаза та глутатіон-S-трансфераза). Як ферментативні, так і неферментативні антиоксиданти регулюються загальним фактором транскрипції ядерним фактором Nrf2, який переміщується в ядро у відповідь на оксидативний стрес.

Враховуючи те, що посилення прооксидатних процесів [63] на тлі виснаження антиоксидантних ресурсів клітин печінки за умов токсичного

ураження ацетамінофеном [64] підтверджено попередніми дослідженнями кафедри, то зниження активності тіоредоксину може бути наслідком прямого збільшення активних кисневих метаболітів.

Система Trx виконує різні функції захисту від окислювального стресу і, отже, служить критичною антиоксидантною системою, таким чином підтримуючи окисно-відновний баланс. Клітини ссавців мають дві системи Trx, цитозольну Trx1 і мітохондріальну систему Trx2. Trx2 має лише два цистеїни в своєму активному центрі, тоді як Trx1 має три додаткові додаткові цистеїни, які відіграють роль в окисно-відновній регуляції активності та передачі сигналів NO. Trxs з дітіол/дисульфідним активним центром є основними клітинними білковими дисульфідредуктазами, які діють як донори електронів для ферментів, включаючи рибонуклеотидредуктази (RNR), тіоредоксинпероксидази (пероксиредоксини, Prxs) і метіонінсульфоксидредуктази (MSR). Вони відіграють вирішальну роль у плеiotропних клітинних ефектах, таких як контроль проліферації клітин, окисно-відновних станів і апоптозу [65].

Однією з важливих ендогенних молекул для взаємодії з Trx є білок, що взаємодіє з тіоредоксином (TXNIP), який є негативним регулятором функції Trx. Cys63 і Cys247 у TXNIP можуть утворювати змішані дисульфідні зв'язки з тіолами активного центру Trx, пригнічувати активність Trx і призводити до окислювального стресу. TXNIP знаходиться в ядрі в нормальних умовах. У відповідь на окислювальний стрес TXNIP може переміщатися в цитозоль або мітохондрії, які зв'язують і окислюють Trx1/Trx2, зменшуючи зв'язування Trx1/Trx2 з ASK1 і створюючи ASK1-опосередкований сигнальний шлях.

Trx1 — це невелика, 12 кДа, багатофункціональна дисульфідредуктаза з окисно-відновними мотивами, що містять Cys (-CXXC-), які існують в окисленому (дисульфід) або відновленому (дитіол) стані. Trx, відновлений TrxR1, у дитіольній формі активного центру, переносить відновлювальні еквіваленти на дисульфіди в цільових молекулах, відновлюючи дисульфіди білків і діючи як донор водню для білків. У ядрі білок безпосередньо

зв'язується з різними факторами транскрипції, такими як p53, NF-κB і білок-активатор (AP1), таким чином модулюючи афінність зв'язування ДНК взаємодіючих факторів транскрипції. У цитоплазмі Trx1 взаємодіє з кіназою 1, що регулює сигнал апоптозу (ASK-1), пригнічуючи її функцію промоутера сигнального шляху апоптозу JNK/p38. Trx є донором водню для рибонуклеотидредуктази (RNR) – ключового ферменту синтезу дезоксирибонуклеотидів і ключового обмежувального етапу проліферації [66].

Водночас нами встановлено, що на тлі зниження рівня тіоредоксину в цитозольній фракції клітин печінки щурів груп ТУ та НПР+ТУ спостерігається активація тіоредоксинредуктази порівняно зі значеннями контролю (рис. 3.2). Слід відмітити, що недостатність протеїну в харчовому раціоні не проявляла жодного впливу на зміни активності досліджуваного ензиму, тому статистично достовірне підвищення активності TrxR в 4,6 та 4 рази відповідно зареєстровано нами лише в груп ТУ та НПР+ТУ порівняно з контролем (рис. 3.2).

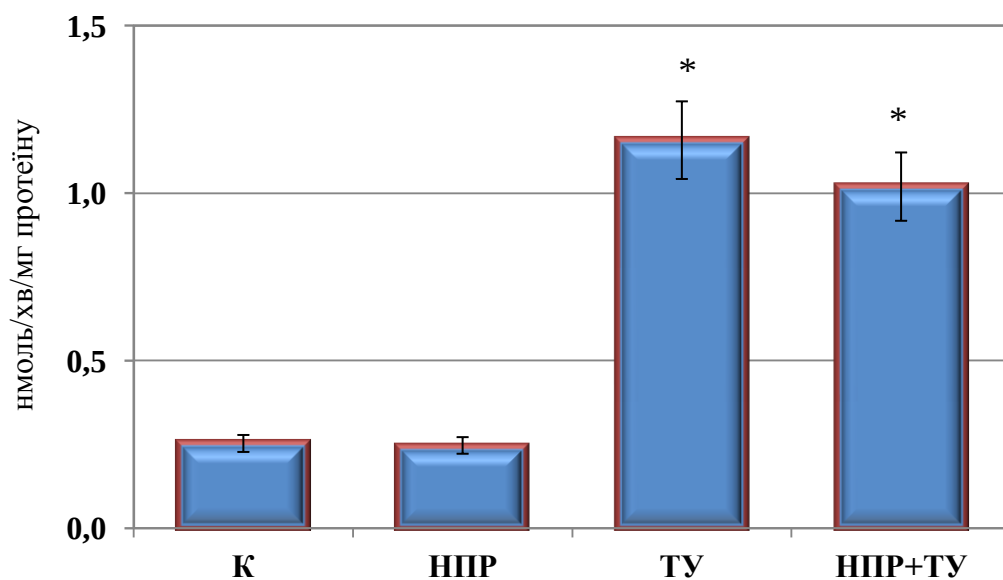


Рис. 3.2. Активність тіоредоксинредуктази в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дефіциту протеїну та токсичного ураження

Trx може бути відновлений тіоредоксинредуктазою у присутності NADPH з утворенням кисню в ступені окислення. Trx, діючи як фактор росту, взаємодіє з TXNIP для виконання наступних функцій: регулювання імунної функції; поглинання внутрішньоклітинних активних форм кисню, регулювання активності інших ферментів і зниження оксидативного стресу; підтримання нормального внутрішньоклітинного окисно-відновного гомеостазу і зниження Gpx3; поглинання синглетного кисню та гідроксильних радикалів за допомогою АФК і регулювання експресії генів p53 і Nrf2; регулювання експресії апоптотичного білка через сигнальний шлях ядерного фактора каппа-В (NF-κB); і регулювання апоптозу через ASK1 [67].

Цитозольна TrxR1 і мітохондріальна TrxR2 є селенозалежними димерними флавопротеїнами (112–130 кДа). TrxR1 демонструє широку субстратну специфічність, яка відновлює недисульфідні субстрати, такі як гідропероксиди, вітамін С або селеніт. Три TrxR виявлені в клітинах ссавців: цитозольна TrxR1, мітохондріальна TrxR2 і специфічна для яєчок тіоредоксинглутатіонредуктаза (TGR). Усі ізоферменти TrxR ссавців є гомологічними глутатіонредуктазі (GR) і містять консервативне подовження на С-кінці з послідовністю цистеїн-селеноцистеїн, що утворює окисно-відновний активний центр селенілсульфіду/селенолтіолу [65].

Тіоредоксинредуктаза може діяти на окислений Trx, щоб відновити Trx, а NADPH окислюється до NADP^+ . Після того, як Trx відновлюється, дисульфідні зв'язки інших білків зменшуються, таким чином проявляючи біологічну активність. Крім того, тіоредоксинредуктаза відіграє антиоксидантну роль через каталітичну регенерацію коензиму Q10.

Виходячи з цього, можна припустити, що активація тіоредоксинредуктази за умов введення токсину – ацетамінофену, що призводить до порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу в клітинах печінки, спрямована на відновлення окисленої форми тіоредоксину.

Отже, за умов ацетамінофен-індукованої гепатотоксичності в клітинах печінки щурів відбувається зниження активності тіоредоксину на тлі активації тіоредоксинредуктази, що вірогідно, спрямовано на підтримання внутрішньоклітинних резервів відновленого Trx шляхом регенерації його окисленої форми.

Система Trx/TrxR відіграє важливу роль у регуляції активності Nrf2. Ядерний Trx1/Ref-1 важливий для зменшення критичних залишків Cys у Nrf2: один важливий для зв'язування ДНК, а інший бере участь у ядерному експорті. Крім того, деякі реактивні молекули, які націлені на TrxR1, можуть не тільки інгібувати фермент, але й перетворювати білок на прооксидантні SecTRAPs (пошкоджені селеном апоптотичні білки, отримані з тіоредоксинредуктази) з NADPH-оксидазною активністю, таким чином додатково сприяючи активації Nrf2 у будь-яких клітинах, які переживають такий окислювальний виклик. Активність зв'язування ДНК факторів транскрипції NF- κ B, AP-1, p53 і глюкокортикоїдного рецептора також регулюється Trx1-відновлювальною активністю незамінних залишків цистеїну [68].

Окислений Trx відновлюється до активної відновленої форми Trx за допомогою TrxR, яка використовує NADPH як основне джерело електронів. Знижений Trx відновлює окислені субстрати. Однак це може бути інгібовано TXNIP, що призводить до утворення комплексу TXNIP-Trx. Крім того, позаклітинний цистеїн, колись імпортований у клітину, може бути зменшений системою Trx і використаний для синтезу GSH. Глутаматцистеїнова лігаза каталізує утворення γ -GluCys з Cys і Glu. Подальше додавання Gly за допомогою глутатіонсинтетаза дає GSH. Під час детоксикації АФК GSH перетворюється на GSSG, і його рециркуляція залежить від глутатіонредуктази і NADPH. Крім того, під час використання GSH за допомогою GST є основним етапом детоксикаційної активності через GST-опосередковану кон'югацію з молекулами [69].

Результати проведених досліджень засвідчують зниження рівня відновленого глутатіону в цитозольній фракції клітин печінки щурів усіх дослідних груп порівняно зі значеннями контролю (рис. 3.3). Попередніми дослідженнями наукової групи показано, що зниження вмісту GSH в печінці протеїнодефіцитних щурів пов'язано переважно з порушенням його синтезу, що відбувається *de novo* в цитозолі печінки у два етапи, які каталізуються глутаматцистеїнлігазою та глутатіонсинтетазою із γ -глутамату, цистеїну і гліцину. Вважається, що лімітуючою ланкою в біосинтезі глутатіону виступає доступність амінокислот попередників і в першу чергу цистеїну. Навіть незначне зниження концентрації цистеїну в печінці при недостатньому надходженні його з їжею, викликає різке зниження концентрації глутатіону [70].

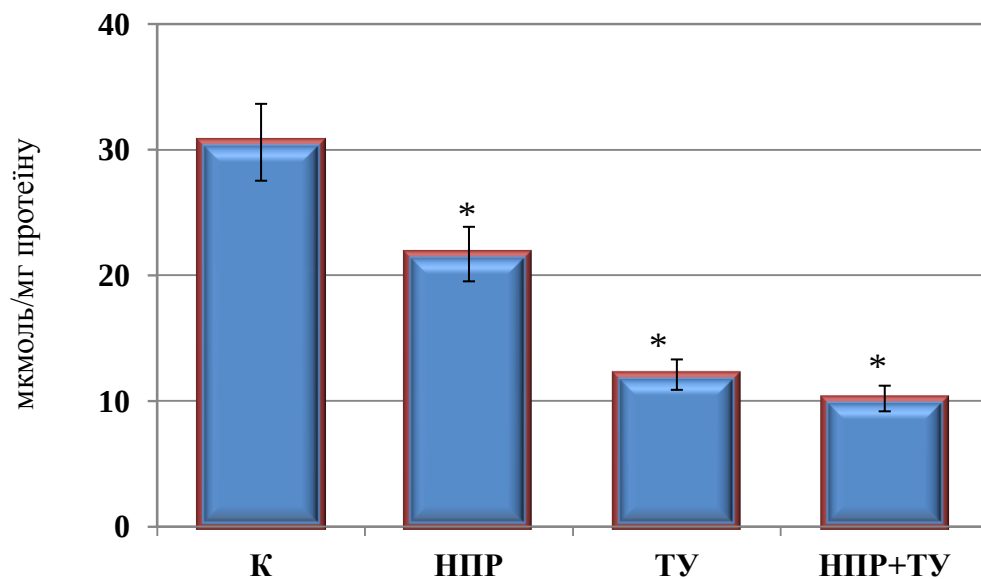


Рис. 3.3. Вміст відновленого глутатіону в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дефіциту протеїну та токсичного ураження

Натомість найнижчі значення рівня GSH зареєстровані нами у тварин, яким шляхом введення токсичних доз ацетамінофену, моделювали гостре токсичне ураження. Так, в цитозолі клітин печінки щурів груп ТУ та

НПР+ТУ зниження вмісту відновленого глутатіону відбувається в 2,5 та 3 рази відповідно порівняно з контролем (рис. 3.3).

Будь-яка модуляція експресії білка або активності ферментів фази II може впливати на кількість ацетамінофену, що метаболізується через шлях P450, і, таким чином, модулювати токсичність. Крім того, базальні рівні GSH визначають, скільки NAPQI детоксикується або зв'язується з білками. Таким чином токсичність APAP збільшується шляхом модуляції рівнів печінкового GSH.

Система глутатіон (GSH)/глутаредоксин (GRX), подібно до системи Trx, використовує електрони з NADPH і переносить їх до глутатіонредуктази (GSR), яка регенерує відновлений GSH з його окисленої форми (GSSG). На додаток до безпосередньої підтримки окисно-відновного балансу, GSH може, у свою чергу, забезпечити відновні еквіваленти глутаредоксинів (Grx). Trx і Grx переміщують електрони до численних спільних субстратів і, отже, мають біологічну активність, що перекривається. Проте, якою мірою Trx і Grx можуть компенсувати один одного *in vivo*, погано вивчено та може відрізнятися в різних типах клітин і умовах.

Системи TrxR/Trx на основі селену та GSH на основі Сульфору взаємодіють у забезпеченні антиоксидантної активності в клітинах і тканинах, але відмінності в їх відносному внеску є очевидними. Оскільки системи Trx і GSH/Grx регулюють клітинний окислювально-відновний гомеостаз у клітинах, два шляхи функціонально збігаються, і відсутність або неефективність однієї системи може бути компенсована іншою. Сучасні дослідження зосереджені на природних і синтетичних інгібіторах Trx–TrxR через ковалентне зв'язування з каталітичними центрами Trx Cys32 і Cys35 і через зв'язування із залишком Se, присутнім в активному центрі TrxR [47].

Результати наших досліджень показали, що в цитозольній фракції клітин печінки щурів спостерігається зниження кількості цистеїну в усіх дослідних групах щурів. Проте максимальне зниження кількості даної

амінокислоти відбувається за умов введення токсичних доз ацетамінофену (рис. 3.4, а).

Тіольні групи (SH-), такі як присутні в залишках Cys білків або пептидів, мають велике значення для метаболічних, сигнальних і транскрипційних процесів у клітинах ссавців. Окисно-відновні реакції цих хімічних груп є швидкими та оборотними, тому білки, що регулюються залишками Cys, здатні швидко реагувати на зміни внутрішньо- та позаклітинного середовища та клітинної сигналізації. Тіольні групи є частими мішенями окислення активними формами кисню та азоту, тому системи, відповідальні за підтримку окисно-відновного балансу, мають значення для детоксикації АФК при окислювальному стресі. Фундаментальна роль тіолових буферних систем, що складаються головним чином із систем GSH і Trx, полягає в підтримці окисно-відновного балансу в клітині. Дві системи перетинаються за функціями та компенсують одна одну у випадку, якщо одна з двох не забезпечує антиоксидантний захист. Знижена активність однієї із систем найчастіше призводить до активації іншої [71].

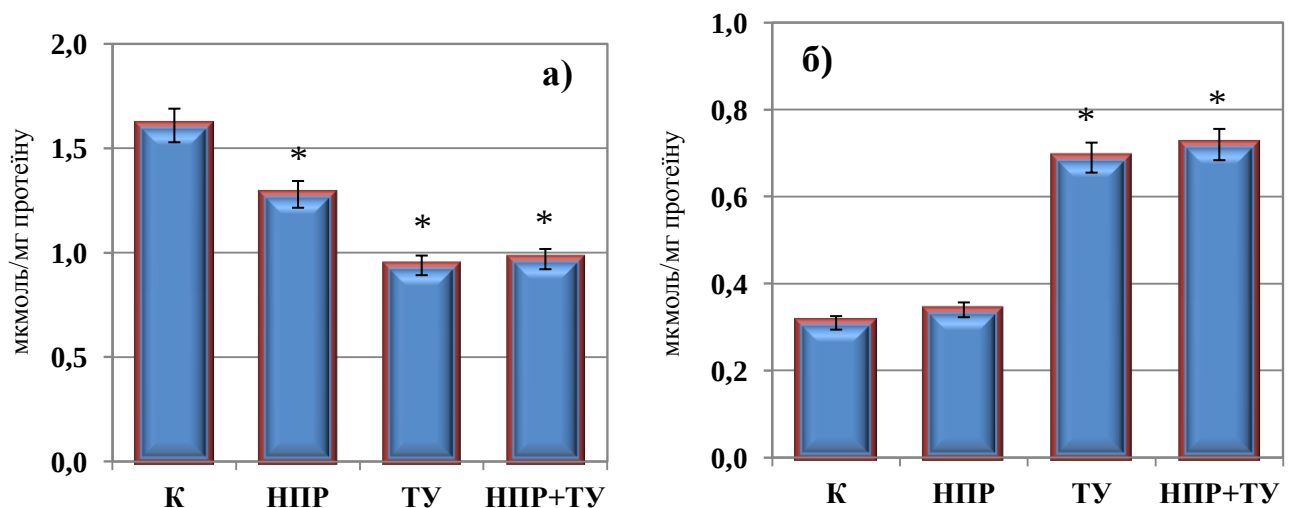


Рис. 3.4. Вміст цистеїну (а) та цистину (б) в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дефіциту протеїну та токсичного ураження

Водночас зниження рівня цистеїну в цитозолі печінки щурів відбувається на тлі зростання кількості продукту його окисної димеризації –

цистину (рис. 3.4, б), що вказувати на посилене формування окислених форм як глутатіону, і це підтверджено попередніми дослідженнями наукової групи в розрізі даної тематики [72], так і тіоредоксину, що, ймовірно, пов'язано із його зниженням (рис. 3.1).

Разом із тим TrxR каталізує відновлення дисульфідів Trx через С-кінцевий активний центр селеноцистеїну. Тому ми припускаємо, що підвищення даної ензиматичної активності в цитозолі печінки щурів груп ТУ та НПР+ТУ, як показано на рис. 3.2, є компенсаторною відповіддю на відновлення тіоредоксину з метою балансування тіол-дисульфідного обміну при блокуванні процесу регенерації окисленого глутатіону через зниження активності глутатіоредуктази, що було доведено у наших попередніх роботах [64].

Основна активність системи глутатіону/тіоредоксину/глутаредоксину включає реакції нуклеофільного заміщення, що відповідають тіол-дисульфідному обміну. Для різних субстратів описані монотіольні та дитіольні механізми; однак монотіоловий механізм зазвичай вважається переважним механізмом деглутатіонілування. Відповідно до монотіолового механізму білок-тіоловий атом сірки білка-SSG атакується тіолат-аніоном активного центру глутаредоксину, утворюючи проміжний Grx-SSG і вивільняючи білок-SH. Другий крок цього нуклеофільного механізму подвійного заміщення включає атаку GSH на дистальний атом сірки проміжної сполуки ферменту Grx-SSG з утворенням GSSG і вивільнення вільного ферменту Grx-S – . Потім продукт GSSG згодом відновлюється NADPH і глутатіонредуктазою.

У дитіоловому механізмі перший крок зображується як утворення змішаного дисульфиду білок-Grx (протеїн-SS-Grx) за участю N-кінцевого цистеїну та вивільнення GSH. Другим етапом є внутрішньомолекулярна атака С-кінцевого цистеїну на змішаний дисульфід для витіснення відновленого білка-SH і утворення внутрішньомолекулярної дисульфідної форми Grx. Потім дві молекули GSH завершують реакцію поетапно; перший GSH

заміщує внутрішньомолекулярний дисульфід з утворенням проміжного продукту Grx-SSG, а другий GSH призводить до утворення GSSG і вільного ферменту Grx-(SH) [73].

Отже, токсичне ураження ацетамінофеном можна розглядати як ключовий чинник зниження вмісту відновленого глутатіону в цитозольній фракції печінки щурів із одночасним зменшенням рівня амінокислоти цистеїну на тлі зростання кількості продукту його окисної димеризації – цистину. Таким чином, система Trx може підтримувати тіол-дисульфідний баланс клітин, що дозволяє стати важливою мішенню корегуючого ефекту за умов токсичного ураження ацетамінофеном.

ВИСНОВКИ

1. За умов ацетамінофен-індукованої гепатотоксичності в клітинах печінки щурів відбувається зниження активності тіоредоксину на тлі активації тіоредоксинредуктази, що вірогідно, спрямовано на підтримання внутрішньоклітинних резервів відновленого тіоредоксину шляхом регенерації його окисленої форми.
2. Токсичне ураження ацетамінофеном можна розглядати як ключовий чинник зниження вмісту відновленого глутатіону в цитозольній фракції печінки щурів із одночасним зменшенням рівня амінокислоти цистеїну на тлі зростання кількості продукту його окисної димеризації – цистину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sam J., Nguyen G. C. Protein-calorie malnutrition as a prognostic indicator of mortality among patients hospitalized with cirrhosis and portal hypertension. *Liver International*. 2009. Vol. 29, no. 9. P. 1396–1402. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02077.x>
2. Isabel T. D. Correia M. The impact of malnutrition on morbidity, mortality, length of hospital stay and costs evaluated through a multivariate model analysis. *Clinical Nutrition*. 2003. Vol. 22, no. 3. P. 235–239. URL: [https://doi.org/10.1016/s0261-5614\(02\)00215-7](https://doi.org/10.1016/s0261-5614(02)00215-7)
3. Ishitsuka Y., Kondo Y., Kadowaki D. Toxicological Property of Acetaminophen: The Dark Side of a Safe Antipyretic/Analgesic Drug?. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2020. Vol. 43, no. 2. P. 195–206. URL: <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00722>
4. García-Román R., Francés R. Acetaminophen-Induced Liver Damage in Hepatic Steatosis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2019. Vol. 107, no. 5. P. 1068–1081. URL: <https://doi.org/10.1002/cpt.1701>
5. Understanding Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine / V. Tretter et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 23, no. 1. P. 106. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms23010106>
6. Jastrząb A., Skrzydlewska E. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 36, no. 1. P. 362–371. URL: <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1867121>
7. Effect of a Diet with Unrestricted Sodium on Ascites in Patients with Hepatic Cirrhosis / X.-b. Gu et al. *Gut and Liver*. 2012. Vol. 6, no. 3. P. 355–361. URL: <https://doi.org/10.5009/gnl.2012.6.3.355>
8. Plasma Ghrelin Concentrations, Food Intake, and Anorexia in Liver Failure / G. Marchesini et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004. Vol. 89, no. 5. P. 2136–2141. URL: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031771>

9. Malnutrition in Patients with Liver Cirrhosis / J. Traub et al. *Nutrients*. 2021. Vol. 13, no. 2. P. 540. URL: <https://doi.org/10.3390/nu13020540>
10. Ethanol and C2 ceramide activate fatty acid oxidation in human hepatoma cells / J. M. Correnti et al. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31025-0>
11. Alterations in Adipose Tissue and Hepatic Lipid Kinetics in Obese Men and Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease / E. Fabbrini et al. *Gastroenterology*. 2008. Vol. 134, no. 2. P. 424–431. URL: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.038>
12. Plasma Amino Acid Concentrations Predict Mortality in Patients with End-Stage Liver Disease / B. Kinney-Köster et al. *PLOS ONE*. 2016. Vol. 11, no. 7. P. e0159205. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159205>
13. Collins J. R. Glucose Intolerance and Insulin Resistance in Patients With Liver Disease. *Archives of Internal Medicine*. 2020. Vol. 126, no. 4. P. 608. URL: <https://doi.org/10.1001/archinte.1970.00310100054004>
14. Study of Trace Elements in Liver Cirrhosis Patients and Their Role in Prognosis of Disease / V. Nangliya et al. *Biological Trace Element Research*. 2015. Vol. 165, no. 1. P. 35–40. URL: <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0237-3>
15. Agarwal A. Correlation of Trace Elements in Patients of Chronic Liver Disease with Respect to Child- Turcotte- Pugh Scoring System. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2017. URL: <https://doi.org/10.7860/jcdr/2017/26519.10655>
16. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis / A. Saeed et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017. Vol. 1862, no. 5. P. 496–512. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.007>
17. Low 25-OH-vitamin D levels reflect hepatic dysfunction and are associated with mortality in patients with liver cirrhosis / R. Paternostro et al. *Wiener*

- klinische Wochenschrift*. 2016. Vol. 129, no. 1-2. P. 8–15.
URL: <https://doi.org/10.1007/s00508-016-1127-1>
18. Sugihara T., Koda M., Okamoto T., Miyoshi K., Matono T., Oyama K., Hosho K., Okano J.I., Isomoto H., Murawaki Y. Falsely Elevated Serum Vitamin B12 Levels Were Associated with the Severity and Prognosis of Chronic Viral Liver Disease. *Yonago Acta Med*. 2017. V. 60. P. 31–39.
 19. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. / R. Roubenoff et al. *Journal of Clinical Investigation*. 2014. Vol. 93, no. 6. P. 2379–2386.
URL: <https://doi.org/10.1172/jci117244>
 20. Biomarkers for oralization during long-term proton pump inhibitor therapy predict survival in cirrhosis / A. Horvath et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48352-5>
 21. Elevated bound leptin correlates with energy expenditure in cirrhotics / J. Ockenga et al. *Gastroenterology*. 2000. Vol. 119, no. 6. P. 1656–1662.
URL: <https://doi.org/10.1053/gast.2000.20256>
 22. Low testosterone levels as an independent predictor of mortality in men with chronic liver disease / M. Grossmann et al. *Clinical Endocrinology*. 2012. Vol. 77, no. 2. P. 323–328. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04347.x>
 23. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis / N. Qin et al. *Nature*. 2014. Vol. 513, no. 7516. P. 59–64.
URL: <https://doi.org/10.1038/nature13568>
 24. Current etiological comprehension and therapeutic targets of acetaminophen-induced hepatotoxicity / A. Chowdhury et al. *Pharmacological Research*. 2020. Vol. 161. P. 105102.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105102>
 25. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose / A. L. Chiew et al. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018.
URL: <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003328.pub3>

26. Hepatoprotective Effect of Citrus aurantium L. Against APAP-induced Liver Injury by Regulating Liver Lipid Metabolism and Apoptosis / Y. Shu et al. *International Journal of Biological Sciences*. 2020. Vol. 16, no. 5. P. 752–765. URL: <https://doi.org/10.7150/ijbs.40612>
27. Bhushan B., Apte U. Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity. *The American Journal of Pathology*. 2019. Vol. 189, no. 4. P. 719–729. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.12.006>
28. Novel Therapeutic Approaches Against Acetaminophen-induced Liver Injury and Acute Liver Failure / H. Jaeschke et al. *Toxicological Sciences*. 2020. Vol. 174, no. 2. P. 159–167. URL: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa002>
29. Ramachandran A., Jaeschke H. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease*. 2019. Vol. 39, no. 02. P. 221–234. URL: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679919>
30. Time course of acetaminophen-protein adducts and acetaminophen metabolites in circulation of overdose patients and in HepaRG cells / Y. Xie et al. *Xenobiotica*. 2015. Vol. 45, no. 10. P. 921–929. URL: <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1026426>
31. Du K., Ramachandran A., Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology*. 2016. Vol. 10. P. 148–156. URL: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>
32. Extending the Limits of Quantitative Proteome Profiling with Data-Independent Acquisition and Application to Acetaminophen-Treated Three-Dimensional Liver Microtissues / R. Bruderer et al. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015. Vol. 14, no. 5. P. 1400–1410. URL: <https://doi.org/10.1074/mcp.m114.044305>
33. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Upregulation of STARD1 Promotes Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure / S. Torres et al. *Gastroenterology*. 2019. Vol. 157, no. 2. P. 552–568. URL: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.023>

34. Low Dose Acetaminophen Induces Reversible Mitochondrial Dysfunction Associated with Transient c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Mouse Liver / J. Hu et al. *Toxicological Sciences*. 2015. Vol. 150, no. 1. P. 204–215. URL: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv319>
35. Molecular pathogenesis of acetaminophen-induced liver injury and its treatment options / X. Cai et al. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2022. Vol. 23, no. 4. P. 265–285. URL: <https://doi.org/10.1631/jzus.b2100977>
36. Mitochondrial–Lysosomal Axis in Acetaminophen Hepatotoxicity / A. Moles et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00453>
37. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions / M. Yan et al. *Redox Biology*. 2018. Vol. 17. P. 274–283. URL: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.019>
38. Expression of mitochondrial membrane–linked SAB determines severity of sex-dependent acute liver injury / S. Win et al. *Journal of Clinical Investigation*. 2019. Vol. 129, no. 12. P. 5278–5293. URL: <https://doi.org/10.1172/jci128289>
39. Pleiotropic Role of p53 in Injury and Liver Regeneration after Acetaminophen Overdose / P. Borude et al. *The American Journal of Pathology*. 2018. Vol. 188, no. 6. P. 1406–1418. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.03.006>
40. Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014. Vol. 66. P. 75–87. URL: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07>
41. Branco V., Carvalho C. The thioredoxin system as a target for mercury compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2019. Vol. 1863, no. 12. P. 129255. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.11.007>

42. Anti-Inflammatory Thioredoxin Family Proteins for Medicare, Healthcare and Aging Care / J. Yodoi et al. *Nutrients*. 2017. Vol. 9, no. 10. P. 1081. URL: <https://doi.org/10.3390/nu9101081>
43. Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems / Y. Ouyang et al. *Metallomics*. 2018. Vol. 10, no. 2. P. 218–228. URL: <https://doi.org/10.1039/c7mt00327g>
44. Collet J.-F., Messens J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 13, no. 8. P. 1205–1216. URL: <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>
45. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69 / J. Haendeler et al. *Nature Cell Biology*. 2002. Vol. 4, no. 10. P. 743–749. URL: <https://doi.org/10.1038/ncb851>
46. Balsera M., Buchanan B. B. Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019. Vol. 140. P. 28–35.
47. The Thioredoxin System of Mammalian Cells and Its Modulators / A. A. Hasan et al. *Biomedicines*. 2022. Vol. 10, no. 7. P. 1757. URL: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071757>
48. Arnér E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases – Important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009. Vol. 1790, no. 6. P. 495–526. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.01.014>
49. Lèveillard T., Aït-Ali N. Cell Signaling with Extracellular Thioredoxin and Thioredoxin-Like Proteins: Insight into Their Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. Vol. 2017. P. 1–11. URL: <https://doi.org/10.1155/2017/8475125>
50. Lipid Raft–Mediated Uptake of Cysteine-Modified Thioredoxin-1: Apoptosis Enhancement by Inhibiting the Endogenous Thioredoxin-1 / N. Kondo et al. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007. Vol. 9, no. 9. P. 1439–1448. URL: <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1665>

51. Покотило О. С., Коваль М. І. Ліпідний статус плазми крові щурів різного віку при експериментальному парацетамоловому гепатиті та його корекція. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2009. Т. 2. № 46. С. 10 – 15.
52. Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *Journal Nutrition*. 1993. № 5. P. 1939-1951.
53. Копильчук Г. П., Волощук О. М. Активність NADH-убіхінонредуктази та сукцинатдегідрогенази в клітинах печінки щурів за умов токсичного гепатиту, індукованого ацетамінофеном на фоні аліментарної нестачі протеїну. *Укр. біохім. журн*. 2015. Т. 87. № 1. С. 20 – 25.
54. Arnér E. S., Holmgren. Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Current protocols in toxicology, Chapter 7*. 2001 P. 1–14.
55. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid. *Biochem J*. 1967. Vol. 104 (2), P. 627–633.
56. Салига Н.О. Активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту в щурів за дії L-глутамінової кислоти. *Український біохімічний журнал*. 2013. Т. 85. № 4, С. 1-8.
57. Буджак В. В. Біометрія: навчальний посібник. Чернівці: Чернівецький національний університет. 2013. 250 с
58. Finkel T., Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000. V. 408. P. 239–247.
59. Franchina D. G., Dostert C., Brenner D. Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. *Trends in Immunology*. 2018. Vol. 39, no. 6. P. 489–502.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.01.005>

60. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV / M. Benhar et al. *Journal of Clinical Investigation*. 2016. Vol. 126, no. 5. P. 1630–1639. URL: <https://doi.org/10.1172/jci85339>
61. The Role of the Thioredoxin Detoxification System in Cancer Progression and Resistance / M. Jovanović et al. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.883297>
62. Muri J., Kopf M. The thioredoxin system: balancing redox responses in immune cells and tumors. *European Journal of Immunology*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1002/eji.202249948>
63. Voloshchuk O. M., Kopylchuk G. P. Indicators of the energy supply system in the liver of rats under the conditions of different nutrients content in a diet. *Biopolymers and Cell*. 2021. Vol. 37. N 3. P. 259-269.
64. Копильчук Г.П., Николайчук І.М., Сорока В.З. Активність ензимів регенерації глутатіону в гепатоцитах щурів за умов нутрітивного дисбалансу. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. 2021. Т. 13(2). С. 115-121.
65. The NRF2, Thioredoxin, and Glutathione System in Tumorigenesis and Anticancer Therapies / M. Jaganjac et al. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, no. 11. P. 1151. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox9111151>
66. Thioredoxin (Trx): A redox target and modulator of cellular senescence and aging-related diseases / B. Yang et al. *Redox Biology*. 2024. Vol. 70. P. 103032. URL: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103032>
67. TrxR/Trx inhibitor butaselen ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing NF-κB/TGF-β1/Smads signaling / Y. Chen та ін. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023. Т. 169. С. 115822. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115822>
68. The integration of TRX/GRX systems and phytohormonal signalling pathways in plant stress and development / A. Jiménez et al. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2023. P. 108298. URL: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108298>

69. TXNIP: A Double-Edged Sword in Disease and Therapeutic Outlook / M. Pan et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022. Vol. 2022. P. 1–14. URL: <https://doi.org/10.1155/2022/7805115>
70. Копильчук Г.П., Николайчук І.М., Калюжна Ю.А. Особливості метаболічних перетворень гомоцистеїну та цистеїну в гепатоцитах щурів за умов нутритивного дисбалансу. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*. 2020. Т. 12, вип. 2. С. 141-149.
71. Inhibition of Thioredoxin/Thioredoxin Reductase Induces Synthetic Lethality in Lung Cancers with Compromised Glutathione Homeostasis / X. Yan et al. *Cancer Research*. 2018. Vol. 79, no. 1. P. 125–132. URL: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-1938>
72. Копильчук Г., Николайчук І., Урсатий М. Редокс-потенціал глутатіону в печінці різновікових груп щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Молодіжна наука заради миру та розвитку» присвяченій Всесвітньому дню науки (8-10 листопада 2023 року, м. Чернівці). Чернівці: Чернівець. нац. ун-т. ім. Ю. Федьковича, 2023. С. 65-68.
73. Glutaredoxin catalysis requires two distinct glutathione interaction sites / P. Begas et al. *Nature Communications*. 2017. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms14835>

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

1. У біохімічній лабораторії повинні бути в наявності протипожежні засоби (вогнегасник, пісок, вода), аптечка для надання першої медичної допомоги та засоби особистого захисту (гумові рукавички, захисні окуляри тощо).
2. У лабораторії заборонено вживати їжу, палити.
3. Працювати слід у спецодязі (халатах). Під час роботи з великими об'ємами концентрованих кислот та їх наливання доцільно додатково використовувати захисні окуляри.
4. Після роботи з реактивами слід вимити руки, а після роботи з токсичними сполуками – вимити руки, почистити зуби, промити ротову порожнину, змінити одяг.
5. Усі реактиви повинні бути у зразковому стані відповідно до вимог зберігання.
6. Під час роботи з реактивами не можна торкатися обличчя, очей та відкритих ділянок шкіри.
7. Роботи, пов'язані з виділенням газів, потрібно проводити лише під витяжною шафою.
8. Заборонено пробувати реактиви на смак, вдихати леткі речовини – вони можуть бути отруйними.
19. Для приготування розчинів речовини треба відбирати шпателем, кількісно переносити їх у мірні стакани чи колби. Готові реактиви належить зберігати в закритому посуді з етикетками, на яких позначено назву, формулу сполуки, концентрацію та дату приготування.
10. Перед проведенням досліджень необхідно ретельно вивчити методику та підготувати робоче місце.
11. Перед використанням приладів слід детально ознайомитися з інструкцією.
12. Необхідно дотримуватись правил техніки безпеки під час роботи з електроприладами та обладнанням.
13. Залишки реактивів слід зливати до спеціальних ємностей для відходів.

14. При роботі з бромом слід пам'ятати, що це дуже отруйна речовина, яка небезпечна для слизової оболонки і утворює на шкірі опіки, які важко загоюються. Всі роботи слід проводити у витяжній шафі. У випадку опіку бромом, обпечене місце обробляють спиртом, потім направляють до медичного закладу.

15. При потраплянні кислот на шкіру необхідно швидко промити уражене місце водою, а потім 3% розчином соди. При опіках лугами потрібно промити уражене місце водою, а потім 3% розчином оцтової кислоти. При попаданні кислоти або лугу до очей необхідно промити великою кількістю води, а потім обробити тампоном, який змочений у розчині соди або борної кислоти і знову промити водою.

16. Концентровані кислоти, луги, отруйні та з сильним запахом речовини зберігають обов'язково в добре вентильованій шафі.

17. Легкозаймисті та вибухонебезпечні речовини повинні зберігатись у металевих шафах у кількостях, які не перевищують щоденну потребу.

18. При роботі зі склом і хімічним посудом необхідно бути обережним.

19. Забороняється змішувати органічні речовини і проводити досліди, які не пов'язані з програмою.

Правила роботи з центрифугою

1. Центрифуга поміщається на стійкому, важкому столі.
2. Під час центрифугування кришка центрифуги повинна бути щільно закрита.
3. Пробірки для центрифуг після заповнення рідиною повинні мати однакову масу та бути зрівноваженими.
4. У пробірки не потрібно наливати надто багато рідини, їх заповнюють так, щоб відстань від краю до рівня рідини була не меншою 10мм.
5. Центрифугувати можна тільки парне число пробірок. Якщо число пробірок непарне, те ставлять одну пробірку з дистильованою водою. Попередньо пробірки з рідиною повинні бути попарно урівноважені і парні пробірки поміщають у центрифугу одна навпроти другої.

6. Після вимикання центрифуги не можна відчиняти кришку, поки не закінчиться обертання. Лише після цього виймають пробірки.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

1. По закінченню тієї чи іншої операції необхідно вимкнути газ та електроприлади, що використовувалися при виконанні даної роботи.
2. Посуд, у якому проводили роботу із вогненебезпечними реактивами, після закінчення роботи повинен бути одразу вимитий.
3. По закінченні роботи привести до ладу робоче місце, прилади та апаратуру. Вимкнути головний газовий кран, головний електрорубильник, вентиляцію та світло, а також перевірити, чи видалені з приміщення лабораторії надлишки горючих та легкозапальних речовин, відпрацьовані рідини, сміття, промаслене ганчір'я.
4. Перевірити, чи весь посуд із реактивами закритий пробками та покладений на відведені місця.

