

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

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

**АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ЦИТОХРОМНОЇ ДІЛЯНКИ
ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА У НИРКАХ ЩУРІВ ЗА
УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ
АЦЕТАМІНОФЕНОМ НА ТЛІ АЛІМЕНТАРНОГО
ДЕФІЦИТУ ПРОТЕЇНУ**

**Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)**

Виконала:

студентка 6 курсу, 600 групи
Москалюк Наталія Олегівна

Керівник:

Кандидат біологічних
наук, доцент
Волощук О.М.

**До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2023 р.
зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.**

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Москалюк Н.О. «Активність ензимів цитохромної ділянки дихального ланцюга у нирках щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну». Спеціальність 091 Біологія, ОП Біохімія та лабораторна діагностика, Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича; Чернівці, 2023.

Встановлено, що за умов чотиритижневого споживання низькопротеїнового раціону у нирках щурів не спостерігається достовірних змін ензиматичних активностей III та IV комплексів дихального ланцюга, проте спостерігається зниження вмісту мітохондріальних цитохромів при збереженні активностей δ -амінолевулінатсинтази та гемоксигенази на рівні показників контролю, що, ймовірно, свідчить про порушення синтезу білкової частини цитохромів за досліджуваних умов.

Показано, що максимально виражені зміни убіхінол-цитохром *c*-оксидоредуктазної та цитохромоксидазної активностей, вмісту цитохромів $a+a_3$, b , c та c_1 , зниження δ -амінолевулінатсинтазної та підвищення гемоксигеназної активностей характерні для тварин, які отримували токсичні дози ацетамінофену на тлі аліментарного дефіциту протеїну. Отримані дані свідчать про активацію катаболізму гему цитохромів та одночасне сповільнення його синтезу за досліджуваних умов.

Ключові слова: низькопротеїновий раціон, ацетамінофен, нирки, мітохондрії, цитохроми, убіхінол-цитохром *c*-оксидоредуктаза, цитохромоксидаза, δ -амінолевулінатсинтаза, гемоксигеназа.

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

_____ Н.О. Москалюк

ABSTRACT

Moskalyuk N.O. “Activity of enzymes of the cytochrome section of the respiratory chain in the kidneys of rats under conditions of toxic damage by acetaminophen against the background of dietary protein deficiency”, Specialty 091 Biology, EP Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Yuri Fedkovich Chernivtsi National University; Chernivtsi, 2023.

It was established that under the conditions of four weeks of consumption of a low-protein diet in the kidneys of rats, there are no significant changes in the enzymatic activities of III and IV complexes of the respiratory chain, but a decrease in the content of mitochondrial cytochromes is observed, while the activities of δ -aminolevulinate synthase and heme oxygenase remain at the level of control indicators, which probably indicates violation of the synthesis of the protein part of cytochromes under the studied conditions. It was shown that the most pronounced changes in ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase and cytochrome oxidase activities, the content of cytochromes $a+a_3$, b , c and c_1 , a decrease in δ -aminolevulinate synthase and an increase in heme oxygenase activity are characteristic of animals that received toxic doses of acetaminophen against the background of dietary protein deficiency. The obtained data indicate the activation of heme catabolism of cytochromes and the simultaneous slowing down of its synthesis under the studied conditions.

Key words: low-protein diet, acetaminophen, kidneys, mitochondria, cytochromes, ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase, cytochrome oxidase, δ -aminolevulinate synthase, heme oxygenase.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1.Стан метаболічних процесів за умов нестачі протеїну.....	7
1.2.Механізми токсичного ураження ацетамінофеном.....	8
1.3.Структурно-функціональна організація ензиматичних комплексів дихального ланцюга.....	10
1.4.Загальна характеристика ензимів метаболізму гему.....	12
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	16
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	20
ВИСНОВКИ.....	26
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	27
ДОДАТКИ.....	32

ВСТУП

Ацетамінофен (АРАР, парацетамол) – один із найпоширеніших анальгетиків, який використовують для лікування гострого та хронічного болю [1]. Терапевтичні дози ацетамінофену є безпечними, однак токсичні метаболіти, що утворюються під час передозування, можуть спричиняти негативні наслідки для цілого організму, оскільки відбувається токсичне ураження різних органів [2]. Після перорального прийому невелика частина АРАР (5 – 15 %) перетворюється на токсичний метаболіт N-ацетил-*пара*-бензохінонімін (NAPQI), який може спричинити ушкодження клітин печінки. Основна роль у метаболізмі ацетамінофену відводиться цитохрому P450, зокрема ізоформам ензиму CYP2E1 і CYP1A2 [3, 4]. NAPQI викликає окиснювальне пошкодження мітохондрій і посилює утворення активних форм кисню (АФК) [5]. Мітохондрії є основними субклітинними органелами еукаріотичних клітин, які підтримують метаболічний гомеостаз, забезпечуючи продукцію АТФ шляхом окисного фосфорилювання (ОХРНОС) [6]. Нирки потребують значної кількості енергії для того, щоб виводити назовні кінцеві продукти метаболізму, забезпечувати нормальне функціонування речовин в організмі людини, забезпечувати регуляцію електролітів та рідини, а також забезпечувати регуляцію кров'яного тиску та вироблення гормонів [7].

Для функціонування системи енергозабезпечення у нирках важливим є підтримання ефективності роботи цитохромної ділянки дихального ланцюга. Цитохромна ділянка представлена двома ензиматичними комплексами: III (убіхінол-цитохром *c*-оксидоредуктазний) і IV (цитохромоксидазний). Важливими структурними компонентами цих ензимів є цитохроми, які забезпечують транспорт електронів від убіхінону до молекулярного кисню. Тому збалансованість процесів синтезу і катаболізму цих білків є визначальною для функціонування цитохромної ділянки [8]. Лімітуючим ензимом процесу синтезу гему цитохромів є δ -амінолевулінатсинтаза (КФ 2.3.1.37). Цей ензим

забезпечує утворення δ -амінолевулінової кислоти шляхом конденсації сукциніл-коензиму А та амінокислоти гліцину [9]. Основним ферментом розщеплення гему цитохромів є гемоксигеназа (КФ1.14.99.3). Цей фермент забезпечує перетворення гему до білівердину та монооксиду карбону (CO) [10]. Надалі утворений білівердин за участі ферменту білівердинредуктази перетворюється на білірубін, який виводиться з організму.

Мета роботи – дослідити ферментативну активність ферментів цитохромної ділянки дихального ланцюга та ферментів катаболізму гему у нирках тварин за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Дослідити убіхінол-цитохром c -оксидоредуктазну та цитохромоксидазну активності у нирок тварин за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном.

2. Визначити вміст цитохромів у мітохондріях нирок щурів за умов введення токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном.

3. Визначити гемоксигеназну та δ -амінолевулінатсинтазну активності у нирках тварин за досліджуваних умов.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Стан метаболічних процесів за умов нестачі протеїну

Білки виконують широкий спектр функцій в організмі, зокрема беруть участь у каталізі хімічних реакцій, транспорті речовин, підтримці структури клітин та тканин, участь у сигнальних шляхах та імунній відповіді [11]. Під час процесу перетравлення харчові білки гідролізуються до амінокислот, які в подальшому беруть участь у процесах росту та забезпечують правильне функціонування тканин організму. Проте в організмі може зменшуватись швидкість білкового синтезу, що призводить до порушення співвідношення амінокислот. Білок потрібно споживати у достатній кількості для того, щоб підтримувати необхідну кількість амінокислоту в організмі. Протеїни складають 50 % від сухої маси та до 20 % від загальної маси тіла людини [12].

Нестача протеїну в організмі може впливати на різні метаболічні процеси. Порушення регуляції механізмів, які забезпечують засвоєння поживних речовин у кишечнику, може призвести до ожиріння та метаболічних ускладнень. За умов нестачі протеїну можуть відбуватися такі зміни в організмі як порушення метаболізму амінокислот, зниження синтезу біологічно важливих молекул, зміни в стані м'язів, зниження імунітету, зміни у водно-електролітному балансі [13]. При нестачі протеїну може виникнути дефіцит амінокислот, що впливає на синтез білків, гормонів та інших біологічно активних речовин. Нестача протеїнів може вплинути на стан м'язів, призводячи до зменшення маси м'язів. Білки важливі для синтезу антитіл та імунологічних факторів. Нестача протеїнів може призвести до порушень у функції імунної системи. Протеїни відіграють значну роль у збереженні рівноваги рідини та іонів в клітинах. Всі ці зміни можуть виникнути при тривалій нестачі протеїну та можуть призвести до серйозних проблем зі здоров'ям. Досить тривалий час організм може існувати за умов дефіциту вуглеводів або жирів у харчовому раціоні, проте дефіцит протеїнів викликає значні метаболічні порушень аж до незворотних патологічних змін,

які можуть завершуватися загибеллю клітини.

За умов недостатнього надходження білків в організмі розвивається білково-енергетична недостатність (БЕН). БЕН може спричиняти різні зміни в білковому обміні організму, включаючи такий процес як гіпопротеїнемія [14]. Гіпопротеїнемія – це стан, при якому в крові знижується рівень загального протеїну. Коли організм зазнає дефіциту білка, в першу чергу витрачаються білки крові, такі як альбуміни та глобуліни. Альбумін виконує ряд важливих функцій, включаючи забезпечення колоїдного осмотичного тиску в крові, транспорт різних речовин, і утримання рівноваги води між судинами та тканинами. Гіпопротеїнемія може призвести до наступних наслідків: зменшення рівня альбуміну, який провокує зниження колоїдного осмотичного тиску в крові, що може спричинити витік рідини з кровоносних судин; втрата білків може впливати на об'єм крові та її згущення; дефіцит білків може впливати на транспорт глобулінів, які виконують ключову роль у перенесенні різних речовин, включаючи гормони; зменшення рівня глобулінів може призвести до порушення імунної функції; гіпопротеїнемія може призвести до масової втрати білка з організму через шкіру, нирки, кишечник. Важливо враховувати, що гіпопротеїнемія може бути лише однією з багатьох фізіологічних змін, які виникають при нестачі білка. Забезпечення достатньої кількості білка в раціоні харчування є важливим для уникнення таких станів і підтримання нормального функціонування організму [12].

1.2 Механізми токсичного ураження ацетамінофеном

Ацетамінофен (N-ацетил-пара-амінофенол, АРАР) – засіб, що проявляє різні терапевтичні ефекти: знеболювальний, жарознижувальний і слабкий протизапальний ефект. Механізм дії цього препарату базується на гальмуванні продукування простагландинів та впливі на терморегуляційний центр у гіпоталамусі.

Вважається, що разова доза для дорослих людей не повинна перевищувати 500 мг, тоді як для дітей – 350 мг [15]. Однак у великих дозах або при тривалому вживанні ацетамінофен може бути токсичним для печінки та нирок.

Після застосування *per os* парацетамол швидко всмоктується, насамперед у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту. Препарат надходить у різні тканини. Менше 10% препарату зв'язується з транспортними білками крові. Основним органом, де відбуваються метаболічні перетворення ацетамінофену, є печінка. Значна частина парацетамолу знешкоджується шляхом зв'язування з глюкуроною кислотою, незначний відсоток – з сірчаною кислотою. За 2-2,5 години відбувається напіврозпад парацетамолу. У пацієнтів з захворюваннями печінки період напіврозпаду ацетамінофену подовжується. Виводиться парацетамол переважно із сечею, при цьому 85 % метаболітів ацетамінофену виводиться протягом однієї доби [16]. За умов порушення видільної функції нирок виведення ацетамінофену значно погіршується, наслідком чого може бути накопичення в органах парацетамолу та його метаболітів. Зокрема, період напіврозпаду хлорфеніраміномалеату, метаболіту парацетамолу, складає приблизно 8 годин. Кінцеві продукти перетворення ацетамінофену виводяться з організму разом із сечею.

Основні механізми токсичного ураження ацетамінофеном включають:

1. Утворення токсичних метаболітів: ацетамінофен метаболізується в печінці за участю цитохрому P450 до активного метаболіту N-ацетилбензохіноніміну (NAPQI). У нормальних умовах NAPQI швидко нейтралізується глутатіоном, але при перевищенні максимальної дози ацетамінофену або при нестачі глутатіону, NAPQI може накопичуватися і ставати токсичним для печінки [18].

2. Виснаження глутатіону: глутатіон є антиоксидантом, який захищає клітини печінки від окиснювального стресу. При великих дозах ацетамінофену

глутатіон може виснажитися, що призводить до накопичення токсичного NAPQI та його впливу на клітини печінки [19].

3. Окиснювальний стрес: утворення NAPQI і його нейтралізація глутатіоном супроводжується активацією окиснювальних реакцій. Окиснювальний стрес може призводити до пошкодження клітинних структур та сприяти токсичності [17].

4. Пошкодження клітинних структур: накопичення NAPQI та окиснювальний стрес можуть призводити до пошкодження клітинних мембран, мітохондрій та інших клітинних структур, що сприяє печінковій токсичності.

5. Апоптоз: високі концентрації NAPQI можуть спричиняти апоптоз клітин печінки, що впливає на їхню життєздатність [20].

Лікування отруєння ацетамінофеном включає введення антидоту, яким є N-ацетилцистеїн (NAC). NAC збільшує рівень глутатіону та допомагає нейтралізувати токсичний NAPQI [16].

1.3. Структурно-функціональна організація ензиматичних комплексів дихального ланцюга

Мітохондрії є основним джерелом АТФ для задоволення енергетичних потреб клітини. Мітохондрії, відомі як «електростанції» клітини, забезпечують утворення понад 90% АТФ, необхідної еукаріотичним клітинам. Виробництво АТФ відбувається шляхом окисного фосфорилування, коли електрони транспортуються через комплекси електронотransпортного ланцюга (ЕТЛ) і забезпечують рушійну силу протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану, яка використовується для синтезу АТФ [21]. За фізіологічних умов вуглеводи та ліпіди метаболізуються до ацетил-КоА в мітохондріях. Ацетил-КоА входить у цикл трикарбонових кислот, утворюючи «відновні еквіваленти» НАДН і ФАДН₂. Окислювальне фосфорилування описується як НАДН і ФАДН₂ через ланцюг транспортування електронів, який поєднується з синтезом

АТФ. Електронотранспортний ланцюг складається з чотирьох комплексів (Комплекс I, Комплекс II, Комплекс III і Комплекс IV), розташованих у внутрішній мембрані мітохондрій. Комплекси ЕТЛ переносять електрони від НАДН і ФАДН₂ до молекулярного кисню, що супроводжується одночасним перекачуванням протонів з матриксу в міжмембранний простір, що генерує електрохімічний градієнт протонів через внутрішню мембрану мітохондрій [22].

Комплекс I (НАДН-убіхіноноксидоредуктаза) має вирішальне значення для клітинного метаболізму у людей та багатьох інших аеробних організмів. Він окислює НАДН, який утворюється переважно у циклі трикарбонових кислот і β -окисненням жирних кислот, регенеруючи пул НАД⁺ у мітохондріальному матриксі. Він використовує два електрони від окислення НАДН для відновлення убіхінону до убіхінолу у внутрішній мітохондріальній мембрані, забезпечуючи решту ланцюга транспортування електронів електронами для відновлення О₂ до води [23]. Потенційна енергія, що виділяється в результаті окислювально-відновної реакції, використовується для транспортування протонів через внутрішню мембрану мітохондрій, сприяючи протонорушійній силі, яка підтримує синтез АТФ, мітохондріальний імпорт і експорт метаболітів і білків. Комплекс I також є важливим джерелом утворення активних форм кисню в мітохондріях. Дисфункції комплексу I виникають як через знижену каталітичну активність, так і через збільшення виробництва супероксиду [24].

Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа), що включає центри FAD і Fe-S, полегшує передачу електронів від інших донорів, таких як жирні кислоти та гліцерол-3-фосфат, до убіхінону через центри FAD і Fe-S. Комплекс II отримує електрони від сукцинату, який утворюється в циклі Кребса. Електрони передаються на коензим Q, а також здійснюється транспорт протонів на зовнішню сторону мембрани [25].

Комплекс III (убіхінол-цитохром *c*-оксидоредуктаза) складається з цитохрому *b*, *c* і специфічного центру Fe-S. Комплекс III є одним із ключових

комплексів дихального ланцюгу в мітохондріях. Цей комплекс бере участь у передачі електронів і одночасно здійснює транспорт протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану. Він взаємодіє з коензимом Q (убіхінон) та цитохромом *c*. Комплекс III приймає електрони від коензиму Q, який отримує їх від попередніх комплексів (наприклад, від Комплексу I або Комплексу II). Електрони надалі передаються через ряд цитохромів (зокрема, цитохром *b* та цитохром *c₁*), поки вони не досягнуть цитохрому *c*. Протони також транспортуються через внутрішню мітохондріальну мембрану під час передачі електронів через Комплекс III [26].

Комплекс IV (цитохром *c* оксидаза) є кінцевим комплексом у ЕТЛ. Він містить цитохром *a* і *a₃* та відповідає за перенесення двох електронів від цитохрому *c* до молекулярного кисню (O_2), що завершується утворенням води. Одночасно чотири протони переміщуються через мембрану, ще більше посилюючи протонний градієнт [27].

1.4. Загальна характеристика ензимів метаболізму гему

Усі компоненти дихального ланцюга мітохондрій знаходяться у вигляді чотирьох мультиензиматичних комплексів I – IV [28]. Для підтримання роботи мітохондріальної системи енергозабезпечення за умов впливу різноманітних ксенобіотиків важливим є нормальне функціонування ділянки дихального ланцюга, що містить цитохроми. Ключову роль у забезпеченні функціонування дихального ланцюга відіграє цитохромна ділянка, що включає III (убіхінол-цитохром *c*-оксидоредуктаза) та IV (цитохромоксидаза) комплекси. Основними компонентами III і IV ензиматичних комплексів є цитохроми, водночас їх вміст у мітохондріях залежить від збалансованості процесів катаболізму та синтезу гему [8].

δ -амінолевулінатсинтаза (КФ 2.3.1.37) є основним ензимом метаболічного шляху синтезу гему, що каталізує першу реакцію біосинтетичного шляху гему –

конденсацію сукциніл-коензиму А та гліцину з утворенням δ -амінолевулінової кислоти [9]. δ -амінолевулінатсинтаза є білком, що за будовою представляє собою поліпептидний ланцюг, який складається з амінокислот. Фермент має тридцять амінокислотних залишків у своїй амінотермінальній частині, де здійснюється взаємодія з піроксаль-5'-фосфатом (коферментом), та декілька сотень амінокислот у залишках С-кінцевої частини [29]. Загальна будова ферменту включає активні сайти, які забезпечують каталітичну активність ферменту під час конденсації гліцину і сукцинату для утворення δ -амінолевулінату. δ -амінолевулінатсинтаза у більшості організмів, включаючи людину, представлена у вигляді тетрамеру, що складається з чотирьох субодиниць. Ці субодиниці можуть бути ідентичними або подібними за своєю амінокислотою послідовністю. Кожна субодиниця δ -амінолевулінатсинтази є продуктом окремого гена, і їхню взаємодію визначає активність та функція ферменту. Важливо зауважити, що існує два основних типи δ -амінолевулінатсинтази в клітинах – цитозольна і мітохондріальна. Цитозольна δ -амінолевулінатсинтаза відповідає за перший етап біосинтезу порфіринів у бактеріях та археях. Мітохондріальна форма локалізується в мітохондріях клітини і є важливою для біосинтезу гему та може бути присутньою у різних тканинах організму, особливо там, де відбувається інтенсивний синтез гемоглобіну та інших гем-залежних білків. Оскільки мітохондрії є ключовими для багатьох біологічних процесів, таких як дихання та енергетичний обмін, мітохондріальна δ -амінолевулінатсинтаза відіграє важливе значення в біосинтезі порфіринів, які використовуються для утворення гему. В організмі є дві форми δ -амінолевулінатсинтази: одна форма експресується в клітинах-попередниках еритроцитів (ALAS2), тоді як інша (ALAS1) експресується у всіх органах організму. ALAS1 і ALAS2 каталізують перший крок у процесі синтезу гему. Дефіцит δ -амінолевулінатсинтази призводить до порушення здатності утворювати гем [28].

Головним ензимом деградації гему є гемоксигеназа (КФ1.14.99.3), яка забезпечує окисне розщеплення гему з утворенням в еквімолярній кількості монооксиду карбону (CO) та білівердину [10]. Гемоксигеназа розщеплює гемове кільце біля альфа-метенового містка з утворенням білівердину, або, якщо гем досі приєднаний до глобіну, утворюється вердоглобін. Білівердин згодом перетворюється на білірубін за допомогою білівердинредуктази. Гемоксигеназа локалізується переважно в печінці, хоча вона також може бути присутньою в інших тканинах. Вона відіграє ключову роль у катаболізмі гемоглобіну та утворенні білівердину. Гемоксигеназа також може бути виявлена у макрофагах та інших клітинах імунної системи. Незначна кількість гемоксигенази може бути присутньою в нирках, де вона також може брати участь у розпаді гемоглобіну [30]. Менша кількість гемоксигенази може бути виявлена в різних тканинах та клітинах організму, де вона може виконувати різноманітні функції. У людини та тварин гемоксигеназа представлена декількома ізоформами, зокрема, гемоксигеназою 1 (HMOX1) та гемоксигеназою-2 (HMOX2). Структура гемоксигенази може бути складною, і вона включає ряд функціональних ділянок та груп амінокислот [31]. Проте, основні структурні елементи включають:

1. Активний центр.

Активний центр гемоксигенази – це місце, де відбувається хімічна реакція розщеплення гему. В активному центрі здійснюється видалення заліза з гему та його конвертація у білівердин.

2. Гем-зв'язуючий сайт.

Гемоксигеназа має специфічний гем-зв'язуючий сайт, де здійснюється взаємодія з молекулою гемоглобіну для видалення гему.

3. Напрямок розкладання гемоглобіну.

Фермент гемоксигеназа орієнтований на розкладання гемоглобіну на глобін та гем, який потім перетворюється в білівердин.

4. Кофактори та ковалентні зв'язки.

Гемоксигеназа використовує ковалентно зв'язані кофактори, такі як залізо у протопорфірині гему, для виконання каталітичних реакцій.

5. Структура підтримки.

Окрім активного центру, фермент може мати різноманітні структурні елементи, які допомагають забезпечувати стійкість та ефективність ферментативної активності [30]. Гемоксигеназа H (HMOX1) часто знаходиться в ендоплазматичному ретикулумі (ER) клітини, а також в мітохондріях та ядрі. При стресових умовах або при запаленні її можна виявити в лізосомах. Гемоксигеназа- 2 (HMOX2) локалізується в мітохондріях та в ядрі клітини [32].

Гемоксигеназа складається з двох головних субодиниць. Ці субодиниці відомі як α -субодиниця та β -субодиниця. Кожна з цих субодиниць гемоксигенази виконує свою унікальну функцію у структурі та каталітичній активності ферменту. α - субодиниця гемоксигенази, відома як HMOX1 або HMOX2, залежно від конкретного гемоксигеназного гена, виконує роль підтримання структурної стійкості та каталітичної активності ферменту. β -субодиниця, також відома як HMOX1 або HMOX2, відіграє важливу роль у каталітичних процесах ферменту та підтриманні його структури. Ці дві субодиниці гемоксигенази взаємодіють із специфічними кофакторами, такими як залізо в протопорфірині гему, для забезпечення каталітичної активності ферменту [33].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти та методи досліджень

«Дослідження проводили на білих безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 120-160 г. Умови утримання тварин та всі маніпуляції, які здійснювались в ході експерименту, відповідали вимогам та рекомендаціям VII Національного конгресу з біоетики. Дослідних тварин утримували в пластикових клітках з піщаною підстилкою і доступом до води *ad libitum*.

Для проведення експерименту було сформовано 4 групи тварин:

1. Контроль (К) – тварини, яких утримували на повноцінному напівсинтетичному раціоні.
2. НПП – тварини, які перебували на низькопротеїновому раціоні.
3. ТУ – тварини з ацетомінофен-індукованим ураженням, які перебували на повноцінному раціоні.
4. НПП/ТУ – тварини, яким моделювали токсичне ураження на тлі утримання на низькопротеїновому раціоні.

Тварин утримували на раціоні, розробленому згідно рекомендацій Американського інституту нутриціології.

Експеримент тривав 28 діб, наприкінці всіх щурів виводили з експерименту за допомогою декапітації під легким ефірним наркозом» [34].

Отримання мітохондрій із нирок щурів здійснювали методом диференційного центрифугування. Для цього використовували середовище наступного складу: 1 мМ ЕДТА, 250 мМ сахароза, 10 мМ трис-НСl (рН 7,4) [35].

Для визначення вмісту протеїну у зразках використовували метод Лоурі.

Визначення активності убіхінол-цитохром с-оксидоредуктази

Метод базується на спектрофотометричному вимірюванні кількості утвореного убіхінону – одного із продуктів реакції, яку каталізує убіхінол-

цитохром *c*-оксидоредуктаза [36].

Реакцію проводили у буфері, який містив 50 мМ трис HCl, 4 мМ азид Na, 0,05% Tween 20, 0,1 мг/мл альбуміну, 0,25 мМ убіхінону та 0,0625 мМ цитохрому *c*, рН 7,5. Реакцію розпочинали додаванням 0,25 мМ децилубіхінолу та 0,0625 мМ цитохрому *c*. Проби інкубували 30 хв при 37 °С. Зниження вмісту цитохрому *c* та децилубіхінолу реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 550 нм. Ензиматичну активність оцінювали з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції, що рівний $19,1 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, та виражали в нмоль за 1 хв на 1 мг протеїну.

Визначення активності цитохромоксидази

Метод базується на здатності цитохромоксидази окислювати α -нафтол і диметилпарафенілдіамін, що супроводжується утворенням забарвленої сполуки продукту – індофенолового блакитного [37]. За допомогою реактиву НАДІ визначають активність даного ензиму. До складу інкубаційного середовища входить 1,5% карбонат натрію, 1,5 % α -нафтол, 1% парафенілдіамін (1:1:1). Реакцію розпочинали внесенням аліквоти мітохондрії із нирок. Проби 30 хвилин інкубували при 37 °С, зупиняли реакцію додаванням 3 мл етилового спирту. Після цього зразки центрифугували протягом 10 хвилин при 6000 об/хв. Ензиматичну активність визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 550 нм. Оцінювали ензиматичну активність цитохромоксидази з урахуванням, що зниження оптичної густини на одиницю відповідає відновленню 0,44 одиниці кисню. Цитохромоксидазну активність виражали в нмоль за 1 хв на 1 мг протеїну.

Визначення вмісту мітохондріальних цитохромів

«Вміст мітохондріальних цитохромів визначали методом диференційної спектрофотометрії, що базується на адсорбції цитохромів у відновленому та

окисленому стані в ділянці їх спектральних максимумів. До суспензії мітохондрій додавали реакційне середовище, яке містило (складалось) 200 ммоль/л сахарози, 0,5 ммоль/л $MgCl_2$, 0,2 ммоль/л EDTA, 2 ммоль/л KH_2PO_4 , 20 ммоль/л KCl, 30 ммоль/л трис-буферу, pH 7,5» [38].

Всі спектри записували на одному і тому ж препараті.

Інтерпретація результатів

K – коефіцієнт пропорційності, постійна величина для кожного цитохрома.

цит.	$a+a_3$	b	c	c_1
K	8	17	22	19
цит.	$a+a_3$	b	c	c_1
λ_1	624	574	574	574
λ_2	588	540	540	540

Визначення активності гемоксигенази

Метод базується на вимірюванні кількості утвореного за участі гемоксигенази білірубину [39]. Визначали активність гемоксигенази в 0,1 М фосфатному буфері, pH 7,35. Розпочинали реакцію додаванням метгемальбуміну (0,0025 мМ альбуміну, 0,033 мМ геміну) та суспензії мітохондрій. Проби інкубували 25 хв при 37 °С. Визначали кількість утвореного білірубину на спектрофотометрі при довжині хвилі 468 нм, оцінювали з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції $0,04 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ і виражали в нмоль білірубину за 1 хв на 1 мг протеїну.

Визначення активності δ -амінолевулінатсинтази

Метод ґрунтується на здатності δ -амінолевулінової кислоти, яка є продуктом реакції, що каталізує δ -АЛС, за умов кип'ятіння переходити у пірольну форму з максимумом поглинання при довжині хвилі 350 нм [40].

Реакцію проводили у буфері, який містив 10 мМ EDTA, 100 мМ гліцину,

150 мМ трис НСІ, 0,2 мМ піридоксаль-5-фосфату, рН 7,4. Мітохондріальну фракцію додавали у середовище, тим самим розпочинаючи реакцію. Проби, які ми отримували, струшували та інкубували при 37 °С протягом 60 хв. Додавали ацетилацетон для перетворення отриманої амінолевулінової кислоти у пірольну форму та кип'ятили 15 хв. Центрифугували вміст пробірок 15 хв при 3000 об/хв. Спектрофотометрично здійснювали вимірювання активності δ -амінолевулінатсинтази при довжині хвилі 350 нм. Ензиматичну активність розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $0,023 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ і виражали в нмоль δ -АЛК за 1 хв на 1 мг протеїну.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали стандартним методом за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel*. Достовірність отриманих показників оцінювали, використовуючи стандартний *t*-критерій Стьюдента та вважали статистично вірогідними при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нирки регулюють багато життєво важливих функцій, зокрема, забезпечують підтримку фільтрації та реабсорбції, балансу іонів, регулювання артеріального тиску, виведення токсичних речовин із організму, при цьому всі ці процеси потребують великих затрат енергії [41]. Ключовим способом утворення АТФ у клітині є процес окисного фосфорилування, який відбувається у мітохондріях за участі дихального ланцюга. Важливою є цитохромна ділянка дихального ланцюга, яка відіграє ключову роль у процесах енергозабезпечення. До цитохромної ділянки належить III (убіхінол-цитохром-с-оксидоредуктаза) та IV (цитохромоксидаза) комплекси дихального ланцюга.

Результати проведених досліджень показали, що у тварин, які споживали протеїндефіцитний раціон, активність убіхінол-цитохром-с-оксидоредуктази та цитохромоксидази достовірно не змінюється порівняно з контролем (рис. 1, рис. 2).

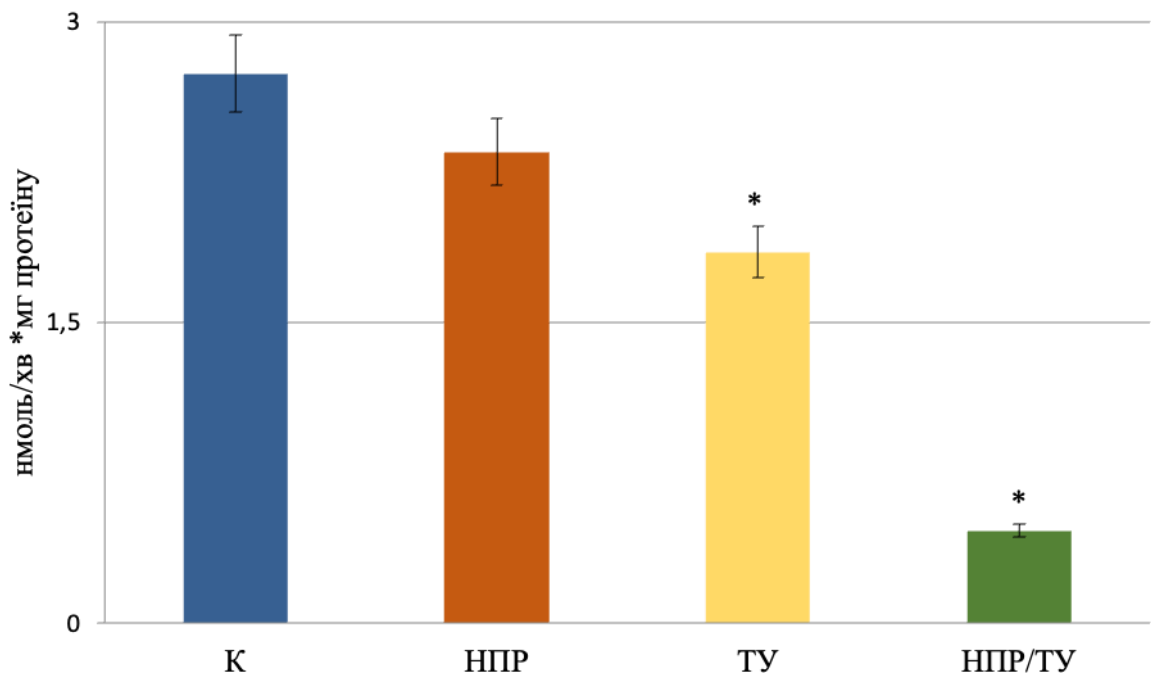


Рис. 1 Убіхінол-цитохром с-оксидоредуктазна активність у мітохондріях нирок щурів за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном

Водночас у тварин, які зазнавали дії токсичних доз ацетамінофену, спостерігається зниження активності убіхінол-цитохром-с-оксидоредуктази та цитохромоксидази приблизно у 1,5 рази (рис. 1, рис. 2). Максимально виражені зміни досліджуваних ензиматичних активностей характерні для тварин з токсичним ураженням ацетамінофену та які споживали низькопротеїновий раціон: убіхінол-цитохром-с-оксидоредуктазна активність знижується у практично 6 разів (рис. 1), а цитохромоксидазна активність – практично утричі (рис. 2). Зниження досліджуваних ензиматичних активностей, імовірно, пов'язано з надмірним утворенням токсичного метаболіту ацетамінофену – N-ацетилбензохіноніміну (NAPQI).

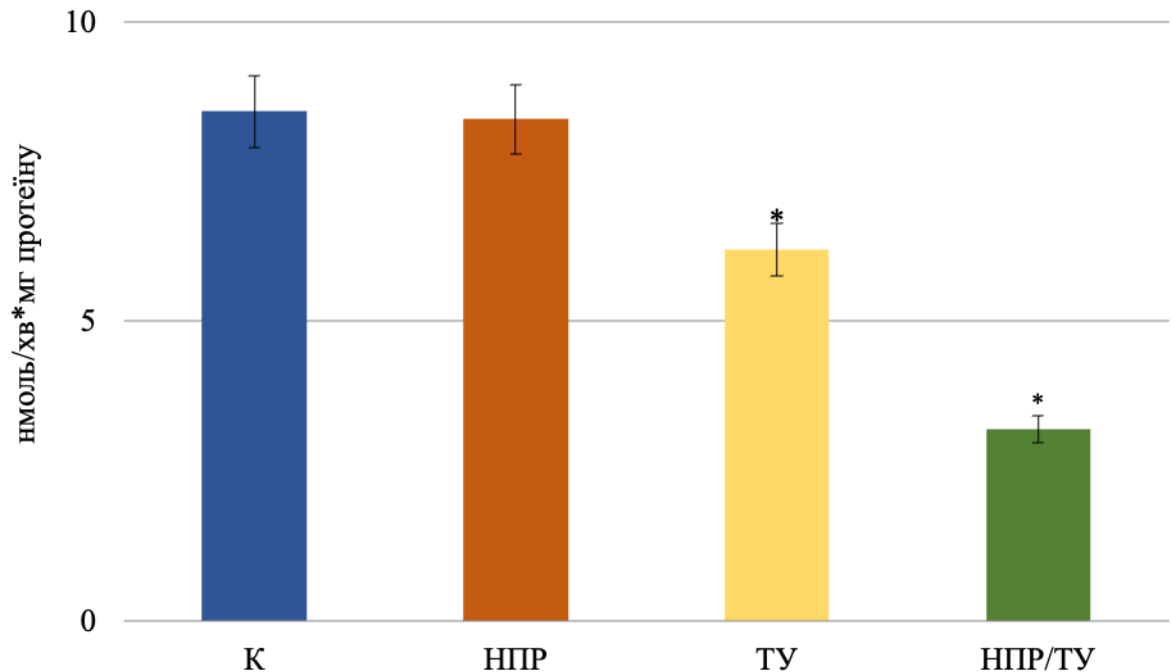


Рис. 2 Цитохромоксидазна активність у мітохондріях нирок щурів за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном

Враховуючи, що ці ферменти є важливими компонентами дихального ланцюга, то встановлене нами зниження активностей ензимів III і IV комплексів, ймовірно, буде призводити до порушення окисного фосфорилування та формування стану енергодефіциту у нирках. Оскільки важливими компонентами цих ензимів є цитохроми, то на наступному етапі

нашої роботи було визначення вмісту цитохромів у мітохондріях нирок щурів за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та дефіциту протеїну у раціоні. Результати проведених досліджень засвідчили, що за умов передозування ацетамінофеном у тварин групи ТУ та НПР/ТУ вміст мітохондріальних цитохромів $a+a_3$, b , c_1 зменшується практично на 45-50 %, при цьому вміст цитохрому c знижується майже у три рази (рис. 3).

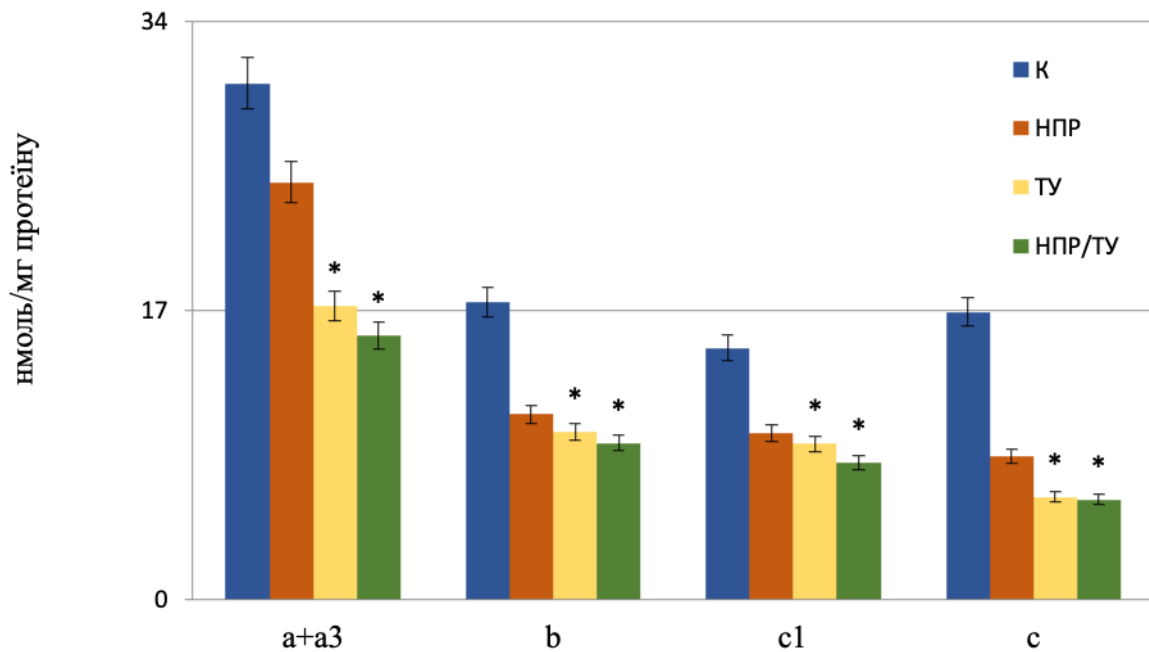


Рис. 3. Вміст мітохондріальних цитохромів у нирках щурів за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном

Можна припустити, що таке виражене зниження вмісту цитохрому c зумовлено його посиленням виходом з мітохондріальних мембран за умов активації вільнорадикальних процесів. Відомо, що вміст цитохромів залежить від балансу активності їх синтезу та розпаду. Ключовими ферментами, які забезпечують синтез гему, є δ -амінолевулінатсинтаза, а ключовим ферментами розщеплення – гемоксигеназа. δ -амінолевулінатсинтаза (КФ 2.3.1.37), яка розглядається як ключовий ензим метаболічного шляху синтезу гему, бере участь у першій реакції біосинтетичного шляху гему [9]. Гемоксигеназа (КФ1.14.99.3)

вважається ключовим ензимом деградації гему і каталізує реакцію окисного розщеплення гему [10].

Результати проведених досліджень показали, що за дії токсичних доз ацетамінофену у тварин групи ТУ та НПР/ТУ δ -амінолевулінатсинтазна активність знижується приблизно у 1,6 рази, тоді як гемоксигеназна активність зростає у 1,5 рази порівняно з показниками контролю (рис. 4, рис. 5), що вказує на активацію катаболізму гему при одночасному сповільненні його синтезу.

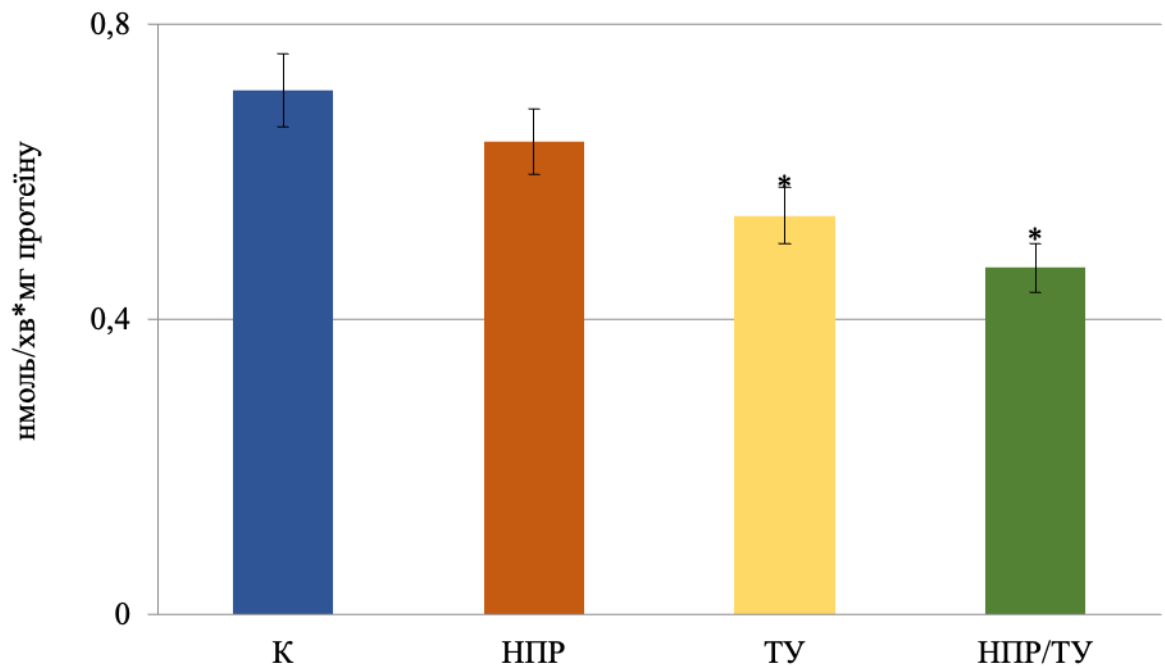


Рис. 4 δ -амінолевулінатсинтазна активність у мітохондріях нирок щурів за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном

Підвищення активності гемоксигенази можна розглядати як компенсаторну реакцію, що виникає у відповідь на порушення структурної організації гемопротеїнів електронтранспортного ланцюга. Імовірно, ця реакція спрямована на попередження накопичення неспецифічно зв'язаного гему, який виявляє прооксидантні властивості [32]. За участі гемоксигенази гем перетворюється у білівердин, що супроводжується вивільненням монооксиду карбону і заліза. Утворені продукти цієї ензиматичної реакції – білівердин та

монооксид карбону (CO), як показано у літературі, виявляють виражений цитопротекторний ефект: білівердин та білірубін здатні проявляти антиоксидантну активність, пригнічують запальні реакції [42] та виступають регуляторами деяких сигнальних шляхів. Крім того, підвищення активності гемоксигенази буде стимулювати синтез феритину з подальшим хелатуванням вивільненого заліза, наслідком чого буде зменшення проявів оксидативного стресу [43]. Тому посилене утворення таких метаболітів буде активувати антиоксидантні, протизапальні, антиапоптичні механізми, які залучаються у процеси попередження ураження нирок при гострій нирковій недостатності. Такі цитопротекторні властивості гемоксигенази були відкриті саме при вивченні гострої ниркової недостатності. У літературі показано, що активація ензиму гемоксигенази зменшує прояви ураження нирок, тоді як нокаут гемоксигенази буде супроводжуватися підвищенням проявів нефротоксичності, яка була досліджена у моделях з використанням лікарських препаратів, зокрема метотрексату або циклоспорину А [44]. При цьому надмірне утворення продуктів катаболізму гему може, навпаки, призводити до негативних наслідків.

“У свою чергу вивільнення гему внаслідок порушення структурної організації гемопротейнів дихального ланцюга може призводити до зниження активності δ -амінолевулінатсинтази або за рахунок репресії відповідного гену через зв’язування фактору транскрипції з регуляторним елементом гему, або за рахунок пригнічення інших позитивних факторів транскрипції” [45]. “На рівні ензиму активність δ -амінолевулінатсинтази регулюється гемом або шляхом попередження імпорту в мітохондрії, або шляхом індукції деградації за участі протеаз” [46].

Отже, показане нами зменшення вмісту мітохондріальних цитохромів за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та дефіциту протеїну у раціоні може бути наслідком підвищення гемоксигеназної активності на тлі зниження δ -амінолевулінатсинтазної активності.

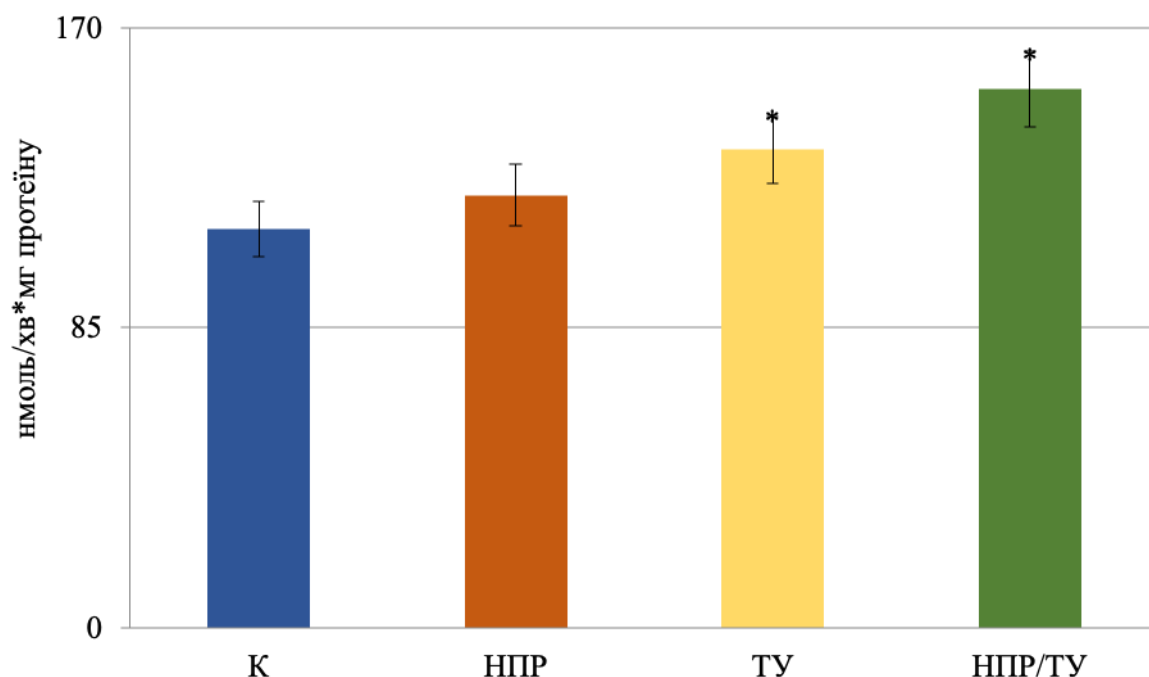


Рис. 5 Гемоксигеназна активність у мітохондріях нирок щурів за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та різної забезпеченості раціону протеїном

Отже, встановлене нами зниження активностей убіхінол-цитохром-с-оксидоредуктази та цитохромоксидази, ймовірно, буде призводити до порушення окисного фосфорилювання та формування енергодефіциту у нирках. Результати проведених досліджень щодо вмісту цитохромів та активностей ключових ензимів метаболізму гему у нирках свідчать, що за досліджуваних умов може спостерігатися поглиблення енергетичного дисбалансу. Водночас зростання гемоксигеназної активності та одночасне зниження δ-амінолевулінатсинтазної активності може розглядатися як один із можливих механізмів зменшення вмісту цитохромів у мітохондріях за умов впливу токсичних доз ацетамінофену та подальшого порушення ензиматичної активності комплексів III та IV дихального ланцюга.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що за умов чотиритижневого споживання низькопротеїнового раціону у нирках щурів не спостерігається достовірних змін ензиматичних активностей III та IV комплексів дихального ланцюга, проте спостерігається зниження вмісту мітохондріальних цитохромів при збереженні активностей δ -амінолевулінатсинтази та гемоксигенази на рівні показників контролю, що, ймовірно, свідчить про порушення синтезу білкової частини цитохромів за досліджуваних умов.

2. Показано, що максимально виражені зміни убіхінол-цитохром-*c*-оксидоредуктазної та цитохромоксидазної активностей, вмісту цитохромів $a+a_3$, b , c та c_1 , зниження δ -амінолевулінатсинтазної та підвищення гемоксигеназної активностей характерні для тварин, які отримували токсичні дози ацетамінофену на тлі аліментарного дефіциту протеїну. Отримані дані свідчать про активацію катаболізму гему цитохромів та одночасне сповільнення його синтезу за досліджуваних умов.