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

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

# Глутатіонпероксидазна активність у клітинах печінки щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну

**Кваліфікаційна робота**

**Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)**

***Виконала:***
студентка 4 курсу, 400 А групи
спеціальності 091 Біологія
**Броневич Христина Василівна**
***Керівник:***
кандидат біологічних наук,
асистент **Николайчук І.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол №____від_____2023 р.
Зав. кафедрою_____проф. Копильчук Г.П.

**Чернівці – 2023**

## *Анотація*

Бакалаврська робота присвячена присвячена дослідженню активностей селенозалежної та селенонезалежної глутатіонпероксидаз у цитозольній та мітохондріальній фракціях печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну.

Зниження загальної глутатіонпероксидазної активності в цитозольній фракції печінки щурів відбувається за рахунок зменшення рівня Se-GPx (< 2,2 рази, $p \leq 0,05$ ) лише в групах тварин, яким вводили токсичні дози ацетамінофену незалежно від кількості протеїну в харчовому раціоні.

У мітохондріальній фракції тварин з ацетамінофен-індукованим ураженням незалежно від кількості харчового протеїну нами зареєстровано одночасне зниження активностей як Se-non-GPx, так і Se-GPx порівняно зі значеннями контролю.

Отже, токсичне ураження ацетамінофеном виступає ключовим чинником зниження загальної глутатіонпероксидазної активності в печінки щурів: у мітохондріальній фракції – за рахунок зменшення рівня обох ізоформ даного ензиму, тоді як у цитозолі лише за рахунок селенозалежної форми ензиму.



***Ключові слова:*** селенозалежна глутатіонпероксидаза, селенонезалежна глутатіонпероксидаза, глутатіон, печінка, ацетамінофен, аліментарна депривація протеїну

## *Annotation*

The bachelor's thesis is devoted to the study of the activities of selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidase in the cytosolic and mitochondrial fractions of the liver of rats under the conditions of toxic damage with acetaminophen against the background of dietary protein deficiency.

A decrease in the total glutathione peroxidase activity in the cytosolic fraction of the liver of rats occurs due to a decrease in the level of Se-GPx (< 2.2 times, $p \leq 0.05$) only in groups of animals that were injected with toxic doses of acetaminophen regardless of the amount of protein in the diet.

In the mitochondrial fraction of animals with acetaminophen-induced damage, regardless of the amount of dietary protein, we recorded a simultaneous decrease in the activities of both Se-non-GPx and Se-GPx compared to control values.

Therefore, toxic damage by acetaminophen is a key factor in the reduction of total glutathione peroxidase activity in the liver of rats: in the mitochondrial fraction - due to a decrease in the level of both isoforms of this enzyme, while in the cytosol only due to the selenium-dependent form of the enzyme



***Key words:*** seleno-dependent glutathione peroxidase, seleno-independent glutathione peroxidase, glutathione, liver, acetaminophen, dietary protein deprivation


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

**_____ Х.В. Броневич**

**(підпис)**

**ЗМІСТ**

**ВСТУП…** ..... **5**

**РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ…** ..... **7**

1.1. Будова та функції глутатіонпероксидаз ..... 7

1.2. Езиматичний механізм глутатіонпероксидаз ..... 8

1.3. Ізоформи глутатіонпероксидаз ..... 11

1.4. Роль глутатіонпероксидаз у розвитку патологічних станів ..... 13

1.5. Глутатіонпероксидаза 4 як головний регулятор фероптозу ..... 14

**РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ** ..... **20**

2.1. Об’єкти та методи досліджень ..... 20

2.2. Виділення мітохондріальної фракції ..... 21

2.3. Отримання цитозольної фракції ..... 21

2.4. Визначення активностей селенозалежної та селенонезалежної ізоформ глутатіонпероксидази ..... 23

2.5. Статистичний аналіз даних ..... 24

**РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ** ..... **25**

**ВИСНОВКИ…** ..... **28**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ** ..... **29**

**ДОДАТКИ** ..... **34**

# ВСТУП

Внутрішньоклітинні активні форми кисню (АФК) продукуються всіма клітинами організму як за фізіологічних умов, так і при патологічних станах. АФК в основному генеруються у ході мітохондріального дихання та окисно-відновними ферментами, такими як синтаза оксиду азоту, ізоформи цитохрому Р-450 і підтипи НАДФН-оксидази (NOX), у формі супероксиду [1]. Ці короткоживучі АФК можуть поєднуватися з оксидом азоту (NO) з утворенням високореакційноздатного пероксинітриту (реакційноздатний вид азоту або можуть спонтанно чи ферментативно дисмутувати з утворенням перекису водню та молекулярного кисню [2].

Пероксид водню також може утворюватися 2-електронним відновленням кисню різними оксидоредуктазами, включаючи ксантиноксидазу, яка, згідно з останніми даними, переважно виробляє пероксид водню. Нещодавні дослідження також показують, що НАДФН-оксидази можуть переважно виробляти пероксид водню, а не супероксидний аніон, який є основним АФК, що виробляється іншими ізоформами НАДФН-оксидазази. Пероксид водню має довший період напіврозпаду, ніж супероксид, і на відміну від супероксиду, пероксид водню може переходити через ліпідні мембрани шляхом дифузії або транспорту через канали, такі як аквапорини [3].

Надлишок пероксиду водню також може призвести до окислення сприйнятливих тіолів клітинного білка до сульфенових (SOH) або сульфінових ($SO_2H$) кислот та необоротного окислення до сульфонової ($SO_3H$) кислоти. Однак низькі рівні пероксиду водню підтримують істотні модифікації білкових тіолів, включаючи утворення внутрішньо- та міжмолекулярних дисульфідів (включаючи змішані дисульфіди з низькомолекулярними тіолами, такими як відновлений глутатіон [GSH]) [4]. Крім того, при низьких рівнях пероксид водню відіграє роль другого месенджера в передачі сигналу, модулюючи ступінь окислення окислювально-відновних цистеїнів (Cys) для сприяння функції кінази. Позаклітинна супероксиддисмутаза (SOD), цитозольна мідь, цинк-SOD і мітохондріально розташована марганцева SOD (MnSOD) відіграють основну

роль в утворенні пероксиду водню, тоді як глутатіонпероксидази (GPxs), каталаза та пероксиредоксини відіграють важливу роль у ферментативному катаболізм цієї АФК.

Глутатіонпероксидази (ЕС 1.11.1.9, GPx) – це сімейство антиоксидантних ензимів, які каталізують реакції відновлення пероксиду водню та гідропероксидів ліпідів, використовуючи відновлений глутатіон (GSH) як кофермент. Функції даних ензимів визначаються їх внутрішньоклітиною локалізацією.

Вирізняють дві ізоформи GPx: селенозалежна (Se-GPx) та селенонезалежна (Se-non-GPx), активність яких найвища в печінці. Se-GPx містить Se у активному центрі, що робить її ефективнішою за умов оксидативного стресу, ніж Se-non-GPx [5].

Тому ***метою роботи*** стало дослідження активностей селенозалежної та селенонезалежної глутатіонпероксидаз у цитозольній та мітохондріальній фракціях печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну.

# РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

## 1.6. Будова та функції глутатіонпероксидаз

Глутатіонпероксидази (GPxs) ефективно відновлюють гідропероксиди до відповідних спиртів. Усі члени цього сімейства білків містять ключовий пероксидний залишок, або селеноцистеїн (Sec), або цистеїн (Cys), який реагує з гідропероксидами з ефективністю, майже обмеженою дифузією. Ці ферменти забезпечують антиоксидантний захист шляхом поглинання активних форм кисню та азоту. Однак, хоча GPx є критично важливими для детоксикації, їхня фізіологічна роль є більш тонкою та виходить далеко за рамки простого видалення небезпечних вільних радикалів. Вони беруть участь у регуляції запалення, апоптозу та інших сигнальних каскадів ключових біологічних процесів [6].

Один із найбільш очевидних із цих регуляторних механізмів базується на субстратах GPx. Гідропероксиди самі по собі є сигнальними молекулами і їх клітинні концентрації під впливом дії GPxs безпосередньо керують сигнальними шляхами. Але, як нещодавно було розглянуто [7], інші механізми, які GPx використовують для виконання своїх регуляторних функцій, включають білкові партнери та окислення Cys у специфічних білках, зміни в локалізації та навіть хімічне перехресне зшивання. Дійсно, деякі GPx є фактично неефективними пероксидазами і, здається, в основному використовуються в окисно-відновній регуляції. Незважаючи на те, що повної картини ще немає, здається, що взаємодія між ферментативною активністю GPxs і фізіологічними функціями відіграє важливу роль у клітинному житті.

Ферментативний цикл Sec-вмісних GPx (п’ять із восьми людських GPx містять Sec) ініціюється окисленням селеноляту ($Se^-$) пероксидним субстратом з утворенням селенової кислоти (SeOH). Селенова кислота легко реагує з тіолами, найчастіше з трипептидом глутатіоном (γ-L-глутаміл-L-цистеїнілгліцин, GSH). Ця реакція конденсації генерує міжмолекулярний селенілсульфідний зв’язок, який, у свою чергу, відновлюється другим GSH з утворенням окисленого глутатіону (GSSG) і регенерації ферменту. Кінетика GPxs добре охарактеризована та слідує механізму заміни ферменту (пінг-понг) [8]. Більшість

кроків запропонованого механізму підтверджено експериментально, але передбачуваний проміжний продукт селенової кислоти (GPx-SeOH) поки що не виявлений. Постійна невдача виявлення селенової кислоти спонукала до обговорення альтернативних механізмів. Зокрема, селенова кислота швидко конденсується з амідом або аміном з утворенням селеніламідного зв'язку (SeN), аналогічно зв'язку, що утворюється в імітаторі GPx ебселену (2-феніл-1,2-бензіселеназол-3(2H)-он)) [9]. Однак наявність селенової кислоти або селеніламіду ще має бути підтверджена експериментально.

Утворення селенової кислоти часто викликається в механізмах реакції селенопротеїнів, групи Sec-вмісних ферментів, які є критичними для управління окисним стресом. Однак через їх високу хімічну реакційну здатність ці передбачувані проміжні продукти реакції раніше не були виділені в нативному селенопротеїні. Дійсно, селенову кислоту було виявлено лише в кількох органічних молекулах, де жорсткий і громіздкий молекулярний каркас стабілізував її, через її схильність до самоконденсації та її окислювальну здатність [10].

### 1.2. Езиматичний механізм глутатіонпероксидаз

Усі глутатіонпероксидази демонструють механізм пінг-понгу. Механізм $GP_X$ включає два етапи — реакцію окислення з наступною реакцією відновлення [11]. Перший етап складається з окислення відновленої сполуки типу гідропероксиду ферменту $GP_X$, тоді як другий етап є серією відновлення окисленого ферменту $GP_X$ сполукою, що містить тіол, такою як відновлений кофактор глутатіон (GSH). У каталітичному центрі $GP_X$ і під час початкової стадії селеноцистеїн або цистеїн окислюється до селенової або цистеїнової кислот. У той же час токсичний гідропероксид перетворюється на відповідний нешкідливий спирт. Вважається, що цей етап відбувається без стандартного утворення фермент-субстратного комплексу, що забезпечує неймовірно швидке відновлення субстрату. Дійсно, константа швидкості фази окиснення становить близько $10^8$ $M^{-1}$, яка є одним із найшвидших, коли-небудь визначених для бімолекулярних ферментативних реакцій [11].

Фаза відновлення включає два наступних етапи, на першому утворюється глутатіонільований проміжний фермент GPx, де окислена GPx реагує з першим еквівалентом GSH. На наступному етапі другий еквівалент GSH реагує з глутатіонільованим проміжним продуктом з утворенням стабільного продукту GSSG, і це дозволяє вивільнити відновлений селен або цистин для наступного каталітичного циклу.

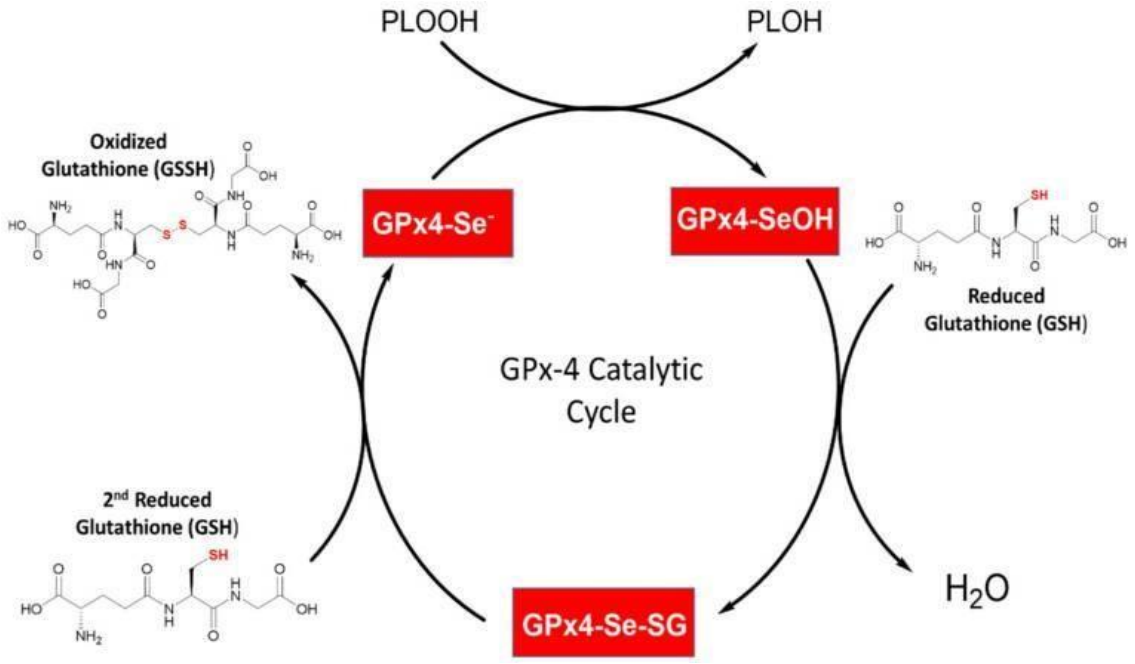



**Рис. 1.2.1. Каталітичний цикл GPx4 [13]**

Глутатіонпероксидази (GPx) мають різноманітний спектр окислювальних субстратів. Більшість GPx зменшують кількість невеликих органічних гідропероксидів, але не здатні зменшувати вміст складних гідропероксиди, таких як гідропероксиди ліпідів або холестерол. Єдиним винятком із цього є GPX4, яка унікальна тим, що вона є єдиним ферментом GPX, яка здатна знижувати концентрацію гідропероксидів ліпідів і холестеролу, навіть якщо вони вбудовані в біологічну мембрану [13].

Глутатіон (GSH) є найбільш використовуваним субстратом GPX, хоча GPX4 має унікальну здатність використовувати інші білкові тіоли на додаток до GSH.

Ферментативна дія GPx-1 пов’язує його з внутрішньоклітинною окислювально-відновною парою GSH/GSSG, попереджаючи окислювально-відновний стрес у клітині. Побічно GPx-1 також пов'язана з $NADP^+$/NADPH редокспарою, яка бере участь у відновленні нормального співвідношення GSH/GSSG. GPx-1 окислення GSH також може впливати на пентозофосфатний шлях, активність якого регулюється співвідношенням $NADP^+$/NADPH [14].

Ферментативна інактивація пероксидів за допомогою GPx включає утворення кількох стабільних проміжних модифікацій селеноцистеїну активного центру (Sec) (рис. 1.2.2) [15]. Таким чином, селенол GPx-SeH (з -SeH, що представляє активний центр Sec) утворює селенову кислоту (Se-OH) після реакції з пероксидами (№ 1 на рисунку). Одна молекула GSH відновлює селененову кислоту, що призводить до проміжного продукту Se-SG (№ 2 на рисунку), який відновлюється другим GSH, що призводить до утворення GSSG (№ 3 на рисунку).

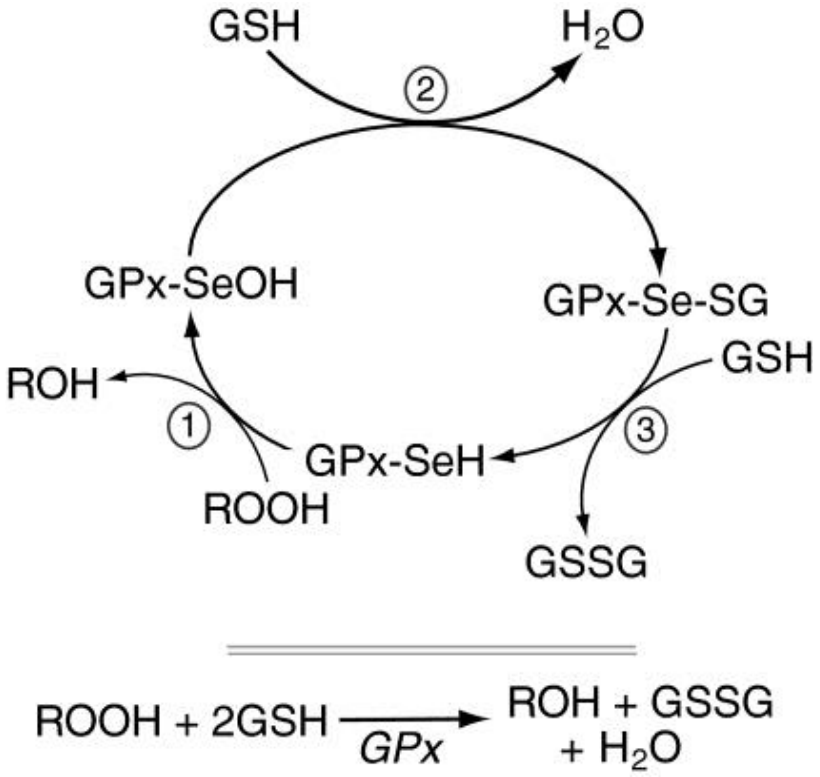



**Рис. 1.2.2. Послідовні реакції відновлення пероксоду водню Глутатіонпероксидазою**

## 1.3. Ізоформи глутатіонпероксидаз

У тканинах ссавців існують чотири основні селензалежні ізоферменти GPx: класична GPx1, яка міститься в еритроцитах, печінці, легенях і нирках; шлунково-кишкова GPx2; плазмова GPx3, яка присутня у різних органах, таких як нирки, легені, придаток яєчка, сім'явиносна протока, плацента, сім'яний пухирець, серце та м'яз та фосфоліпідна GPx4, яка також широко поширені в різних тканинах. Два інших ізоферменти, GPx5 і GPx6, ідентифіковані у ссавців, обидва тісно пов'язані з GPx3. Однак GPx5 не має селеноцистеїну в активному центрі і секретується в придатку яєчка . GPx-6 була ідентифікована у людей і свиней і є селен-залежною GPx, знайдена в нюховому епітелії [16].

GPX1 – це поширений гомотетрамерний білок, локалізований в цитозолі,мітохондріях та ядрі. Цей фермент використовує виключно GSH як субстрат для відновлення $H_2O_2$ та обмеженої кількості органічних гідропероксидів, включаючи гідропероксид кумолу та третбутилгідропероксид. Реакції, опосередковані GPX1, означають, що цей фермент бере участь у клітинних процесах, модульованих гідропероксидами, включаючи передачу сигналів цитокінів та апоптоз [17]. GPX1 – найбільш чутливий до змін як статусу Se, так і умов оксидативного стресу, але виявляється, що глобальний синтез білка знижується в умовах стресу як засіб резервування клітинних ресурсів, і що GPX1 швидко відновлюється порівняно з іншими Se-білками [18].

GPX2 являє собою секретований гомотетрамерний фермент, локалізований в цитозолі та ядрі. який в основному експресується в слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту, включаючи плоский епітелій стравоходу; і у людей він також виявляється в печінці. Функція GPX2 в основному полягає у захисті епітелію кишечника від оксидативного стресу та гарантії гомеостазу слизової оболонки [19]. GPX2 проявляє субстратну специфічність, подібну до GPX1, яка включає $H_2O_2$, третбутилгідропероксид, гідропероксид кумолу та гідропероксид лінолевої кислоти, але не гідропероксид фосфатидилхоліну. Експресія GPX2 набагато стійкіша, ніж GPX1 або GPX3, до дефіциту Se в їжі.

Розташування та резистентність GPX2 свідчать про те, що цей Se-білок може слугувати першою лінією захисту під час впливу оксидативного стресу, спричиненого прооксидантами, що вживаються, або мікробіотою кишечника [20].

GPX3 є єдиним позаклітинним ферментом із сімейства GPXs, міститься в цитозолі. Це глікозильований гомотетрамерний білок, що утворюється в клітинах проксимального епітелію канальців і в парієтальних клітинах капсули Боумена нирки. Частина GPX3 потім виділяється в плазму, де вона становить приблизно 15–20% загального Se, але основна частина залишається зв'язаною з базальними мембранами в нирках. І білок GPX3, і мРНК також були виявлені в кількох тканинах, зокрема в серці та щитоподібній залозі, де цей фермент може відігравати роль як місцеве джерело позаклітинної антиоксидантної активності. На відміну від GPX1, GPX3 має більш обмежену специфічність гідропероксидного субстрату. Хоча він може відновлювати $H_2O_2$ і ті ж органічні гідропероксиди, його активність приблизно в 10 разів нижча за активність GPx1 [21].

GPX4 є мономерним внутрішньоклітинним ферментом, що представляє три ізоформи: цитозольні, мітохондріальні та ядерні. Експресія та активність цього білка задокументовано в багатьох тканинах, зокрема в ендокринних органах і в мітохондріях в середній частині сперматозоїдів, і регулюється гормонами [22]. На відміну від інших GPX, він може безпосередньо використовувати гідропероксид фосфоліпідів як субстрат і зменшувати кількість $H_2O_2$ , холестеролу, ефірів холестеролу та гідропероксиду тиміну, використовуючи електрони з тіолів білка, а також від GSH. GPX4 відіграє важливу роль антиоксидантного захисту під час диференціювання клітин в ембріональному розвитку та в сперматогенезі та бере участь у конденсації хроматину під час сперматогенезу[23].

GPX6 є близьким гомологом плазмового GPX3. Порівняно з іншими білками GPX, GPx6 був ідентифікований досить пізно, оскільки його ортологи

миші та щури мали Cys замість SeCys. Цей фермент експресується лише в ембріонах та нюховому епітелії, і його специфічна функція залишається невідомою.

### 1.4. Роль глутатіонтрансфераз у розвитку патологічних станів

Основна роль GPX як оксидоредуктаз є важливою, оскільки вона допомагає запобігти окислювальному стресу та окислювальному пошкодженню, які є визначними біомаркерами захворювань людини [24]. GPX добре відомі своєю роллю в захворюваннях, що характеризуються окисними пошкодженнями. Нещодавні дослідження показали, що окислювальні пошкодження були залучені до нейродегенерації, як-от хвороби Альцгеймера та Паркінсона [25], рак [26], цукровий діабет та серцево-судинні захворювання [27].

Окислювальний стрес характеризується дисбалансом між прооксидантними формами (наприклад, активними формами кисню і активними формами азоту, які сприяють окисленню, та антиоксидантними ферментами (наприклад, GPX і трансферином), які пригнічують це окислення.

Незбалансовані АФК в організмі можуть спричинити пошкодження ДНК, ліпідів і білка, що призведе до пошкодження клітини та навіть може призвести до її загибелі. Основною причиною окисного стресу є підвищене виробництво або накопичення високореакційних сполук, що містять кисень і азот відповідно [26]. Під час енергетичного метаболізму центральна роль мітохондрій полягає в окисному фосфорилюванні, яке генерує АТФ за допомогою процесів, включаючи цикл трикарбонових кислот та ланцюг транспортування електронів. У недавній статті було зроблено відкриття, що інгібування мітохондріального циклу мінімізує накопичення пероксидів ліпідів і фероптоз. Завдяки великій кількості АФК у мітохондріях такі антиоксиданти, як GPX4, відіграють важливу роль у захисті мітохондрій від окисного пошкодження. Дійсно, нокдаун GPX4 призводить до підвищення рівня мітохондріальних ROS і подальшого зниження потенціалу мітохондріальної мембрани.

Відновлений глутатіон (GSH) і пов’язані з ним ферменти становлять ключову антиоксидантну систему в організмі для протидії окисному стресу . Серед цих ферментів глутатіонпероксидаза (GPx), які можуть детоксикувати активні форми кисню (АФК), включаючи перекис водню та вільні радикали, у присутності GSH.

Було показано, що GPx3, на який припадає понад 97% усього селену в плазмі мишей, підвищується при пошкодженні печінки, спричиненому алкоголем, для захисту печінки від окисного стресу.

Цікаво, що АФК відіграють подвійну роль в організмі людини. Надлишок їх може викликати окислення макромолекул і органел в організмі, що призводить до окисного стресу.

Однак АФК також можуть мати нешкідливий вплив. Вони часто функціонують як фізіологічні регулятори внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, опосередковують окислювально-відновні модифікації білків і функціонують як внутрішньоклітинні месенджери, відіграючи ключові ролі в організмі людини. Оскільки АФК важливі для фізіології людини та можуть викликати негативні ефекти, правильна регуляція АФК/окисно-відновного гомеостазу має вирішальне значення. Таке підтримання клітинного гомеостазу досягається головним чином за допомогою глутатіонпероксидази та інших сімейств оксидоредуктаз. Тому глутатіонпероксидази відіграють вирішальну роль у здоров'ї та захворюваннях людини [28].

### 1.5. Глутатіонпероксидаза 4 як головний регулятор фероптозу

Регульована клітинна смерть (RCD) є висококонтрольованою модальністю, що включає жорстко структуровані сигнальні каскади та ефекторні механізми. Правильна функція RCD необхідна для розвитку та підтримки гомеостазу тканин і як механізм для усунення пошкоджених клітин. RCD є особливо актуальним для нейродегенеративних захворювань, раку та розвитку багатоклітинних організмів [29]. Розробка терапевтичних засобів для лікування раку

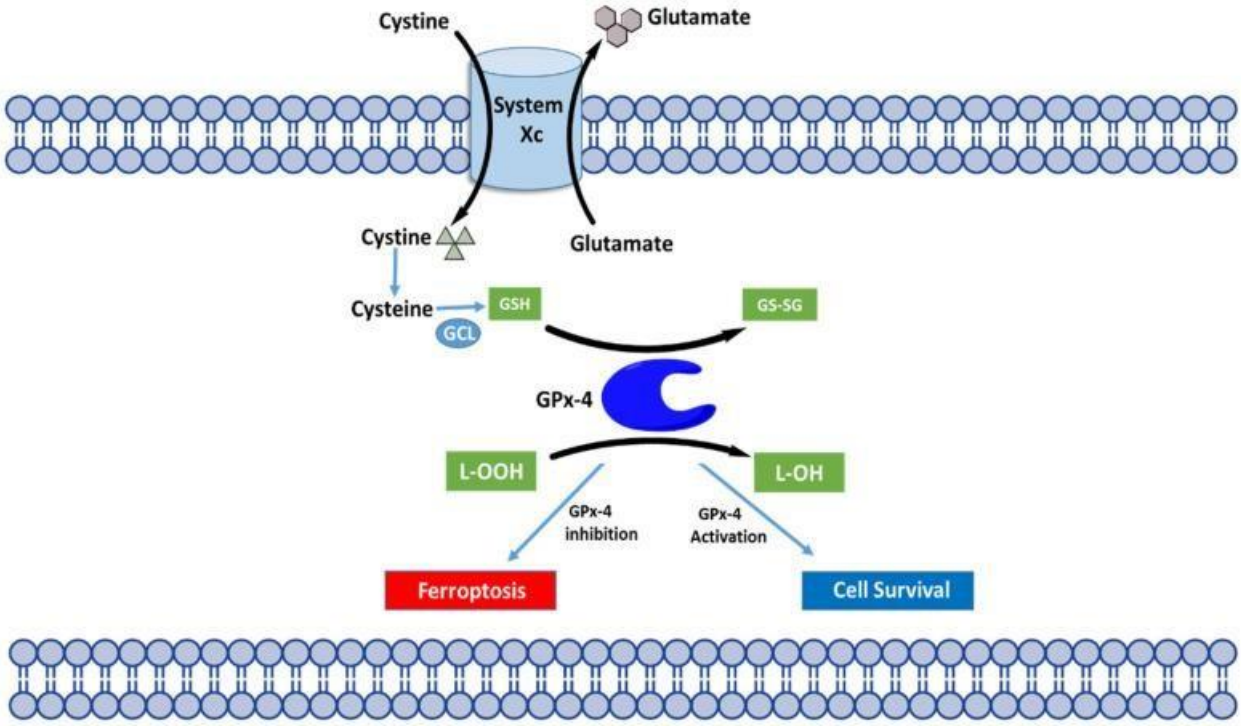
та інших захворювань, що характеризуються аномаліями RCD, вимагає всебічного розуміння безлічі механізмів загибелі клітин та їх підтипів. Механізми клітинної смерті в клітинах ссавців традиційно класифікуються як апоптотичні, некроптотичні або аутофагічні. Проте в останні роки було відкрито декілька нових форм загибелі клітин, і вважається, що може існувати набагато більше. Форма регульованої клітинної смерті під назвою «фероптоз» стала гарячою точкою в біомедичних дослідженнях, оскільки вона відіграє вирішальну регуляторну роль у вражаючій різноманітності захворювань людини. Нещодавно фероптоз був залучений як механізм нейродегенерації при хворобі Альцгеймера і як механізм нейрозапалення при хворобі Паркінсона [30].

Фероптоз розглядається як новий терапевтичний засіб для кількох нейродегенеративних розладів, включаючи хворобу Альцгеймера, Паркінсона та Хантінгтона. Ранні дослідження загибелі клітин, характерної для фероптозу, відносяться до 1950-х і 1960-х років під керівництвом Гаррі Ігла, який продемонстрував, що виснаження цистеїну зменшує вміст глутатіону і призводить до загибелі клітин, тоді як синтез цистеїну захищає клітинну смерть шляхом відновлення глутатіону. Крім того, антиоксидант під назвою $\alpha$-токоферол (тип вітаміну Е) врятував клітинну смерть незалежно від глутатіону. Група під керівництвом Джозефа Койла встановила спричинену глутаматом загибель клітин, залежну від пригнічення транспорту цистину, що пізніше було названо окситозом у 2001 році та розглядається сьогодні як підтип фероптозу.

У 2012 році термін «Ferroptosis» був названий і охарактеризований як додаткова запрограмована загибель клітин, чутливих до перекисного окислення заліза та ліпідів. Особливості ферроптотичної загибелі клітин, особливо в порівнянні з іншими формами загибелі клітин, були вичерпно описані в нещодавній статті [31]. Коротко кажучи, на морфологічному рівні клітини, індуковані фероптозом, мають зменшений об’єм мітохондрій, підвищену щільність двошарової мембрани та зменшення мітохондріальних крист. Біохімічно клітини демонструють виснаження внутрішньоклітинного глутатіону та подальше зниження активності GPX4. Це віщує життєво важливу роль, яку відіграє

GPX4 у регуляції смерті фероптотичних клітин. Сучасне розуміння генетичної основи фероптозу є неповним і може залежати від конкретного захворювання. Загалом, на генетичному рівні фероптоз, імовірно, включає генетичні зміни в гомеостазі заліза та метаболізмі перекисного окислення ліпідів.

Фероптоз викликається перекисним окисленням ліпідів і регулюється на багатьох рівнях. Як правило, це характеризується тим, що клітини накопичують пероксиди ліпідів і не можуть використовувати внутрішні захисні системи, які повинні виводити ці пероксиди ліпідів. Це спричиняє накопичення пероксиду водню до смертельних рівнів, що пошкоджує фосфоліпіди, з яких складається клітинна мембрана, і зрештою спричиняє загибель клітин. Існує три основні регуляторні рівні фероптозу: (1) Xc/GSH/GPX4, (2) NAD(P)H/FSP1/CoQ10 і (3) GCH1/BH4/DHFR. Системний шлях Xc/GSH/GPX4 був першим відкритим і сьогодні визнаний центральним елементом механізму фероптозу [32].




Перекисне окислення фосфоліпідів, спричинене фероптозом, опосередковується регуляторним шляхом цистеїн/GSH/GPX4. Антипортер системи Xc

опосередковує обмін позаклітинного цистину з внутрішньоклітинним глутаматом. Коли цистин засвоюється, він відновлюється до цистеїну, який є одним із попередників для біосинтезу GSH. GPX4 використовує GSH як кофактор для відновлення токсичних пероксидів ліпідів у відповідні спирти. Виснаження або GSH, або GPX4 спричинить збільшення пероксидів ліпідів, що пошкодить клітинну мембрану та призведе до фероптотичної загибелі клітин — форми загибелі клітин, пов'язаної з різноманітними захворюваннями людини.

Характерною ознакою фероптозу є накопичення гідропероксидів фосфоліпідів у присутності каталітично активного заліза. Цей процес природно гальмується регулятивним шляхом системи Xc/GSH/GPX4. Найвищим компонентом цього шляху є гетерометричний антипортер, відомий як система Xc, який широко поширений у біологічних мембранах. Антипортер опосередковує поглинання цистину клітинами, що є важливим для біосинтезу GSH [33].

GSH також функціонує як кофактор для опосередкованого GPX4 антиоксидантного захисту. Система Xc складається з двох центральних компонентів: сімейства переносників розчиненої речовини 3 члена 2 (SLC3A2) і члена сімейства носіїв розчиненої речовини 7 члена 11 (SLC7A11). Ряд генів-супресорів пухлин, включаючи p53 і BRCA-1-асоційованого 1 (BAP1), пригнічують SLCA11 і загальну активність системи Xc. Порушення системи Xc (наприклад, глутамат, ерастин, сульфасалазин і сорафеніб), виснаження GSH (наприклад, бутіонінсульфоксимін) або інгібування GPX4 (наприклад, RSL3, ML162, Fin56). На додаток до шляху Xc/GSH/GPX4, 2 додаткові шляхи визнані основними шляхами в системі фероптозу; системи NAD(P)H/FSP1/CoQ10 і GCH1/BH4/DHFR. Деталі цих шляхів були вичерпно описані в нещодавньому огляді [34].

Важливою, але дещо суперечливою особливістю фероптозу є розуміння того, як задіяно залізо. Сучасне розуміння, засноване на дослідженнях кількох груп, полягає в тому, що ферменти, що утворюють гідропероксид, які називаються ліпоксигеназами (LOX), можуть ініціювати фероптоз шляхом утворення пероксидів ліпідів. Потім відповідне залізо (залізо, не зв'язане з ферментами)

поширює ці пероксиди ліпідів і призводить до ланцюгової реакції перекисного окислення ліпідів [35]. Також вважається, що інші залізозалежні ферменти можуть сприяти перекисному окисленню ліпідів за певних обставин.

GPX4 був вперше визнаний у 2014 році як ключовий регулятор смерті фероптотичних клітин Yang та ін. Серед трьох відомих ізоформ GPX4 (тобто мітохондріальна, цитозольна та ядерна) лише цитозольна ізоформа (c-GPX4) потрібна для профілактики фероптозу. Унікальна функція GPX4 зменшувати складні гідропероксиди, включаючи гідропероксиди фосфоліпідів і холестерину, захищає біологічні мембрани від ланцюгової реакції перекисного окислення ліпідів, яка інакше призвела б до загибелі клітин фероптозу. Сьогодні GPX4 розглядається в біомедицині як популярна генетична та фармацевтична мішень для лікування, спрямованого на індукування або пригнічення загибелі клітин фероптозу [36]. Як згадувалося раніше, окислення молекул вуглецю в мітохондріях під час клітинного дихання має важливе значення для генерації енергії для клітини у формі АТФ, але воно також призводить до утворення активних форм кисню. На додаток до мітохондрій, АФК можуть також утворюватися ферментами ліпідного обміну, такими як ліпоксигенази. Накопичення ROS може призвести до окислення фосфоліпідів, вбудованих у мембрану, що призводить до загибелі клітин через накопичення перекисного окислення ліпідів. GPX4 є центральним посередником цього процесу через його роль у перетворенні токсичних гідропероксидів ліпідів (R-OOH) на доброякісні ліпідні спирти (R-OH), використовуючи відновлений GSH як кофактор. Ця специфічна роль GPX4 запобігає накопиченню АФК і рятує клітинні мембрани від пошкодження. Крім того, GPX4 є селенопротеїном, Таким чином, чутливість клітин до фероптозу пов'язана з наявністю селену. Дійсно, у дослідженнях доставки селену до клітин або тварин було виявлено, що він пригнічує фероптоз, ймовірно, тому, що покращує окиснювальну ефективність GPX4. Умови, які знижують рівень або активність GPX4, негайно впливають на виживання та здоров’я клітин. GPX4-нульові миші зазнають ембріональної летальності, тоді як умовні GPX4-мутантні миші призводять до фероптозу, нейродегенерації,

втрата противірусного імунітету, безпліддя та ішемічно-реперфузійне ураження нирок і печінки [37].

Хоча існує значна терапевтична користь від фармацевтичного націлювання на GPX4, унікальні структурні особливості білка ускладнюють розробку низькомолекулярних індукторів та інгібіторів. GPX4 не має зв'язувальної кишені, подібної до ліків, і для належної ферментативної активності він покладається на нуклеофільний залишок селеноцистеїну. Ці особливості можуть означати, що для інгібування клітинного GPX4 потрібні ковалентні інгібітори, які часто мають низьку селективність і фармакокінетичні властивості. Модулятори фероптозу можна загалом класифікувати на три категорії: (1) інгібітори системи xc, (2) інгібітори GPX4 і (3) сполуки, які інгібують активність GPX4 через виснаження GSH. Першим хімічним індуктором фероптозу, ідентифікованим із різноманітної хімічної бібліотеки, була невелика молекула під назвою Ерастин [38]. Ерастин індукує фероптоз через інгібування системи xc. Це призводить до виснаження глутатіону, який згодом погіршує антиоксидантну здатність GPX4, що призводить до накопиченого перекисного окислення ліпідів і загибелі ферроптотичних клітин. Ерастин також безпосередньо зв'язується з вольтаж-залежними аніонними каналами мітохондрій. Подібні молекули (включаючи сорафеніб, глутамат і сульфасалазин) імітують це непряме Сполуки, які безпосередньо націлені на GPX4 і не залежать від системи xc, також є перспективними зондами для терапії. Порушення GPX4 через інгібування системи xc було виявлено та класифіковано як індуктори класу 1. Недавнє дослідження Wei та ін. продемонстрували, що пряме націлювання на GPX4 є більш ефективним, ніж націлювання на GPX4 опосередковано через розподіл глутатіону [39].

У 2008 році був ідентифікований новий маломолекулярний індуктор фероптозу під назвою RSL3 [40]. RSL3 містить реактивну частину хлорацетаміду, що робить його потужним і необоротним інгібітором GPX4, хоча його погана розчинність і погані властивості поглинання, розподілу, метаболізму та виведення (ADME) обмежують його ефективність у дослідженнях *in vivo*.

# РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

## 2.1 Об'єкти та методи досліджень

Експериментальні дослідження проводилось на білих безпородних щурах масою 150-180 г, віком 3-4 місяці. Всі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до положень «Міжнародної конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та згідно положень «Загальних етичних принципів дослідах на тваринах», ухваленим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Моделювання парацетамол-індукованого ураження здійснювали пероральним шляхом з розрахунку 1250 мг/кг маси тварин у вигляді суспензії в 2% розчині крохмального гелю 1 раз на день протягом двох діб [41].

У ході експерименту тварини були поділені 4 групи:

1 група – щури, яких утримували на збалансованому раціоні (К);

2 група – щури, які отримували низькопротеїновий раціон(НПР);

3 група – щури, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном (ТУ);

4 група – щури, яким за умов аліментарної депривації протеїну моделювали токсичне ураження (НПР/ТУ).

Тварини отримували щоденно протягом 28 днів 35 г харчового раціону з розрахунку 200 г/кг маси тварин та мали вільний доступ до води.

До складу напівсинтетичного раціону входили: крохмаль – 620, 69 г/кг; казеїн – 140,00 г/кг; сахароза – 100,00 г/кг; соєва олія – 40,00 г/кг; целюлоза – 50,00 г/кг; сольова суміш (фосфорнокислий калій однозаміщений ($KHPO_4$) – 163,30 г, вуглекислий кальцій ($CaCO_3$) – 160,200 г, хлористий натрій ($NaCl$) – 58,500 г, сірчанокислий магній ($MgSO_4 \times 7H_2O$) – 24, 100 г, закисне залізо ($FeSO_4 \times H_2O$) – 11,100 г, сірчанокислий марганець ($MnSO_4 \times 2H_2O$) – 1,870 г, йодистий калій ($KI$) – 0,322 г, сірчанокислий цинк ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) – 0,230 г, фтористий натрій ($NaF$) – 0,210 г, сірчанокисла мідь ($CuSO_4 \times 5H_2O$), алюмокалієві квасці ($KAl(SO_4)_2 \times 12H_2O$) – 0,047 г, хлористий кобальт ($CoCl_2 \times 6H_2O$) –

0,010г,); вітамінна суміш (нікотинова кислота – 30мг, кальцій пантотенат – 15 мг, піридоксин – 6,0 мг, тіамін – 5,0 мг, рибофлавін – 6,0 мг, фолієва кислота – 2,0 мг, вітамін $B_{12}$ – 25,0 мкг, вітамін К – 960,00 мкг, вітамін Е – 75 МО, вітамін А – 4000,0 МО, вітамін D – 1000,0 МО); L-цистеїн – 1,8 г/кг; холін бітартрат – 2,5 г/кг [42].

Тварин зважували кожних 3 дні від початку експерименту.

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

## 2.2. Виділення мітохондріальної фракції

Субклітинну фракцію мітохондрій печінки отримували, використовуючи метод препаративного диференційного центрифугування. Усі маніпуляції проводили в морозильній камері при 0-4 °С.

Попередньо свіжовиділені тканини промивали 0,9 % розчином хлориду натрію, після цього подрібнювали ножицями та охолодженими переносили в гомогенізатор Поттера. Гомогенізацію здійснювали в реакційному середовищі наступного складу: 250 мМ розчин сахарози, 1 мМ EDTA, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4. Отриманий тканинний гомогенат фільтрували через 4 шари марлі в пробірки для центрифугування [43].

Ядра і уламки клітин осаджували центрифугуванням гомогенату при 1000 g протягом 10 хв. Із супернатанту в подальшому отримували фракцію мітохондрій при 12000 g протягом 15 хв. Осад мітохондрій промивали двічі 250 мМ розчином сахарози.

## 2.3. Отримання цитозольної фракції

Для отримання цитозольної (постмікросомної фракції) гомогенізацію тканин печінки проводили в 0,25 М розчині сахарози. Після осадження мітохондріальної фракції до отриманої надосадової рідини вносили розчини 80 мМ розчину CaCl2 та 1 об’єм 160 мМ розчину MgCl2 у 10 мМ трис-HCl буфері, pH 7,4). «Отримані дослідні проби перемішували на магнітній мішалці протягом

10 хв при 4°С з подальшим центрифугуванням при 10000 g впродовж 10 хв. Отриманий осад – мікросомна.

Надосадову рідину, що залишалася після отримання мікросомної фракції, відбирали та використовували у подальших дослідженнях як ци-тозольну (постмікросомну) фракцію» [43].

## 2.4. Визначення активностей селенозалежної та селенонезалежної ізоформ глутатіонпероксидаз

Для визначення глутатіонпероксидазної активності готували реакційну сіміш:

1.5 мл 0,3 М фосфатний буфер, pH 7,4,

0.1 мл 12 мМ розчин азиду натрію,

0.1 мл 6 мМ EDTA,

0.2мл 2,5 мМ розчин відновленого глутатіону.

2. Наступний крок ми вносили 0,2 мл цитозольної чи мітохондріальної фракції.

3. Далі вносили субстрат пероксид водню (18мМ) або гідропероксид кумолу (73мМ) 0,5 мл

4. Через 5хв після внесення субстрату зупиняли реакцію 0,250 мл 10% ТХО.

5. Центрифугували при 3000 g 15 хвилин.

6. Абсорбцію окисленого глутатіону визначали спектрофотометрично при 260 нм. Контроль фосфот буфер.

Se-GPx каталізує відновлення органічних і неорганічних пероксидів, таких як пероксид водню ($H_2O_2$), тоді як non-Se-GPx відновлює лише органічні пероксиди [44].

Активність глутатіонпероксидази, що не залежить від Se, визначається за допомогою гідропероксиду кумолу як субстрату, а не пероксиду водню. Застосовуючи наступне рівняння, було отримано загальну активність глутатіонпероксидази.

Загальна активність глутатіонпероксидази = [незалежна активність глутатіонпероксидази Se] + [активність Se залежна глутатіонпероксидаза].

**Вміст білка** визначали за методом Лоурі.

**Статистична обробка результатів** проводилася на персональному комп'ютері з використанням пакету аналізу табличного редактора «Excel 2000 for Windows", методом варіаційної статистики, обробки результатів досліджень із застосуванням t-критерію вірогідності різниці Стюдента. Різниця вважалася достовірною при коефіцієнті вірогідності $p<0,05$.

## Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень показали, що зниження загальної глутатіонпероксидазної активності в цитозольній фракції печінки щурів порівняно з контролем відбувається за рахунок зменшення рівня Se-GPx (< 2,2 рази, $p \leq 0,05$ ) лише в групах тварин, яким вводили токсичні дози ацетамінофену незалежно від кількості протеїну в харчовому раціоні (ТУ та НПР/ТУ) (рис. 1).

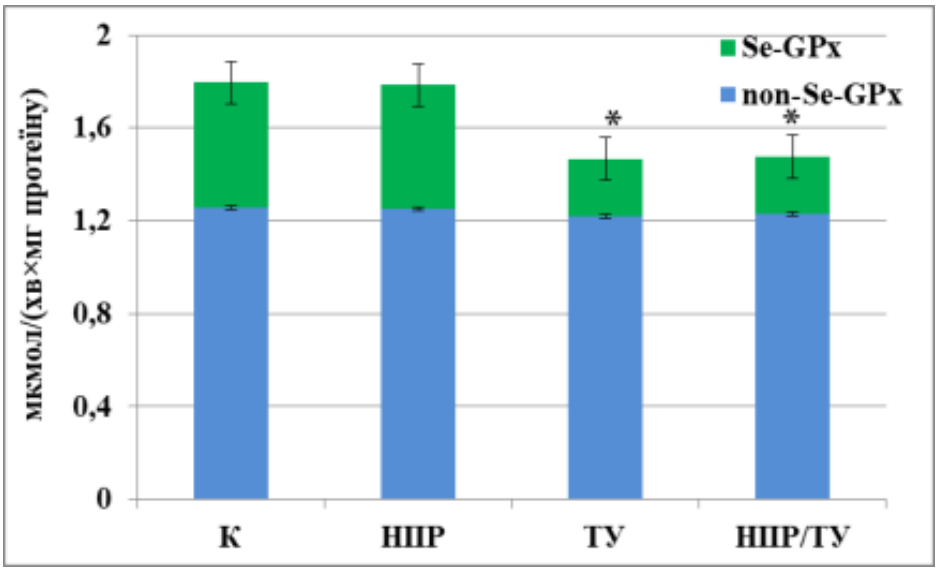



**Рис. 1. Активність Se-GPx і Se-non-GPx у цитозольній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну**

*Примітка: К – щури, яких утримували на збалансованому раціоні; НПР – щури, які отримували низькопротеїновий раціон; ТУ – щури, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном; НПР/ТУ – щури, яким за умов аліментарної депривації протеїну моделювали токсичне ураження; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.*

Попередніми дослідженнями показано, що за умов введення токсичних доз ацетамінофену активація системи CYP450 супроводжується надмірним утворенням високотоксичного метаболіту – N-ацетил-р-бензохіноніміну, який в реакціях детоксикації кон’югує з GSH. Вірогідно, однією з причин зниження

активності Se-GPx у цитозольній фракції клітин печінки щурів за даних експериментальних умов є нестача GSH, який є косубстратом глутатіонпероксидазної та глутатіон-трансферазної реакцій.

Водночас у мітохондріальній фракції тварин з ацетамінофен-індукованим ураженням незалежно від кількості харчового протеїну (ТУ та НПР/ТУ) нами зареєстровано одночасне зниження активностей як Se-non-GPx, так і Se-GPx порівняно зі значеннями контролю (рис. 2).

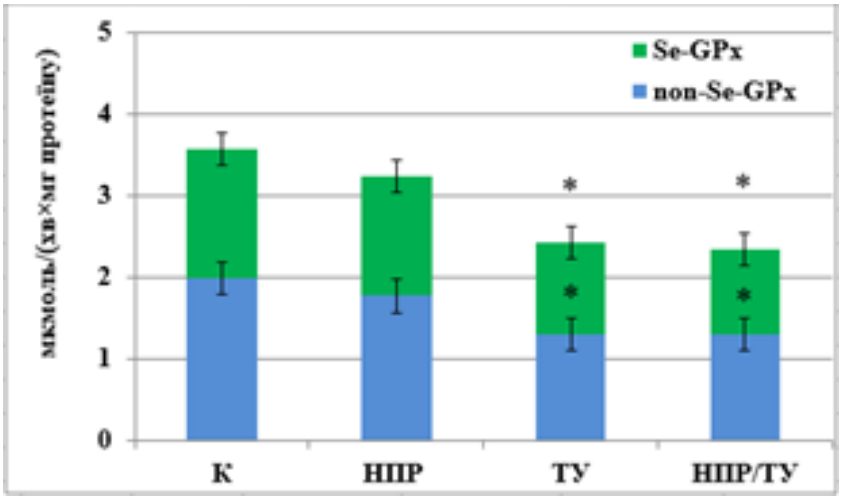



**Рис. 2. Активність Se-GPx і Se-non-GPx у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамі-нофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну**

*Примітка: К – щури, яких утримували на збалансованому раціоні; НПР – щури, які отримували низькопротеїновий раціон; ТУ – щури, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном; НПР/ТУ – щури, яким за умов аліментарної депривації протеїну моделювали токсичне ураження; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, P≤ 0,05.*

Відомо, що основною транспортною формою селену в організмі є селенометіонін (SeMet), який транспортується у формі Se-альбуміну (SeAlb). Розвиток гіпоальбумінемії в щурів із ацетамінофеноіндукованим ураженням, що встановлено попередніми дослідженнями, ймовірно, можна розглядати як передумову зниження активності Se-GPx внаслідок структурної реорганізації даного ензиму через нестачу селену.

Отже, токсичне ураження ацетамінофеном виступає ключовим чинником зниження загальної глутатіонпероксидазної активності в печінки щурів: у мітохондріальній фракції – за рахунок зменшення рівня обох ізоформ даного ензиму, тоді як у цитозолі лише за рахунок селенозалежної форми ензиму

# ВИСНОВКИ

1. Зниження загальної глутатіонпероксидазної активності в цитозольній фракції печінки щурів відбувається за рахунок зменшення рівня Se-GPx лише в групах тварин, яким вводили токсичні дози ацетамінофену незалежно від кількості протеїну в харчовому раціоні.
2. У мітохондріальній фракції тварин з ацетамінофен-індукованим ураженням незалежно від кількості харчового протеїну нами зареєстровано одночасне зниження активностей як Se-non-GPx, так і Se-GPx порівняно зі значеннями контролю.