

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біології, географії і екології

Кафедра біології людини та імунології

ГЕМОКСИГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ ПЕЧІНКИ, СЕЛЕЗІНКИ І
НИРОК МОЛОДИХ ТА СТАРИХ МИШЕЙ

Кваліфікаційна робота (проект)

на здобуття рівня вищої освіти «магістр»

Виконала: студентка 2 курсу
05-13-211м групи
Спеціальність 091. Біологія
Освітньо-професійної (наукової)
програми «Біологія»
Бальоха Ганна Юріївна

Керівник
к.б.н., доц. Бесчасний С.П.
Рецензент
проф.біол.н. Ходосовцев О.Є.

Херсон – 2019

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика гемоксигенази	9
1.1. Характеристика гемоксигеназної системи.....	9
1.2. Біохімічні характеристики молекул гемоксигенази.....	16
1.3. Фізіологічна роль гемоксигенази.....	19
1.3.1. Гемоксигеназа, як білок теплового шоку.....	19
1.3.2. Зв'язок активності гемоксигенази із маркерами біохімічного стресу.....	27
1.3.3. Клінічне значення гемоксигенази.....	27
1.3.4. Роль гемоксигенази у функціонуванні серцево-судинної системи.....	30
1.4. Характеристика білки теплового шоку.....	32
1.4.1. Структурно – функціональна характеристика білків теплового шоку.....	33
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи визначення гемоксигенази	36
2.1. Досліджувальні групи лабораторних тварин.....	36
2.2. Методика визначення активності гемоксигенази.....	37
2.2.1. Визначення кількості утвореного білірубіну.....	41
2.3. Підрахунок кількості загального білку.....	45
РОЗДІЛ 3. Результати та обговорення методів дослідження	
3.1. Показники активності гемоксигенази молодих та старих дослідних мишей.....	50
3.1.1. Активність гемоксигенази в тканині печінки.....	50
3.1.2. Рівень гемоксигенази в селезінці.....	51
3.1.3. Вміст гемоксигенази в нирках.....	52

3.2. Залежність активності білка теплового шоку від віку дослідних тварин.....	53
ВИСНОВКИ.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	56
ДОДАТКИ.....	65
Додаток А.	66

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ - аденозинтрифосфат

ГО – гемоксигеназа

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

ФТШ – фактор теплового шоку

СО – монооксид вуглецю

HSP – (Heat shock proteins) білок теплового шоку

NADH – (Nicotinamide adenine dinucleotide) Нікотинамідаденіндинуклеотид

NADPH – (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

Нікотинамідадениндинуклеотидфосфат

NO – оксид азоту

ВСТУП

Актуальність теми. У клітинах людини гемоксигеназа-1 бере участь, головним чином, у захисті від несприятливого впливу оксидантного стресу. Проте її індукцію можуть викликати прозапальні стимули, наприклад додавання ІЛ-1 β . Протективне значення гемоксигенази-1 полягає в гальмуванні синтезу прозапальних факторів (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ФНП- α), підвищенні протизапальних цитокінів (ІЛ-10), а також продуктів деградації гема і їх метаболічних дериватів. Монооксид вуглецю (СО) зменшує вироблення індукцибельної NO-синтази (iNOS), циклооксигенази-2, що відповідають медіаторам запалення - NO і простагландинів [60, 75].

Недавні дослідження науковців показали, що гемоксигеназа-1 проявляє захисний ефект в умовах захворювань, під дією стимулів і особливо в ряді трансплантаційних моделей [20].

Перспективним є розгляд питання, щодо використання HSP в онкології на сучасному етапі розвитку. З точки зору створення протипухлинних вакцин, цінною є властивість HSP зв'язуватися з пептидами пухлинної клітини і фактично нести антигенний репертуар тієї клітини, із якої вони отримані. Імунізація HSP 70, HSP 90, виділеними з пухлинних клітин, викликає утворення специфічних цитолітичних Т-лімфоцитів. Цього не спостерігалось при введенні аналогічних білків, отриманих з інших тканин. Інший білок цього сімейства: HSP 110 - також може використовуватися в імунотерапії раку.

У тканині нирок щурів експресія гемоксигенази виявлена у клітинах Боуменовської капсули, тубулярних епітеліальних клітинах проксимальних каналців, збірних трубочок, папілярному епітелії та інтерстиції. У людини гемоксигеназа продукується переважно клітинами дистальних каналців, у

меншій мірі - проксимальних [41]. При експериментальному ПАН-нефрозі, внутрішньоклітинна експресія гемоксигенази підвищується в мезангіальних клітинах, тубулярних клітинах петлі Генле, дистальних каналців, збірних трубочок. У цьому випадку, збільшення рівня гемоксигенази в цитоплазмі тубулярних клітин може бути обумовлено підвищеною реабсорбцією білка або відображає захисну реакцію на пошкоджуючі агенти [54]. У мезангіальних клітинах гемоксигеназа може виконувати функцію захисту від апоптозу, так як ці клітини під дією гемоксигенази набувають резистентності до оксидантного стресу [83].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Випускна робота виконана відповідно до напрямку науково-дослідної роботи кафедри біології людини та імунології Херсонського державного університету «Дослідження механізмів плейотропного впливу рекомбінантного інтерферону альфа на організм» (державний реєстраційний номер 0117U005021, керівник доцент Бесчасний С.П.).

Мета роботи – дослідити активність гемоксигенази в печінці, селезінці та нирках лабораторних тварин в залежності від віку.

Об'єкт дослідження – печінка, селезінка та нирки лабораторних мишей.

Предмет дослідження – активність мікосомальної гемоксигенази в органах лабораторних тварин різного віку.

Для вирішення поставленої мети у роботі було намічено вирішити такі **задачі**:

1. Провести аналітичний огляд літературних джерел за темою дослідження;
2. З'ясувати активність гемоксигенази в тканині печінки;
3. Дослідити активність гемоксигенази в тканинах селезінки та нирок;
4. З'ясувати залежність між активністю гемоксигенази в печінці, селезінці та нирках в залежності від віку тварин.

Для розв'язання визначених завдань та досягнення мети застосовано наступні **методи дослідження**: для досягнення мети та вирішення поставлених задач застосовували методи аналізу та синтезу наукової та науково методичної літератури з тематики дослідження, біохімічні методи.

Новизна одержаних результатів. Вперше встановлено що у лабораторних тварин зі збільшенням віку зменшується активність гемоксигенази, найбільші зміни зафіксовано у печінці.

Практичне значення одержаних результатів . Отримані данні можуть бути використані при викладанні дисциплін «Імунологія», «Клітинні основи кровотворення», «Фізіологія людини і тварин», «Культура клітин і тканин», які викладаються для студентів спеціальностей 091 Біологія та 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини). Також відомості стосовно ролі гемоксигенази у здійсненні імунних реакцій необхідні для діагностики хвороб імунної, серцево – судинної систем та системи крові в повсякденній роботі лаборанта та лікаря лаборанта.

Апробація результатів досліджень. Основні положення та результати роботи висвітлені у збірнику наукових та методичних праць «Метода (наука і техніка)», м. Херсон, Херсонський державний університет, 2019 р.

Також тези висвітлені на Всеукраїнській науково – практичній конференції, присвяченій 80-річчю від дня народження д.б.н., проф. Явоненка О. Ф. та 75 – річчю від дня народження д.б.н., проф. Яковенка Б. В. «Тернопільських Біологічних читаннях Ternopil Bioscience - 2019», м. Тернопіль, Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, 2019 р.

Публікації за темою магістерської роботи включають одну статтю та тези у збірнику наукових праць.

Структура роботи. Робота складається з 3-х розділів, 1-го додатку, 83 найменування літературних джерел; робота містить 7 таблиць і 15 рисунків; загальний обсяг роботи складає 68 сторінок, основна частина – 55 сторінок.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОКСИГЕНАЗИ

1.1. Характеристика гемоксигеназної системи

Гемоксигеназа – це мітосомальний фермент, який каталізує розщеплення гема до білівердину, вільного заліза і СО. Гемоксигеназа-1 є індукцибельною ізоформою, синтез якої підвищується під впливом температурного впливу, а також компонентів гема, йонів важких металів, цитокінів і реактивних радикалів кисню [56]. Будова молекули білка зображена на рис.1.1.

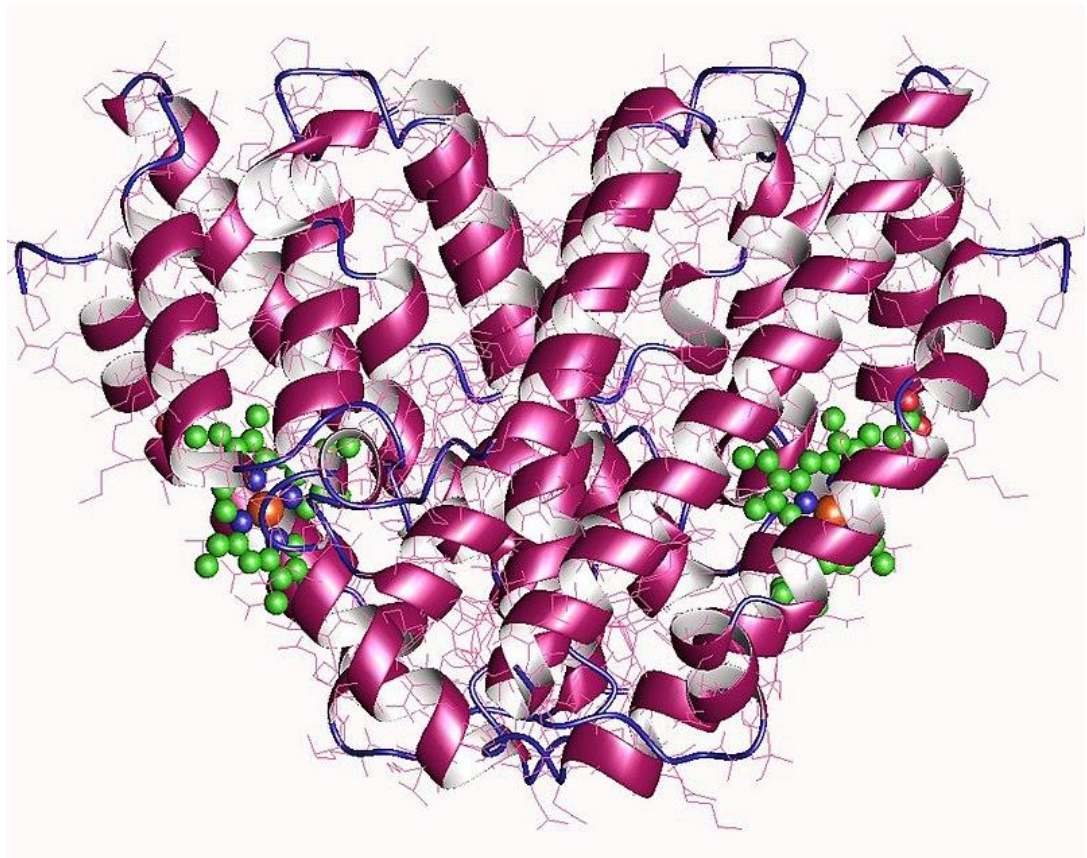


Рис. 1.1. Просторова модель молекули гемоксигенази

В мітохондріях починається синтез тетрагідропіррольних кілець. З проміжного продукту цитратного циклу (сукцинил-КоА), конденсацією з гліцином виходить продукт, декарбоксилювання якого призводить до 5-амінолевулінату. Головний фермент всього шляху – 5-амінолевулінат-синтаза, що відповідає за цю стадію. Експресія синтезу амінолевулінат-синтази гальмується кінцевим продуктом, тобто гемом - це класичний випадок пригнічення кінцевим продуктом, або гальмування за типом зворотного зв'язку [28].

Після синтезу 5-амінолевулінат переходить з мітохондрій в цитоплазму, де конденсуються 2 молекули в порфобіліноген, який вже містить піррольне кільце. Порфобіліноген-синтаза інгібується йонами свинцю. Тому виявляють підвищення концентрації 5-амінолевуліната при гострих отруєннях свинцем в сечі і крові [70].

На наступних стадіях утворюється характерна для порфірина тетрапіррольна структура. Зв'язування чотирьох молекул порфобіліногена з відщепленням NH_2 -груп і утворенням уропорфіриногену III каталізується гідроксиметилбілан-синтазою. Для утворення проміжного продукту потрібний другий фермент, уропорфіриноген III-синтаза. До утворення «неправильного» ізомера – уропорфіриноген I призводить відсутність цього ферменту [49].

Тетрапіррольна структура уропорфіриногена III істотно відрізняється від гема. Це пов'язано з тим, що кільце містить тільки 8 замість 11 подвійних зв'язків та відсутній центральний атом заліза. Кільця несуть заряджені бічні ланцюги R (4 пропіонатних залишків та 4 ацетатних). Через те що, в неполярному оточенні функціонують групи гема в білках, необхідно, щоб полярні бічні ланцюги перетворилися в менш полярні.

Спочатку декарбоксілюють 4 ацетатних залишки з утворенням метильних груп. [49].

Утворений копропорфіриноген III (рис. 1.2) знову повертається в мітохондрії. Подальші стадії каталізуються ферментами, які локалізовані на / або всередині мітохондріальної мембрани. Перш за все, під дією оксидази дві пропіонатні групи (R2) перетворюються в вінільні. Модифікація бічних ланцюгів закінчується утворенням протопорфіриногена IX [80].

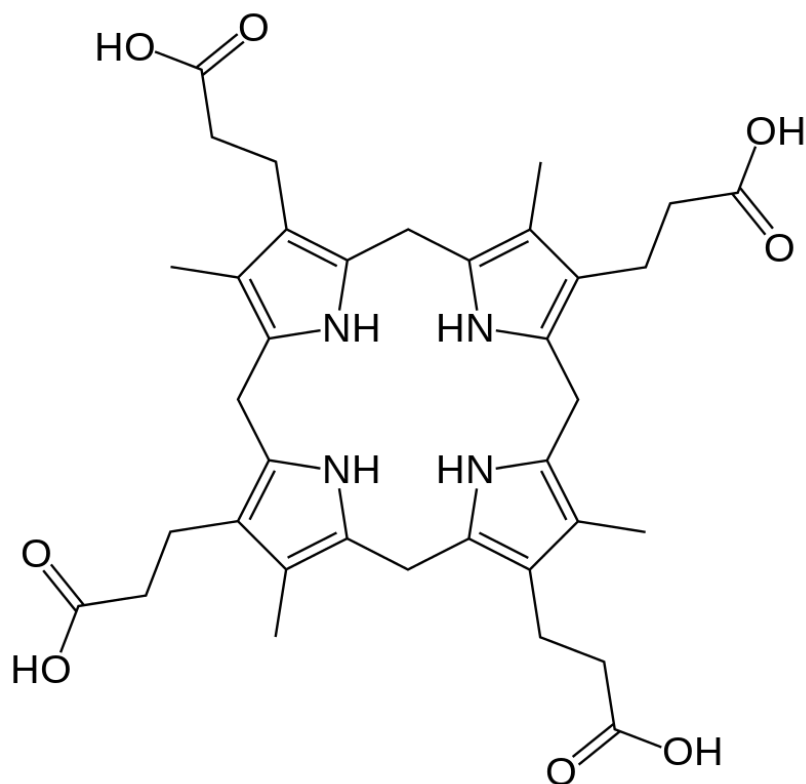


Рис. 1.2. Структурна формула копропорфіриногену III

На наступній стадії за рахунок окислення створюється в молекулі сполучена p-електронна система, яка надає характерне червоне забарвлення гему. Витрачаючи при цьому 6 відновлювальних еквівалентів. За допомогою ферменту, феррохелатази, на закінчення в молекулу включається атом двовалентного Fe. Утворений у такий спосіб гем або

залізо-протопорфірин ІХ включається, наприклад, в міоглобін і гемоглобін, де він пов'язаний ковалентно з цитохром С, або нековалентно [48, 74]. Детальна схема біосинтезу гема приведена на рис. 1.3.

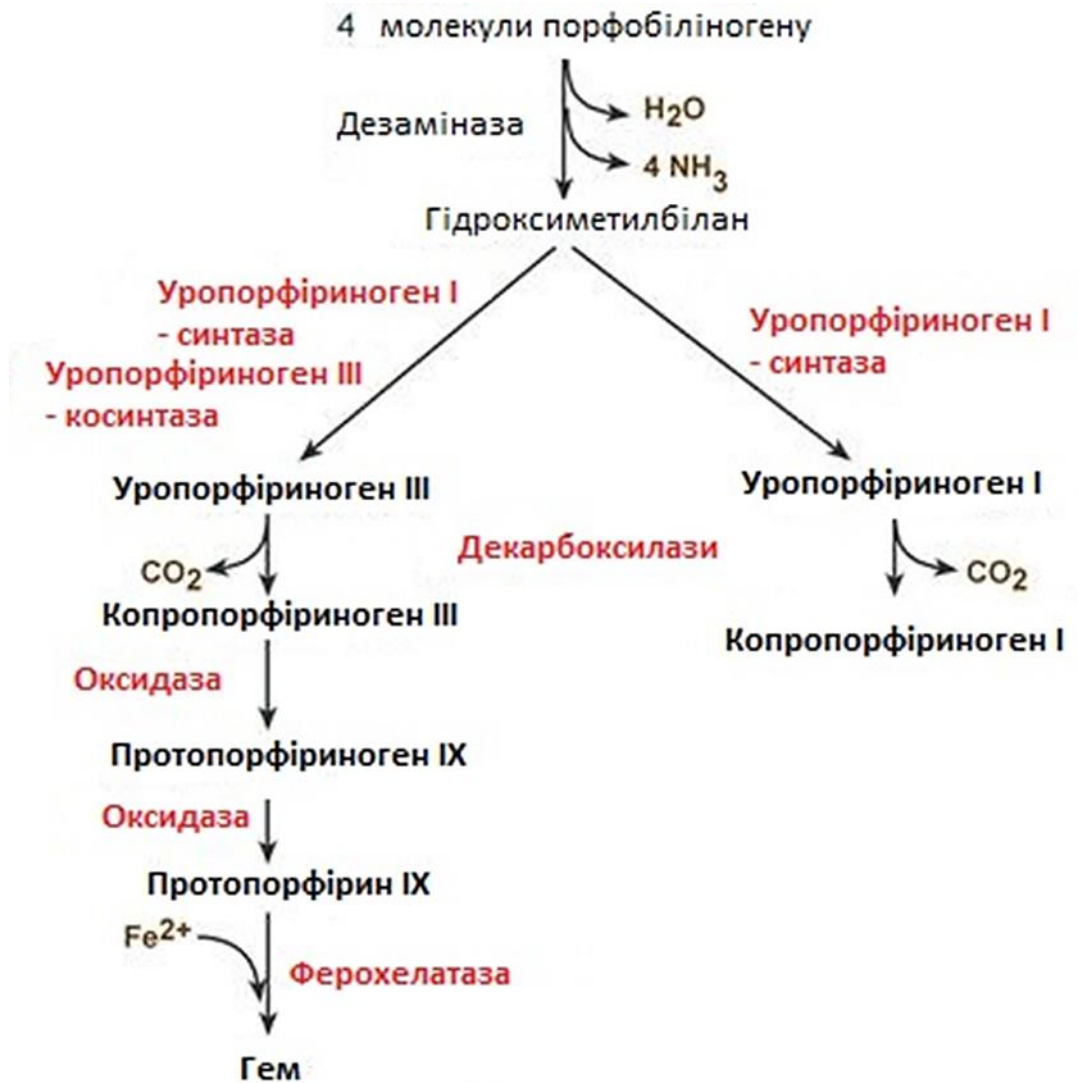


Рис. 1.3. Схема біосинтезу гема

Швидкість утворення гема залежить, з одного боку від накопичення вільного гему в тканині, що визначається також швидкістю руйнування гемоксигенази, а з іншого - активності головного ферменту синтезу гема - 5-амінолевулінатсинтази (синтетаза 5-амінолевуліної кислоти) [14].

Біосинтез гема, можливо, здійснює контроль за принципом зворотного зв'язку, тобто системи регуляції, при котрій накопичення продукту, що створюється в ході реакції, є сигналом для повного припинення реакції або гальмування. Роботами Гранік було встановлено, що швидкість утворення гема залежить від реакції утворення 5-амінолевулінової кислоти. Можна припустити, що гем пригнічує утворення синтази АЛК [12].

Додатковим джерелом є гем, що вивільнений з клітинних гемопротейнів, а в клітинах, що мають рецептори до гем- і гемоглобінзв'язуючих білків плазми крові, також гем, вивільнений з гемоглобіну еритроцитів [69, 71].

Основними шляхами утилізації гема в клітці є синтез гемопротейнів, зв'язування гемзв'язувальними білками, а також його деградація в гемоксигеназній реакції [16].

У нормі процеси синтезу, зв'язування гема і деградації знаходяться в динамічній рівновазі, що забезпечує запобігання накопиченню вільного гема, що володіє сильними прооксидантними властивостями [46, 56].

Характеристика ферменту. У клітинах ссавців широко представлений клас ферментів - оксигеназ, які каталізують окисно-відновні процеси за участю молекулярного кисню. В даний час відомо більше 1000 індивідуальних ферментів цього класу і понад 1200 кодують їх генів [4].

Оксигенази поділяються на діоксигенази, котрі впроваджують два атома кисню в молекулу субстрату, і монооксигенази, що каталізують реакції з включенням одного атома кисню в субстрат, в той час як інший відновлюється до води. Найбільш численними монооксигеназна реакціями є реакції за участю цитохрому P450 (монооксигенази зі змішаними функціями) [9].

Монооксигенази приймають участь в метаболізмі і синтезі багатьох класів фізіологічних сполук - жовчних кислот, стероїдних гормонів, нейротрансмітерів, вітамінів, жирних кислот, простагландинів, ксенобіотиків. Зазвичай в якості відновника в монооксигеназна реакціях приймає участь NADPH або NADH [2, 18].

Монооксигенази в клітині численні і різноманітні. Участь в процесах, пов'язаних з запасанням клітиною енергії, мало ймовірно. Вони каталізують реакції вільного окислення [20].

До монооксигеназ відносяться і гем-оксигенази (ГО), які є швидкістю лімітуючим ферментом, що каталізує перетворення гема в білівердин, монооксид вуглецю (CO) і залізо [20, 56].

Гемоксигенази – це оксигенази із змішаними функціями. При цьому один атом поглиненої молекули кисню використовується для окиснення речовини до нього, шляхом прямого приєднання, а інший при наявності відповідного донора електронів відновлюється до води. [56]

Деградація гема до гемоглобіну здійснюється за допомогою 2 механізмів: хімічного і ферментативного. Однак обидва ці механізми йдуть з утилізацією молекулярного кисню O_2 і вимагають для відновлення гема заліза з Fe^{3+} в Fe^{2+} , відновних агентів. В реакції, що каталізується гемоксигенази, джерелом відновлювальних еквівалентів є NADPH [20, 56]

Субстрати, продукти і каталізуюча реакція. Метеновий атом вуглецю окиснюється до CO і гемоксигеназа специфічно розщеплює А - метеновий місток гема, і два атоми кисню включаються в тетрапіррол - білівердин [56].

Бічні гідрофобні ланцюги, спрямовують площину гема в гідрофобні щілини білка, що забезпечують можливість вбудовування одного атома кисню в вуглецевий місток між другим і першим кільцями порфірину в той час як інший атом кисню відновлюється до води. Наступне приєднання

води призводить до утворення нестабільної структури, від якої відщеплюється містковий вуглець у формі монооксиду вуглецю, в результаті чого і утворюється білівердин [20, 56].

Для гемоксигенази найкращим субстратом є протогемін IX, який ще називають метгем, пов'язаний з альбуміном (метгемальбумін), проте метгемоглобін, гемоглобін - гаптоглобіновий комплекс також є субстратом для гемоксигенази [56].

Не атакують гемоксигенази такі субстрати, як оксигемоглобін, карбоксигемоглобін і міоглобін. Безпосереднім субстратом для гемоксигенази є хелатний комплекс з металом, а вільні порфірини не атакують [38].

Джерелом основної частини білівердина, що утворюється в ретикулоендотеліальній системі, є гем гемоглобіну, проте інші гемопротеїни, такі як цитохром P450, триптофанпірролаза, цитохром b5 і каталаза також атакують гемоксигенази, тобто їх гем вносить свій внесок в утворення пулу білівердина [38].

Форми гемоксигенази. На даний час відомі три ізоформи гемоксигенази. Гемоксигеназа – 1 - індукцйбельна форма ферменту, яка відповідає за адаптаційні процеси організму до таких стресів як дія важких металів, гіпоксія, окислювальний стрес, і дія цитокінів [82].

Гени, відповідальні за синтез гемоксигенази – 1 розташовані у людини в довгому плечі двадцять другої хромосоми в позиції 13.1 від підстав 34, 636, 101 до 34, 748, 114 [52, 55].

Гемоксигеназа-2 – конститутивна ізоформа ферменту (36 kDa), експресія якого відбувається при нормальних фізіологічних умовах. Локалізується дана ізоформа виключно в ЕПР і активується протеїнкіназою C та іншими біологічно активними сполуками. Гени, відповідальні за

синтез гемоксигенази – 2 у миші та у людини розташовані у 16 хромосомі [37, 55, 57].

Відносно нещодавно була відкрита третя форма - гемоксигенази-3 (36 kDa) - конститутивна форма гемоксигенази, яка на 90% гомологічна гемоксигеназі – 2. Гемоксигеназа – 3 була знайдена в тканинах багатьох органів: легенях, селезінці, серці, печінці, нервовій тканині. Гемоксигеназа – 3 складається із 2 регуляторних субодиниць, що беруть участь в зв'язуванні гема. Гемоксигеназа – 3 менш активна каталітично, ніж гемоксигеназа – 2, це пов'язано з тим, що працює вона тільки в присутності кисню [53, 61].

Гемоксигеназа – 1 і гемоксигеназа – 2 найбільш докладно вивчені і охарактеризовані: Гемоксигеназа – 1 була відкрита більше тридцяти років тому, і розпочалась з моменту ідентифікації гемоксигенази – 2 пройшло близько двадцяти років [53].

Ферменти є продуктами активності генів, різних за організацією, структурою і розташуванням, і ні за амінокислотним складом, ні за розміром або числом транскриптів близької схожості для них не виявлено [53, 55, 68].

Гемоксигеназа – 1, відома також під назвою HSP 32, менше інших ізоформ, її молекулярна вага близько 30-33 kDa [58].

1.2. Біохімічні характеристики молекул гемоксигенази

Значимість біологічної активності гемоксигенази-1 і її індукції більш чітко продемонстрована на прикладі таких патологічних станів, як затримка росту, анемія і накопичення заліза в тканинах, які спостерігаються у мишей з дефіцитом гемоксигенази-1. У той час, як

більшість мишей, позбавлених гена MB-2 нормально ростуть і розвиваються, більшість мишей, позбавлених гена MB-1 характеризуються затримками зростання, аномаліями розвитку і, в основному, не доживають до дорослого віку, а ті, які доживають, живуть не більше 40 тижнів [18].

У літературі є повідомлення про функціонування гемоксигенази-1 як захисну молекулу [18, 78].

Ряд досліджень свідчить на користь спроможності гемоксигенази-1 пригнічувати апоптоз, шляхом регулювання рівня внутрішньоклітинного заліза, який виявляє сильні прооксидантні властивості. Апоптоз - загальноклітинна відповідь на шкідливу дію окислювачів, що залучає активні форми кисню в процес запрограмованої клітинної загибелі [44, 63, 78].

Феріс і співавтори пов'язують захисну дію гемоксигенази-1 також зі здатністю ферменту знижувати концентрацію заліза у внутрішньоклітинному середовищі і пояснюють даний ефект хелатацією заліза, згідно з іншими джерелами захисну дію гемоксигенази-1 обумовлено утворенням білівердину і білірубину [18, 44].

Петраче і колеги на фібробластах мишей продемонстрували, що надекспресія гемоксигенази-1 призводить до виникнення апоптозу, опосередкованого фактором некрозу пухлини - тобто до (TNF) -A- залежному апоптозі [62].

Антиапоптичний ефект гемоксигенази-1 не проявляється в присутності протопорфірину, специфічного інгібітору активності гемоксигенази-1. Ті ж автори повідомляють, що CO також призводить до (TNF)-A- індукваному апоптозі, не дивлячись на те, що апоптозпротекторний ефект може бути опосередкований CO ендогенного походження [62].

Антиапоптична дію гемоксигенази-1 вимагає подальшого детального вивчення, можливо, що гемоксигенази-1 проявляє різну ступінь антиапоптичного ефекту в залежності від виду живих організмів, типу клітин і особливості дії проапоптичного фактору [79].

Недавні дослідження показали, що гемоксигеназа-1 проявляє захисний ефект під дією стимулів і в умовах захворювань, особливо в ряді трансплантаційних моделей. Виявлено, що індукція експресії гемоксигенази-1 в печінці донорів подовжує виживання трансплантата і покращує тривалість їх функцій після збільшеного часу ішемії [20].

Показано, що гемоксигеназа-1 бере участь у захисті клітин від ушкоджень, викликаних ішемією-реперфузією [18].

Гем функціонує в організмі як компонент ряду важливих гемопротеїнів або безпосередньо бере участь в регуляторних процесах. Накопичення вільного гема, в тому числі в судинах і серцевому м'язі, представляє велику небезпеку, оскільки веде до посилення утворення активних форм кисню (АФК) з наступним пошкодженням клітин і тканин і розвитком різних патологій [18, 19, 70].

Один з механізмів захисту від прооксидантної дії гема - зв'язування і руйнування гема гемоксигенази (ГО), чим обумовлена також важлива біологічна роль гемоксигенази [59].

Однак було б помилково вважати експресію гемоксигенази-1 виключно позитивним явищем. Посилена експресія гемоксигенази-1 при патологічних станах, що вважаються потенційно повреждаючими, залишають відкритим питання щодо функціональної ролі даного ферменту і його участь у розвитку захворювання [18].

Відомо, що посилення індукції гемоксигенази-1 супроводжує гостру ниркову недостатність, атеросклероз, ішемію-реперфузію, відторгнення трансплантата, хвороба Альцгеймера, сепсис, ендотоксимію, астму, рак,

захворювання ендокринної системи, ретинопатії, пошкодження спинного мозку, шлункові і легеневі захворювання, залізодефіцитну анемію, і ряд інших патологічних станів [18, 19].

Подвійність дії гемоксигенази-1 і складності у визначенні діапазонів індукції ферменту з позитивним впливом вимагають подальшого вивчення і є перспективним напрямком, оскільки можуть дати можливість втручатися в патологічний процес за допомогою змін рівня експресії гемоксигенази-1, використовуючи генетичні або фармакологічні методи [18].

1.3. Фізіологічна роль гемоксигенази

1.3.1. Гемоксигеназа, як білок теплового шоку. Жива клітина, як і організм, здатна захищатися від перегріву, гіпоксії, аноксії і інших факторів шляхом включення молекулярних систем захисту. Одне із загальних властивостей клітин живих організмів полягає в тому, що у відповідь на зростання температури, як агента, що ушкоджує, вони включають синтез специфічного набору білків, які допомагають клітині вижити в умовах температурного стресу і повернутися після його припинення до нормального життя. Подібність амінокислотної послідовності (гомологія) ряду з них у різних організмів говорить про їх консервативність в еволюції, характерною для життєво важливих білків. Саме з цим типом білків, з так званими «білками теплового шоку» (Heat Shock Proteins, HSP), або білками стресу, пов'язують розвиток феномена адаптаційної стабілізації структур при екстремальних станах [67].

Своєю назвою HSP зобов'язані випадковій обставині, а саме тому, що вперше вони були виявлені в клітинах, які піддавали потужній термічній обробці. Це сталося в лабораторії генетики і біофізики в Неаполі в 1962 р., коли Ritossa F. виявив, що короткочасний підйом температури, яка викликає утворення пуфів на хромосомах слинних залоз «*Drosophila melanogaster*». Пізніше було встановлено, що утворення пуфів супроводжується зростанням синтезу HSP. Проведений в 1974 р. електрофоретичний аналіз продуктів генів, локалізованих в пуфах, показав, що існує кілька груп HSP, кожна з яких відповідає певному сімейству генів [67].

У 1974 році A.Tissieres виявив деспіралізації хромосом в цих ділянках і зв'язав утворення пуфів зі збільшенням експресії генів, що кодують синтез особливих білків [10]. Названі згодом білків теплового шоку ці білки забезпечували транзиторну толерантність до високих, зазвичай летальних, температур, індукуючи помірним прогріванням тіла. Пізніше було встановлено, що синтез білків теплового шоку індукується не тільки при підвищенні температури, але і при багатьох інших несприятливих впливах, таких як додавання до клітин органічних розчинників, важких металів, сильних оксидантів, а також під впливом деяких гормонів і ростових факторів. У зв'язку з цим деякі називають білки теплового шоку стрес-білками [20].

Для розуміння значення HSP в розвитку уявлень про природу клітинної відповіді на зміну зовнішніх умов середовища важливим є визначення декількох моментів: HSP були виявлені у всіх клітинах і організмах, вивчених до теперішнього часу, тобто експресія цих консервативних білків є загальною ознакою реакції живих систем на несприятливі фактори зовнішнього середовища; встановлено, що стрес-сміттєві чинники: тепло; гіпоксія, аноксія, ішемія; магнітне поле,

радіоактивне випромінювання, ультрафіолетове світло; гіпер- і гіпоосмолярність; окислювальний стрес; інфекції, деякі віруси; лихоманка, запалення; гемодинамічний стрес; мутагени, канцерогени, тератогени; алкоголь, нікотин, метали (Cd^{2+} ; Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; Pb^{2+}), фенол; інсектициди, пестициди) - здатні індукувати синтез HSP, що демонструє універсальність цього механізму клітинної відповіді на стрес; з'ясувалося, що HSP можуть існувати в клітинах в нормальних умовах або їх рівень може модулюватися агентами, стимулюючими в клітині нормальні фізіологічні процеси: диференціювання, проліферація і апоптоз. Це свідчить про універсальність феномена HSP, що ґрунтується на їх високій консервативності (60-70% гомології між білками еукаріот і 40-60% - між білками прокаріот). Ще одним відкриттям стало те, що після впливу теплового шоку клітини набували стійкість не тільки до подальшого більш сильного теплового впливу, а й до інших видах стресу. Цей феномен отримав назву «крос-толерантність» [67].

З моменту, коли в 1974 році була доведена індукція HSP в клітинах плодової мушки, оновився арсенал методів, за допомогою яких фіксується різке збільшення синтезу HSP або накопичення цих білків. Вперше синтез HSP був виявлений за допомогою аналізу знову синтезованих білків, які включили радіоактивну амінокислоту-попередник [23].

Метод полягає в тому, що клітини або тканина інкубуються з амінокислотами, поміченими ізотопами ^{14}C або ^{35}S . Мічені амінокислоти потрапляють протягом місяця в клітини і включаються далі і знову синтезуються поліпептиди. В цьому випадку помічаються тільки ті білки, синтез яких потрібен клітині в період інкубації з міткою; саме в число цих білків потрапляють HSP. Потім опрацьований матеріал піддають на електрофорез і експонують з рентгенівською плівкою. На плівці після

експозиції можуть бути видні зони, які відповідають поліпептидам, синтезованим в період мічення [29].

Крім методів визначення індукції HSP використовуються технології визначення обсягів HSP в клітині, тому що для функціонування в умовах дії стресового чинника клітині, мабуть, потрібні значні кількості HSP. Рівень накопичення білка прийнято оцінювати за допомогою імуноблоттинга, ІФА або тесту імунопреципітації. Метод імуноблоттинга (вестерн-блот-аналіз) включає в себе електрофоретичний поділ клітинних білків, перенесення їх на нітроцеллюлезну мембрану, інкубацію останньої з антитілами, дізнавшись певний білок, і з іншими антитілами, пов'язаними з ферментативною або радіоактивною міткою і спрямованими проти перших. Залежно від типу мітки блотт далі поміщають в розчин, що містить субстрат ферменту і хромоген. За допомогою імуноблоттингу можна виявити пікта-грамові кількості білка і найтонші зміни в рівні останнього в клітинах під впливом стресового чинника [8, 17].

Реакція клітини на будь-який вплив або фактор розпадається на ряд окремих молекулярних процесів, одним з яких є індукція HSP. У клітинах людини виявлено 11 генів, що кодують HSP. Все HSP можна розділити на ряд груп відповідно до молекулярних мас складових їх білків. У еукаріотичної клітці теплової шок чи інший вид стресу здатний викликати синтез HSP: HSP 100/110, HSP 90, HSP 70, HSP 60, HSP 40, HSP 25/27 і HSP 10. Кожне сімейство являє собою продукт групи споріднених генів, і ступінь гомології між окремими членами родини буває дуже високим. Між членами різних сімейств ніякої гомології не простежується. Визнана важлива роль HSP 70 в розвитку патологічних станів. Сімейство HSP 70 ссавців включає 4 білка [21, 23, 43]:

- HSP 72 - основний білок, індукований різними стресу фактори (тепловим шоком, важкими металами і аналогами амінокислот, ішемією). Локалізується в основному в цитоплазмі, при певних умовах виявляється в ядрі. При стресі бере участь у запобіганні денатурації або агрегації цитоплазматичних, ядерних і мембранних білків, а також у розбиранні агрегатів денатурованих білків в період відновлення після стресу;

- HSP 73 - конститутивний білок цитоплазми і ядра, бере участь в лізосомальній деградації білків, біосинтезі, збірці і транслокації поліпептидів, транспорті нуклеофільних білків;

- ГРБ 75 - конститутивний глюкозорегульований білок матриксу мітохондрій. Він є необхідним елементом транслокаційної «машини» і бере участь в складанні мітохондріальних білків і олігомерів;

- ГРБ 78 (Grp 78, BiP) - конститутивний глюкозорегульований білок матриксу ЕПР. Як і ГРБ 75, бере участь в транслокації білків і збірці олігомерів.

Також сімейство HSP 70 ділиться на дві групи: конститутивні і індукцйбельні. Конститутивні HSP 70 при стресі слабо індукуються, маючи високий базальний рівень. Синтез індукцйбельних HSP 70 різко збільшується при стресі, практично відсутній в нормальних умовах. Особливістю генів індукцйбельних HSP є відсутність інтронів, які не кодують ділянок гена, що вимагають сплайсингу після транскрипції мРНК. У зв'язку з цим порушення сплайсингу, зокрема, при тепловому шоці блокує процесинг більшості генів, але не генів індукцйбельних HSP. Індукцйбельна HSP 70 при двомірному електрофорезі розташовуються на ділянці з кордонами по молекулярній масі від 62 до 78 кДа, а по рН від 6,5 до 5,5 і представлені п'ятьма ізоформами. Перші три ізоформи є кислими, інші – лужними [1].

Білки сімейства HSP 70 беруть участь у багатьох клітинних процесах, як в нормальних умовах, так і при стресі. Найбільш важливою функцією HSP 70 є участь в синтезі білків і їх подальшому транспорті через внутрішньоклітинні мембрани. HSP 72 і HSP 73 асоціюються і знову синтезуються поліпептидами в тих областях, де може статися небажане гідрофобне злипання пептидних ланцюгів один з одним. Далі, завдяки енергії АТФ вони транспортують білковий ланцюг до мітохондрій, ендоплазматичної мембрани, комплексу Гольджі, де передають білковий ланцюг на інший HSP через мембрану. Далі HSP органели регулюють формування остаточної структури білка [36].

Функції, які HSP виконують в регуляції правильного згортання знову синтезованих білків і в дезагрегації аномальних білкових агрегатів, позначають як шаперон функції, а самі HSP часто називають шаперонами. HSP 70 беруть участь не тільки в синтезі, а й в деградації внутрішньоклітинних білків, так як після дезагрегації не всі білки знаходять нативну структуру. Існує ряд способів утилізації необоротно пошкоджених протеїнів. HSP 73 беруть участь у лізосомальній деградації клітинних «шлаків», забезпечуючи транспорт денатурованого білка до лізосом. HSP 72 сприяють доставці комплексу протеолітичних ферментів до пошкоджених протеїнів, беручи участь в убіквілін-залежному протеолізі [64].

В нормі частина внутрішньоклітинного пулу HSP 70 знаходиться в комплексі з фактором теплового шоку (ФТШ). Стресорне пошкодження клітини призводить до часткової денатурації ряду внутрішньоклітинних білків. Відбувається оголення гідрофобних областей, завдяки яким пошкоджені протеїни злипаються з утворенням нерозчинних агрегатів, з якими зв'язуються HSP 70, вивільняючи з комплексу ФТШ, запобігаючи подальшу денатурацію білків і утворення агрегатів. Далі за участю HSP 40,

білків і АТФ відбувається реактивація денатурованого білка. Відзначено протективну дію HSP навіть за відсутності АТФ-зв'язуючого домену. Цей ефект обумовлений тим, що зв'язування і гідроліз АТФ HSP не впливають на взаємодію з денатурованими протеїнами і запобігання агрегації, а гідроліз АТФ потрібен для дисоціації комплексу «HSP 70 - субстрат». Вільний ФТШ тримеризується, фосфорилується і накопичується в ядрі, де взаємодіє зі специфічною нуклеотидною послідовністю елементів теплового шоку, що веде до активації генів HSP 70 [66].

Обсяг інформації про структуру, функції, механізми синтезу і накопичення HSP в нормі і при стресі привертають увагу фахівців з різних галузей медицини, екології, ветеринарії та фармакології. Застосування HSP в медицині ґрунтується на трьох положеннях. По-перше, гени HSP експресуються в клітинах, що зазнають стрес, і тому зростання кількості цих білків може служити показником відповіді організму на фактори, що ушкоджують. По-друге, HSP 27, HSP 60 і HSP 70 мають захисну функцію, і, викликаючи зростання рівня цих білків, ми можемо захистити клітини від патогенів та токсичних впливів. По-третє, HSP 70 мають високий шаперон активності, і їх можна застосовувати для створення комплексів з іншими білками, наприклад в якості ко-вакцин [36].

Характер можливих трансформацій кількості HSP вивчається дуже інтенсивно, можна знайти роботи з аналізу його концентрації при широкому спектрі захворювань - від септичного шоку до нейротравми. При хронічній ішемічній хворобі серця в міокарді людини накопичуються кислі ізоформи індукцйбельних HSP 70, описано появу індукцйбельних HSP 70 в лімфоцитах периферичній крові у хворих на гострий інфаркт міокарда [10, 21, 40].

Численні експериментальні дослідження показали, що зростання кількості HSP може захистити серце від подальшої ішемії. Захисна роль

HSP 70 була виявлена в дослідженнях як на культурах клітин, так і *in vivo*. Щурячі клітини, які експресують високий рівень людського HSP 70, краще захищені від важкого метаболічного стресу. Подібно до цього культура міогенних клітин, трансфектованих плазмідною з геном HSP 70 (трансфекція -метод перенесення генів в клітку), володіє кращим виживанням до індукованої ішемії. Одне з припущень полягає в тому, що HSP 70 грає основну роль в ренатурації денатурованого, неправильно згорнутого або агрегованого білка, відновлюючи тим самим активність макромолекули [39].

Інша можливість полягає в тому, що HSP 72, як і HSP 73, можуть полегшувати перенесення мітохондріальних ензимів від місця трансляції в мітохондрії. Зросла здатність до «імпорту» заново синтезованих протеїнів в мітохондрії може вносити вклад у відновлення мітохондріальних функцій після ішемічного ушкодження. Підвищення концентрації HSP захищає клітину і від апоптозу. Передбачається, що в основі цього явища може лежати як неспецифічна шаперон функція HSP щодо запобігання денатурації білків, так і безпосередню участь HSP в специфічних сигнальних каскадах програмованої клітинної загибелі [47].

Дослідження з оцінки життєздатності ураженої при інфаркті міокарда з використанням визначення HSP визначили, що система синтезу HSP 72 є складовою частиною багатокомпонентної відповіді у хворих постінфарктним кардіосклерозом з ознаками хронічної серцевої недостатності, який включає як зниження, так і збільшення здатності організму до продукції HSP 72 лімфоцитами периферичної крові і доцільності використання даного показника для додаткової характеристики особливостей перебігу постінфарктного кардіосклерозу, і його прогностичної оцінки. Проводилась оцінка HSP 70 у кардіохірургічних хворих, оперованих з використанням штучного кровообігу, в результаті

отримані дані про доцільність розробки засобів, спрямованих на збільшення вмісту HSP 72 в міокарді, та застосуванні їх в період передопераційної підготовки кардіохірургічних хворих в зв'язку зі значним зниженням ступеня пошкодження міокарда, викликаного несприятливими впливами штучного кровообігу, при більш високому вихідному рівні вмісту HSP 72 [5].

1.2.2. Зв'язок активності гемоксигенази із маркерами біохімічного стресу. Метаболізм гему притаманний усім клітинам ссавців, оскільки молекула гему бере участь у реалізації життєво важливих функцій. Проте накопичення гему в крові та тканинах шкідливе через прооксидантні властивості цієї сполуки і потребує протидії [76, 77].

Одним з головних таких захисних механізмів у ссавців є індукція гемоксигенази – ключового ферменту деградації гему. Сімейство гемоксигеназ представлено трьома ізоформами – двома конститутивними (гемоксигеназа-2 і гемоксигеназа-3) та однією індукцибельною (гемоксигеназа-1). Індукція саме гемоксигеназа-1, що відбувається під впливом різних стресорних факторів, проявляє цитопротекторну дію. За багатьох патологій, які супроводжуються індукцією гемоксигенази, спостерігається і підвищення утворення оксиду азоту в NO-синтазних реакціях [56].

Відомо, що NO має антиоксидантні властивості. З іншого боку, надмірне утворення NO може спричиняти активацію вільнорадикальних процесів. Крім того, дослідження останніх років показали, що NO та його метаболіти здатні регулювати активність гемоксигенази. Але дані щодо впливу пригнічення синтезу NO на систему гем-гемоксигеназа суперечливі [27, 42, 45, 79, 81].

1.2.3. Клінічне значення гемоксигенази. Індуктором синтезу HSP 70 в міокарді і судинах при ГБ є фактор механічного стресу, пов'язаний з циклічним розтягуванням стінок серця і судин, а також з напругою зсуву на ендотелії, викликаним рухомих потоком крові. Зростання рівня індукцибельної форми HSP 70 в сироватці крові є маркером патологічної гіпертрофії лівого шлуночка при ГБ і може бути відображенням ураження органів-мішеней. HSP 70 входять до складу глюкокортикоїдного і прогестеронового рецепторів, тим самим, беручи участь в стабілізації останніх [65].

Великий інтерес представляє визначення можливого взаємозв'язку синтезу білків теплового шоку і початком, прогресуванням і перебіг хвороби Альцгеймера. При хвороби Альцгеймера стрес-білки надають, насамперед, нейропротекторний вплив [65].

Відомі такі механізми їх захисного ефекту [65]. Це:

- 1) обмеження апоптозу;
- 2) обмеження гіперпродукції NO;
- 3) дезагрегації позаклітинних – амілоїдних агрегатів;
- 4) посилення виведення р-амілоїду з міжклітинної простору;
- 5) обмеження гіперфосфорілювання тау-білка;
- 6) захист нейронів від токсичних ефектів глутамату;
- 7) обмеження внутрішньоклітинної цитотоксичності – амілоїда.

Стрес-білки HSP 70 представляють собою важливу ендогенну систему захисту нейронів при хвороби Альцгеймера, яка реалізує свою захисну дію на декількох рівнях молекулярного механізму цього захворювання [22].

Важливим і перспективним є питання використання HSP в онкології на сучасному етапі розвитку. З точки зору створення протипухлинних вакцин, цінною є властивість HSP зв'язуватися з пептидами пухлинної

клітини і фактично нести антигенний репертуар тієї клітини, із якої вони отримані. На експериментальних моделях встановлено, що імунізація HSP 70, HSP 90, виділеними з пухлинних клітин, викликає утворення специфічних цитолітичних Т-лімфоцитів. Цього не спостерігалося при введенні аналогічних білків, отриманих з інших тканин. Інший білок цього сімейства: HSP 110 - також може використовуватися в імунотерапії раку. Попередні дані клінічних випробувань показали підвищення числа опухолеспецифічних цитолітичних (CE⁸⁺) Т-лімфоцитів у більшості хворих на меланому (IV стадія), імунізованих білком OP96, отриманим з аутологічних пухлинних клітин, що корелювало з клінічним ефектом. HSP і антитіла до них можуть використовуватися як ранні біомаркери при початкових стадіях канцерогенезу; в якості прогностичного критерію перебігу певного виду захворювання: так, експресія HSP 27 пов'язана з несприятливим прогнозом раку шлунка, простати і печінки, остеогенними саркомами; а експресія HSP 70 є несприятливим фактором в плані прогнозу при раку сечового міхура, молочної залози і матки. Особливості синтезу і функції HSP, можливі шляхи терапії активно обговорюються в сфері гематології. Повна ремісія пухлинного процесу у пацієнтів з гострою лейкемією має чітку зворотний зв'язок з рівнем експресії HSP [73].

Незважаючи на численні дослідження, роль білків теплового шоку в етіології і патогенезі ревматоїдного артриту як і раніше залишається невідомою. Дані, отримані при експериментальному моделюванні ревматоїдного артриту (РА) у тварин, дозволяють припустити провідну роль білків теплового шоку сімейства 60 кДа як тригера в розвитку аутоімунних процесів при ревматоїдному артриті. При ревматоїдному артриті в лімфоцитах синтез індукцибельних і конститутивних (65, 70, 95, 120 кДа) HSP *in vitro* пригнічується, ступінь пригнічення залежить від тяжкості та тривалості захворювання [51].

У всіх хворих на активний ХГН з виявленою сечовий екскрецією БТШ-70 виявили його експресію в тканини нирки. При імунногістохімічному дослідженні БТШ-70 виявлявся в клубочках (де він експресується, головним чином, в подоциті, в меншій мірі - в парієтальних клітинах капсули Шумлянського-Боумена), а також в тубулоінтерстіція (епітеліальних клітинах каналців, строми, клітинах лімфогістіоцитарного інфільтрату, міофібробласти) [13].

Локалізація та інтенсивність експресії БТШ-70 в тканини нирки не залежали від морфологічного варіанту нефриту і визначалися клінічними проявами активності і вираженості запальних змін в тканини нирки [13].

1.3.4. Роль гемоксигенази у функціонуванні серцево-судинної системи. Посилення експресії антиоксидантних ферментів і міокардіальних стресових білків, властивостями яких володіє гемоксигеназа-1, захищає міокард від постішемичних пошкоджень. На жаль, механізми, що лежать в основі кардіопротекторних ефектів посилення експресії та активності білків теплового шоку в умовах ішемії, остаточно не вивчені [18].

Кукоба Т. В. та співавтори показали, що специфічне посилення експресії гемоксигенази-1 в міокарді трансгенних мишей призводить до поліпшення відновлення функцій серця в реперфузійний період дозозалежно від рівня експресії гемоксигенази-1. Автори також встановили, що гемоксигеназа-1 не тільки захищає кардіоміоцити від постішемичних ушкоджень у відсутності протизапальних клітин (оскільки експерименти проводилися на ізольованому серці), але і протидіє реперфузійному пошкоджені і запалені при проведенні експериментів на серці *in vivo* [19].

Однак, в той же час, літературні дані свідчать про те, що лише помірна індукція гемоксигенази-1 є позитивною, а надмірна експресія (більш ніж в 10 - 15 разів) може навпаки навіть посилювати пошкодження [18, 19].

Відомо, що активація гемоксигенази є одним з основних шляхів утворення в організмі монооксиду вуглецю, здатного регулювати тонус судин і є нейротрансміттером. [18].

Ефекти CO опосередковані активацією розчинної гуанілатциклази за допомогою зв'язування CO з гемової складової даного ферменту і подальшим утворенням цГМФ, стимуляцією різних типів калієвих каналів і пригніченням цитохром Р 450-залежної монооксигеназної системи в клітинах гладеньких м'язів судин [18].

Однак ефекти CO в 50 - 100 разів менше виражені, ніж подібні у NO, також модулює розслаблення в клітинах гладеньких м'язів судин. Сучасні дослідження показали, що система NO не може функціонувати без присутності монооксиду вуглецю [18].

Утворений в реакції монооксид вуглецю має протизапальний ефект і знижує активність і агрегацію тромбоцитів завдяки утворенню цГМФ. Цей ефект є важливим для серцево-судинної системи властивістю [18].

Регуляція гемоксигенази в серцево-судинній системі. Відомо, що гостра гіпоксія стимулює збільшення вмісту м-РНК гемоксигенази-1, а також підвищує вміст самого білка в тканинах тварин і в культурі клітин. При цьому показано, що в клітинах гладеньких м'язів судин при гіпоксії індукція гемоксигенази-1 здійснюється на рівні генної транскрипції за допомогою білкового фактора, індукованого гіпоксією - HIF-1, який також регулює транскрипцію еритропоетину і ендотеліального фактора росту судин [18].

Однак деякі дослідники вважають, що індукція гемоксигенази-1 в умовах гіпоксії здійснюється за участю цитокінів та фактора Nf-kB через NIF-1 незалежні шляхи [18].

Встановлено, що максимальний вміст м-РНК гемоксигенази-1 в клітинах гладеньких м'язів судин спостерігався через 12 годин після гіпоксії. Індукція гемоксигенази-1 у відповідь на розвиток гіпоксичного стресу була показана і для ендотеліальних клітин судин. Вважають, що індукція гемоксигенази-1 в серці щурів при гострому гіпоксичному стресі може здійснюватися через активацію індукційної форми NO-синтази [15].

Відомо, що при придушенні синтезу NO функцію судинноослаблюючого фактору виконує монооксид вуглецю, головним джерелом якого в клітинах ссавців є гемоксигеназна реакція [18].

У зв'язку з цим, літературні дані свідчать про підвищення гемоксигенази-активності в умовах зниження утворення NO, що може бути компенсаторним механізмом для підтримки нормального тону судин. Активність гемоксигенази в судинній стінці може зростати за рахунок індукції гемоксигенази-1 вільним гемом [59].

Відзначено зростання активності гемоксигенази-1 при ішемії міокарда, захворюваннях серцево-судинної системи, гіпоксичних ушкодженнях - однак, як уже говорилося вище, ряд авторів вважає, що не можна вважати це підвищення однозначно позитивним явищем [18].

Цікавим є той факт, що в ряді досліджених тканин експресія м-РНК гемоксигенази-1 посилюється після короткої глобальної ішемії, в той час як рівень експресії гемоксигенази-2 не змінюється навіть після тривалої ішемії [18].

1.4. Характеристика білків теплового шоку

Підтримка повного набору функціонально компетентних білків в кожній клітині в нормальному стані і під час стресу і пошкодження забезпечується різними механізмами, в тому числі системою білків, названих молекулярними шаперонами. Шаперони, кодується генами, які активуються стрес факторами, позначають як стрес-білки. Якщо стресовим фактором є тепловий шок, то такі білки називають білками теплового шоку. З історичних причин термін «білки теплового шоку» використовується і в тому випадку, якщо експресія батьківського гена індукується не тільки власне тепловим шоком, але і іншими факторами [10].

Білки теплового шоку є висококонсервативними білками і виявляються у всіх організмах від бактерій до людини. Вони виконують протекторну роль - контролюють утворення і обмін інших внутрішньоклітинних білків і беруть участь в підтримці цілісності клітини, функціонуючи як молекулярні шаперони (полегшують утворення вторинної і третинної структури інших білків, а також беруть участь в процесах репарації або елімінації токсичних для клітини неправильно згорнутих або денатурованих білків) [24, 25, 50].

1.4.1. Структурно – функціональна характеристика білків теплового шоку. Як цитопротекторні властивості стрес-білків, так і їх роль в процесах нормальної життєдіяльності клітини багато в чому визначаються тим, що ці білки є шаперонами. Термін «шаперон» (від французького *chaperon* - компаньйонка) вперше застосував R. A. Laskey в 1978р. до білка, який запобігає небажані йонні взаємодії між гістонами і молекулою ДНК [6].

Шаперони - це білки, які полегшують фолдінг, рефолдінг, складання та розбирання інших білків і макромолекулярних комплексів. До шаперонів відносяться білки теплового шоку 70 (рис. 1.4), білки теплового шоку 90, білки теплового шоку 60, білки теплового шоку 27. Шаперони знаходяться майже в усіх органелах і цитоплазмі. Білки теплового шоку зв'язуються зі зростаючим поліпептидом, як тільки він відділяється від рибосоми. Це утримує зростаючу молекулу в конформації, що запобігає випадковому передчасному укладанню і сприяє переносу поліпептиду в мітохондріальний простір. Транспорт білків в мітохондрії і вивільнення упакованого білка вимагає енергії АТФ [6].

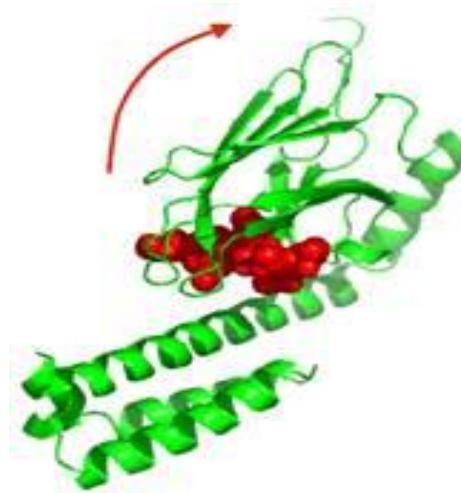


Рис. 1.4. Будова білка теплового шоку 70

У структурі білків-шаперонів закладена здатність здійснювати циклічне АТФ чи АДФ-залежне зв'язування з іншими білками. Білки теплового шоку 60 і білки теплового шоку 70 беруть участь у згортанні, перенесення і формуванні більш високою структурної організації білка. У внутрішньому мітохондріальному просторі ці шаперони зв'язуються з розгорнутим білком і допомагають формуванню точної конформаційної організації. Цей етап енергозалежний [6].

У компетенції білки теплового шоку – шаперони знаходяться тимчасове зв'язування і полегшення скручування незрілих пептидів в процесі трансляції, полегшення транспорту білків уздовж мембран органел, розробка олігомерних білкових комплексів, контроль біологічної активності регуляторних білків (в тому числі транскрипційних факторів), запобігання агрегації частково денатурованих білків внаслідок міжмолекулярних взаємодій, розкриття клатрінових везикул, полегшення деградації токсичних метаболітів білків шляхом полегшення транспорту денатурованих білків до протеосом та лізосом [6].

Шаперони рідко працюють поодиноці, частіше в «бригадах», що складаються з різних молекул, що включають шаперони і кошаперони. Саме шаперон-кошаперонні комплекси допомагають новосформованому поліпептидному ланцюжку проходити фолдінг, відновлюючи пошкоджені білки (рефолдинг) або направляють їх в протеїназні комплекси при неможливості відновлення. Різні функціональні домени молекули шаперона розпізнають поліпептид з порушеною структурою, взаємодіють з іншими членами команди для формування шаперон комплексів і великої мережі з іншими подібними комплексами [10].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Досліджувальні групи лабораторних тварин

Дослідження гемоксигеназної активності печінки, селезінки і нирок молодих та старих мишей проводилось на базі лабораторії кафедри біології людини та імунології при 23,1 °С. Початок роботи о 10 годині та закінчення о 20 годині вечора.

Дослідження проводилось на білих лабораторних мишах лінії BALB (самка і самець), вага самки – 21,5 г; маса самця – 31,1 г. Тварини знаходилися на стандартному повноцінному харчуванні у звичайних умовах віварію. Хворих тварин в дослід не брали.

Усі маніпуляції із тваринами проводились у відповідності із положеннями Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України №66 від 13.02.2006 р. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006, № 3447-IV [32, 33].

Для дослідження було взято дві тварини, а саме самку, віком 1,5 роки та самець віком 4 місяці. Визначення проводили згідно з методикою взятою зі статті Raimo Tenhunen «The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase» [72].

2.2. Методика визначення активності гемоксигенази

Для подальшого визначення гемоксигеназної активності досліджуваним тваринам проводили розтин з наступною екстерпацією органів (печінки, селезінки та нирок). Визначення проводили в декілька етапів:

1. Гомогенізація з фосфатним буфером з рН 7,4;
2. Центрифугування протягом 1 години на 3000 об/хв;
3. Приготування реакційної суміші $V = 6$ мл та контролю $V = 6$ мл (надосадова рідина, NADPH, гем та $MgCl_2$, фосфатний буфер);

Таблиця 2.1

Склад реакційної суміші

Склад	мл/1л	Вміст в моль
Надосадова рідина	2,5 мл	94 ммоль
NADPH	0,37 мг	1,4 ммоль
Гем	0,1 мг	170 мкмоль
$MgCl_2$	0,18 мг	6,6 ммоль
Фосфатний буфер	3 мл	113 ммоль

Таблиця 2.2

Контрольна суміш

Склад	мл/1л	Вміст в моль
NADPH	0,37 мг	1,4 ммоль
Гем	0,1 мг	170 мкмоль
$MgCl_2$	0,18 мг	6,6 ммоль
Фосфатний буфер	5,5 мл	207 ммоль

4. Експозиці в термостаті при температурі 36,8 °С протягом 30 хвилин;
5. Інкубація при низькій температурі +4 °С ;
6. Визначення загального білірубіну фотометричним методом;
7. Проведення розрахунків та побудова калібрувального графіку;
8. Визначення загального білку біуретовим методом та проведення розрахунків.

Отримані дані обробляли за допомогою методів варіаційної непараметричної статистики.

Під час маніпуляцій з тваринами дотримувалися Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 року) [32, 33]

Гомогенізацію проводили з фосфатним буфером з рН 7,4 і доводили об'єм загальної проби до 6 мл, згідно з методикою взятою у біохімічному довіднику під редакцією С.Е. Северина [31]. Перемішування дисперсних систем з рідким дисперсійним середовищем у ступці з швидко обертовим вінчиком та переносили суміш в пробірку (рис. 1 та рис. 2).



Рис. 2.1. Приготування гомогенату



Рис. 2.2. Кількість осаду в гомогенаті

В якості дисперсного середовища використовували фосфатний буфер з рН 7,4, а дисперсна система – печінку, селезінку та нирки самки і самця з масами:

$$m_{\text{печінки}} (\text{самки}) = 1,1 \text{ г}$$

$$m_{\text{селезінки}} (\text{самки}) = 0,15 \text{ г}$$

$$m_{\text{нирок}} (\text{самки}) = 0,34 \text{ г}$$

$$m_{\text{печінки}} (\text{самця}) = 1,84 \text{ г}$$

$$m_{\text{селезінки}} (\text{самця}) = 0,28 \text{ г}$$

$$m_{\text{нирок}} (\text{самця}) = 0,65 \text{ г}$$

Другим етапом було центрифугування протягом 1 години на 3000 об/хв. Після розділення на осад та надосадову рідину з пробірок відібрали надосадову рідину та приготували реакційну суміш та контрольний розчин (рис. 3).

Реакційна суміш складалася з надосадова рідина - 2,5 мл; NADPH – 0,37 мг; гем – 0,1 мг; MgCl_2 – 0,18 мг; фосфатний буфер – 3 мл.

Контрольний розчин складався з NADPH – 0,37 мг; гем – 0,1 мг; MgCl_2 – 0,18 мг; фосфатний буфер – 5,5 мл.



Рис. 2.3. Приготування реакційної суміші

Наступним етапом дослідження була експозиція в термостаті при температурі 36,8 °С протягом 30 хвилин для швидшого утворення білірубину. Далі суміш поставили в холодильник для призупинення циклу утворення білірубину при низькій температурі + 4 °С.

2.2.1. Визначення кількості утвореного білірубину. Наступним етапом було визначення загального білірубину у реакційній суміші. Визначення проводили за допомогою набору «Набір реактивів для визначення у сироватці крові концентрації загального білірубину» марка «Felicity» на фотоелектрокалориметрі ULAB 102UV (додаток Б).

Набір використовується для визначення концентрації білірубину загального у науково – дослідницькій практиці. Діапазон визначених концентрацій – від 2 мг/л до 200 мг/л. Варіаційний коефіцієнт – не більше 5%. Набір застосовується *in vitro*.

Принцип методу: діазотована сульфанілова кислота в присутності кофеїнового реактиву утворює з непрямим та зв'язаним білірубіном азобілірубін рожево – фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення розчину прямопропорційна концентрації загального білірубину у пробі.

Приготування робочих розчинів:

1. Робочий кофеїновий реактив. Вміст флакону з кофеїновим реактивом (концентратом) кількісно перенесли до мірної колби місткістю 10 мл та, після розчинення осаду, доводили дистильованою водою до мітки.
2. Діазосуміш. Безпосередньо перед роботою змішували необхідну кількість розчину сульфанілової кислоти та розчин нітрату натрію в співвідношенні 100:3.

Проведення аналізу: аналіз проводили у відповідності зі схемою, наведеною у таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Склад інкубаційної суміші для кількісного визначення загального білірубіну

Речовина	Дослідна проба, мл	Холоста проба, Мл
Реакційна суміш	0,50	0,50
Кофеїновий реактив	1,75	1,75
Фізіологічний розчин	-	0,25
Діазосуміш	0,25	-

Для визначення загального білірубіну пробу для розвинення забарвлення (рис.4) витримують 20 хвилин (при температурі 23,1 °С), після чого фотометрували.

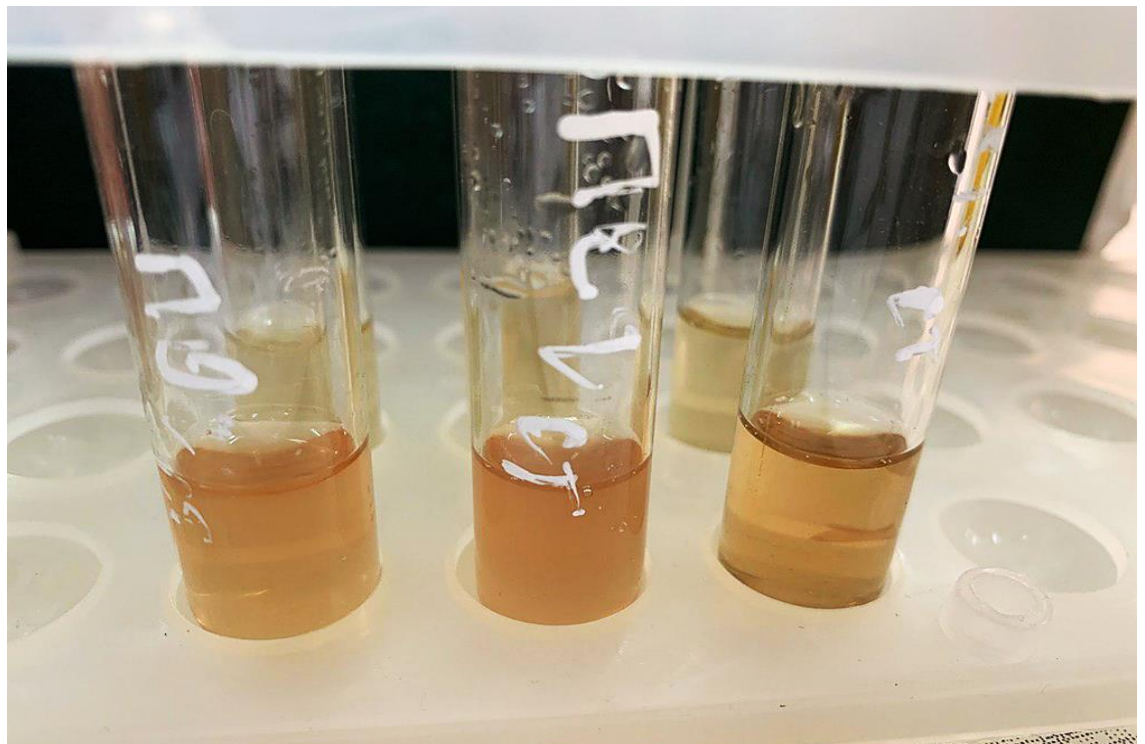


Рис. 2.4. Забарвлення проби при визначенні загального білірубіну

При подальшій експозиції забарвлення не змінювалося. Вимірювання оптичної щільності дослідних проб проводили у спектрофотометрі ULAB 102UV (рис.5) проти холостої проби при довжині хвилі 550 нм в кюветах 5 мм. Вимірювання кожної проби проводили в 2 повторюваностях. Для розрахунків брали середнє арифметичне значення показників.



Рис. 2.5. Спектрофотометр ULAB 102UV

Данні наведені в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4

Показники оптичної щільності

Матеріал	Проба 1	Проба 2	Контроль
Нирки (самець)	0,077	0,077	0,007
Селезінка (самець)	0,048	0,047	
Печінка (самець)	0,002	0,002	
Нирки (самка)	0,067	0,068	
Селезінка (самка)	0,040	0,040	
Печінка (самка)	0,001	0,001	

Результати дослідження порівнюють з калібрувальним графіком (рис.2.6.) та по ньому знаходять результати.

Калібрувальний графік на білірубін складений на основі наступних даних, які були отримані з фотометричного аналізу калібрувальних розчинів з набору «Білірубін калібратор». При світлофільтрі 540 нм, кювета 5 мм, проти холостої проби (вода).

1. 0,040 – 17,4 мкмоль/л;
2. 0,100 – 43,6 мкмоль/л;
3. 0,200 – 87,2 мкмоль/л;
4. 0,300 – 130,8 мкмоль/л.

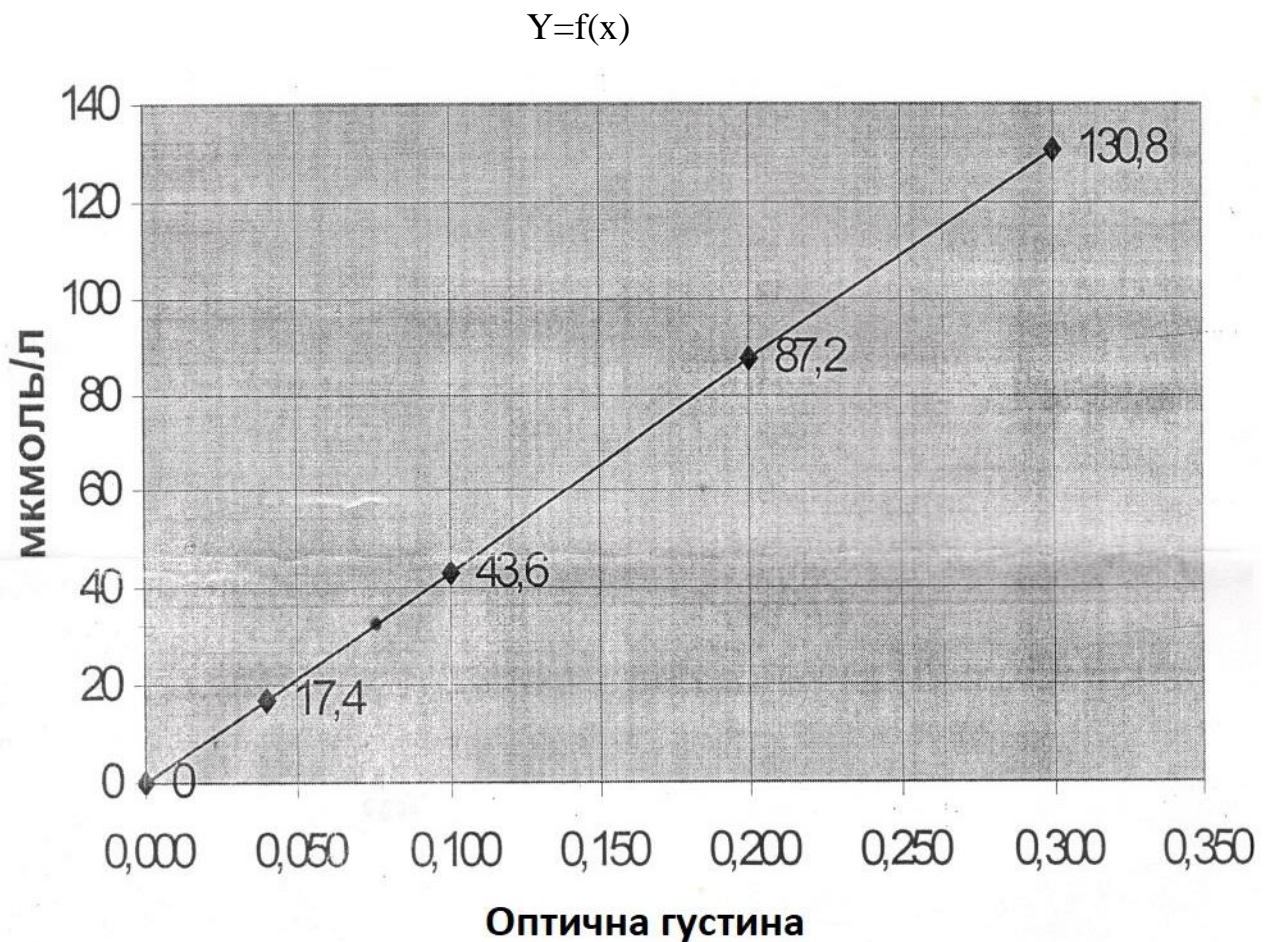


Рис. 2.6. Калібрувальний графік по загальному білірубіну

Примітка: x – вміст неорганічного фосфору в пробі, y – оптична щільність.

Результати наведені в таблиці 2.5.

Таблиця 2.5

Показники дослідження

Матеріал	Оптична щільність	Вміст білірубіну, мкмоль/л
Нирки (самець)	0,077	33
Селезінка (самець)	0,048	20
Печінка (самець)	0,002	2
Нирки (самка)	0,067	30
Селезінка (самка)	0,040	17
Печінка (самка)	0,001	1

2.3. Підрахунок кількості загального білку

Крайнім етапом дослідження було визначення загального білку біуретовим методом у зразках. Визначення проводили за допомогою набору «Набір реактивів для визначення у сироватці крові загального білка» марка «Felicit» на спектрофотометрі ULAB 102UV . (додаток Б)

Набір призначений для визначення концентрації загального білка у науково – дослідницькій практиці. Діапазон визначених концентрацій – від 5 г/л до 100 г/л. Варіаційний коефіцієнт – не більше 5%. Набір застосовують *in vitro*.

Принцип методу: з сірчаноокислою міддю білки реагують в лужному середовищі з утворенням сполук фіолетового забарвлення (біуретова реакція). Інтенсивність забарвлення реакційного розчину прямопропорційна концентрації білків у дослідному розчині.

Приготування робочих розчинів:

1. Біуретовий реактив. Вміст флакону з концентрованим розчином Біуретового реагенту переносили у мірну колбу місткістю 500 мл та доводили дистильованою водою до мітки. Потім переносили у поліетиленову ємність, що герметично закривається. Розчин стійкий протягом 12 тижнів при температурі від $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ і збережині у темному місці (рис. 2.7).



Рис. 2.7. Приготування розчинів для визначення загального білку

Проведення аналізу:

Аналіз проводили згідно зі схемою, наведеною в таблиці 2.6:

Таблиця 2.6

Склад інкубаційної суміші для кількісного визначення загального білку

Відміряти у пробірку, мл	Дослідна проба	Холоста проба
Дослідний розчин	0,08	-
Фізіологічний розчин	-	0,08
Біуретовий реактив	4,00	4,00

Проби змішали та витримували протягом 30 хвилин при температурі +23,1°C. Вимірювали оптичну щільність дослідних проб здійснювалось проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм та кюветі 5 мм. Визначення проводилось по два рази кожної проби та розраховували середньо арифметичне значення для дослідних проб (рис. 2.8 та рис. 2.9).

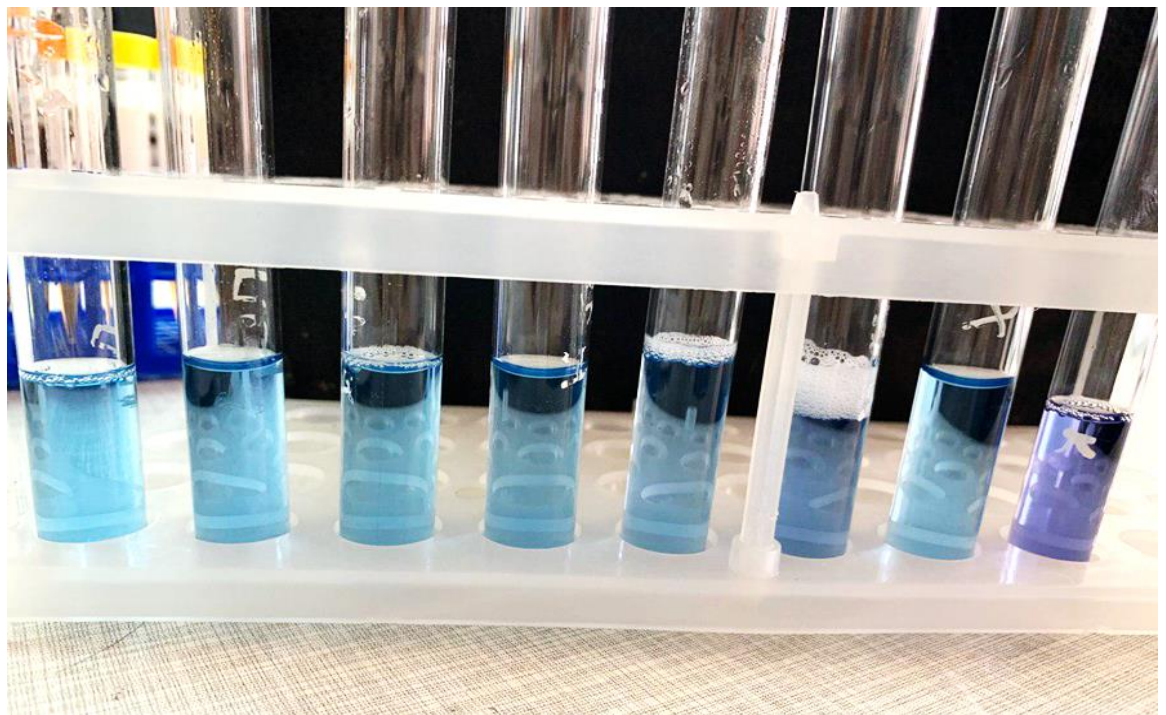


Рис. 2.8. Визначення загального білку



Рис. 2.9. Підготовка дослідних проб до фотометричного визначення загального білку

Отримані результати дослідження наведені в таблиці 2.7:

Таблиця 2.7

Показники дослідження

Матеріал	Оптична щільність	Вміст загального білка, г/л
Нирки (самець)	0,01	3,33
Селезінка (самець)	0,07	23,33
Печінка (самець)	0,08	26,66
Нирки (самка)	0,05	16,66
Селезінка (самка)	0,06	20,00
Печінка (самка)	0,02	6,66
Калібрувальна	0,15	

Розрахунок концентрації загального білку проводили за формулою (2.1):

$$c = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \cdot 50, \text{ де} \quad (2.1)$$

50 – концентрація загального білку в калібрувальному розчині;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

C – концентрація загального білку в дослідній пробі, г/л.

Таким чином, отримані результати дослідження підтверджують існування залежності активності ферменту гемоксигенази від вікових змін.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Показники активності гемоксигенази молодих та старих дослідних мишей

Гемоксигеназа-1 індукується під впливом різноманітних стресових факторів, зокрема її рівень підвищується в умовах настання гіпоксії або гіпероксії, під впливом важких металів, прозапальних цитокінів. Разом з тим, гемоксигеназа – 1 продукується в значній кількості внаслідок затримки росту організму, анемії або надмірної кількості заліза в тканинах. Тварини, в яких є дефіцит гемоксигенази, характеризуються аномаліями розвитку, незначною тривалістю життя. На клітинному рівні гемоксигеназа пригнічує апаптоз, здійснюючи захисну роль.

3.1.1. Активність гемоксигенази в тканині печінки. У молодій тварини активність гемоксигенази в тканині печінки була вищою на 50% ніж у старій тварини. Це свідчить про зниження активності гемоксигенази на 50% у старій миші. Активність гемоксигенази характеризується за вмістом загального білірубіну в тканинах печінки.

Печінка відіграє важливу роль у детоксикаційних процесах. Як відомо, печінка виконує бар'єрну функцію, що полягає у знешкодженні токсичних сполук, які надходять з їжею або утворюються в кишечнику за рахунок діяльності його мікрофлори. У печінці інактивуються і лікувальні речовини, які доставляються в печінку з кров'ю. Хімічні речовини знешкоджуються під час ферментативного окиснення, відновлення, метилування, ацетилювання.

Деякі речовини знешкоджуються в одну фазу, а деякі без змін виводяться з жовчю і сечею. Печінка бере участь в інактивації багатьох гормонів (глюкокортикоїди, альдостерон, андрогени, естрогени, інсулін, глюкагон). Печінка відіграє роль у процесі зсіданні крові.

Активація експресії гену гемоксигенази-1, що присутня у печінці, вважається маркером оксидативного стресу, у тому числі спричиненого вільним гемом та йонами важких металів.

У нашому дослідженні ми визначили активність гемоксигенази у печінці молодій та старій тварини і виявили, що на 50% активність зменшена у старій миші у порівнянні з молодією твариною. Це є несприятливим адаптаційним фактором. Можливо це пов'язано із віковими захворюваннями тварин, а саме вірусні гепатити, цироз печінки, пухлини, гостра печінкова недостатність, жировий гепатоз.

3.1.2. Рівень гемоксигенази в селезінці. У молодій тварини активність гемоксигенази в тканині селезінки була вищою на 15%, ніж у старій тварини. Це свідчить про зниження активності гемоксигенази у старій миші. Активність гемоксигенази характеризується за вмістом загального білірубіну в тканинах селезінки.

Селезінка відіграє важливу роль у кровотворенні та захисних реакціях організму. У селезінці дозрівають лімфоцити. Селезінка виконує важливу функцію фільтра, який видаляє сфероцити та інші змінені еритроцити. Вона також містить велику кількість тромбоцитів і відіграє важливу роль в імунній системі.

У нашому дослідженні ми визначили активність гемоксигенази у селезінці молодій та старій тварини і виявили, що на 15% активність зменшена у старій миші у порівнянні з молодією твариною. Це є несприятливим адаптаційним фактором. Можливо це пов'язано із віковими

захворюваннями тварин, а саме з інфекційними чи вірусними захворюваннями селезінки, лімфопроліферативні захворювання, доброякісні та злоякісні пухлини селезінки, гемофагоцитарний лімфохіміозитоз.

3.1.3. Вміст гемоксигенази в нирках. У молодій тварини активність гемоксигенази в тканині нирок була вищою на 90% ніж у старій тварини. Це свідчить про зниження активності гемоксигенази на 10% у старій миші. Активність гемоксигенази характеризується за вмістом загального білірубину в тканинах нирок.

Нирки - головний парний орган видільної системи людини. Функції нирок: 1) виведення чужорідних речовин і нелетких продуктів обміну; 2) регуляція сталості концентрації натрію (натрійуретична функція); 3) регуляція обсягу позаклітинної води тіла (гідроуретична функція); 4) регуляція сталості концентрації йонів у крові; 5) регуляція кислотно-лужної рівноваги організму; 6) регуляція еритропоезу (за допомогою секреції еритропоетину та інгібіторів еритропоезу); 7) участь у фібринолізі крові (секреція урокінази, що активує фібриноліз).

У нашому дослідженні ми визначили активність гемоксигенази у нирках молодій та старій тварини і виявили, що на 10% активність зменшена у старій миші у порівнянні з молодією твариною. Це є несприятливим адаптаційним фактором. Можливо це пов'язано із віковими захворюваннями тварин, а саме з гломерулонефритом, пієлонефритом, нефропатіями

3.2. Залежність активності білка теплового шоку від віку дослідних тварин

В нашому дослідженні ми довели, що у тварин похилого віку активність гемоксигенази зменшується у всіх органах. У печінці відмінність сягає 50%, у селезінці – 15%, а у нирках - 10%. Найбільший відсоток відмінностей у печінці. Це, можливо пов'язано з тим, що печінка виконує більше функцій, більш активний метаболізм і виявляється що вона першою страждає від вікових змін.

Таким чином, проведені дослідження вказують на те, що активність гемоксигеназної системи залежить від віку організму, стану адаптаційних та дезадаптаційних процесів. Кількісна залежність активності гемоксигенази може бути використана для прогностичних досліджень стану організму, його вікових змін.

ВИСНОВКИ

1. Гемоксигеназа була виявлена у всіх клітинах і організмах, її експресія є загальною універсальною реакцією на несприятливі фактори зовнішнього середовища. Гіпоксія, ішемія, магнітне поле, радіоактивне випромінювання, окислювальний стрес, інфекції, віруси; гемодинамічний стрес; канцерогени, важкі метали (Cd^{2+} ; Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; Pb^{2+}) спричиняють індукцію синтезу гемоксигенази в клітинах. Разом з тим, диференціювання, проліферація та апоптоз клітин також супроводжується посиленням продукції гемоксигенази. Це є свідченням унікальності цього мікросомального ферменту, який ще називають білком теплового шоку або HSP-32.
2. Після визначення активності гемоксигенази у печінці молодій та старій тварини було виявлено, що у тканинах старої миші, у порівнянні з молодістю, на 50% активність була меншою. Це можна пов'язати з тим, що у старшій тварині (самиці) розвиваються вікові захворювання печінки.
3. З'ясували, що активність гемоксигенази у селезінці та нирках старої тварини на 15% та 10% відповідно, менша ніж активність у молодій тварини, що також пов'язується з віковими захворюваннями тварин.
4. Було доведено, що у тварин похилого віку активність гемоксигенази зменшується у всіх органах. Найбільший відсоток зменшення спостерігався у печінці. Це, можливо пов'язано з тим, що печінка виконує більше функцій, в ній більш активний метаболізм і виявляється що вона першою страждає від вікових змін. Таким чином, проведені дослідження вказують на те, що активність гемоксигеназної системи залежить від віку організму, стану

адаптаційних та дезадаптаційних процесів. Кількісна залежність активності гемоксигенази може бути використана для прогностичних досліджень стану організму, його вікових змін.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Афанасьев С. А. Биохимия / С. А. Афанасьев, 1996. – Т. 61. – Вып. 10. – с. 1779-1784.
2. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1991. – Т. 29. – с. 1-249.
3. Гонський Я. І. Біологічна хімія: лабораторний практикум. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 287 с.
4. Гуляева Л. Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе / Л. Ф. Гуляева, В. А. Вавилин, В. В. Ляхович. – Новосибирск, 2000. – 84 с.
5. Демидов О. Н. Система белков теплового шока 70 кДа у кардиохирургических больных: дис. канд. мед. наук: СПб / О. Н. Демидов, 1999. – 21 с.
6. Драпкина О. М. Роль шаперонов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и кардиопротекции. / О. М. Драпкина, Я. И. Ашихмян, В. Т. Ивашкин // Российские медицинские вести, 2008. – №1. – С. 56-70.
7. Егорова М. О. Биохимическое исследование в клинической практике. – Москва, 2008. – 144 с.
8. Задорожная О. О. Стресс-белки при инфаркте миокарда: дис. канд. мед. наук. / О. О. Задорожная – Москва, 1999. – 145 с.
9. Зенков Н. К. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова – М.: Наука // Интерпериодика, 2001. – 343 с.

- 10.Ивашкин В. Т. Клиническое значение содержания белков теплового шока в лимфоцитах периферической крови больных инфарктом миокарда / В. Т. Ивашкин, О. О. Задорожная // Клиническая медицина, 2001. – Т. 79. – № 2. – С. 33 - 37.
- 11.Ивашкин В. Т., Драпкина О. М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. – 2-е изд. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2011. – 376 с.
- 12.Идельсон Л. И. Гипохромные анемии / Л. И. Идельсон // М. : Медицина, 1981. – 192 с.
- 13.Исламов Б. И. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины / Б. И. Исламов, 1999. – Т. 128. – №1. – С. 525-528.
- 14.Калиман П. А. Биохимия / П. А. Калиман, В. И. Падалко.// Укр. біохім. Журнал, 1981. – Т. 46. – С. 1482-1486.
- 15.Каліман П. А. Індукція гем-оксигенази в серці та судинах і пероксидна резистентність еритроцитів щурів за умов розвитку гемолітичної анемії / П. А. Каліман, О. В. Павиченко // Фізіол. Журнал, 2005. – Т. 51. –№ 5. – С. 31 - 35.
- 16.Каліман П. А. Метаболізм гема та оксидативний стрес / П. А. Каліман, Т. В. Баранник // Укр. біохім. журнал, 2001. – Т. 73. – С. 5 - 15.
- 17.Карпищенко А. Клиническая лабораторная диагностика / А. Карпищенко, 2000. – №3. – С. 10.
- 18.Кукоба Т. В. Гемоксигеназа та монооксид вуглецю: захист чи пошкодження клітин? / Т. В. Кукоба, О. О. Мойбенко // Фізіол. Журнал, 2002. – Т. 48. – № 5. – С. 79 - 92.
- 19.Кукоба Т. В. Кардіопротективна дія індукції гемоксигеназы-1 за допомогою геміну при ішемії-реперфузії ізольованого серця щура / Т. В. Кукоба, О. О. Мойбенко, А. В. Коцюруба // Фізіол. Журнал, 2003. – Т. 49. – № 6. – С. 14-21.

20. Лиу М. Индукция гемоксигеназы - 1 улучшает защиту трансплантата печени при хранении на холоде / М. Лиу, Б. Вэнг, К. Жао // Биохимия, 2007. – Т. 72. – вып. 5. – С. 674-681.
21. Малышев И. Ю. Белки теплового шока и защита сердца / И. Ю. Малышев, Е. В. Малышева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1998. – Т. 126, №12. – С. 604-611.
22. Малышев И. Ю. Стресс, адаптация и оксид азота / И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // Биохимия, 1998. — Т. 63. Вып. №7. — С. 992-1006.
23. Малышева Е. В. Роль белков теплового шока в формировании стресс-устойчивости у разных генетических линий животных / Е. В. Малышева, А. В. Замотринский, И. Ю. Малышев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1994. – №7. – С. 11-13.
24. Маргулис Б. А. Защитная функция белков теплового шока семейства 70 кД: Диссертация на соискание ученой степени д.б.н. – СПб., 2001. – 32 с.
25. Маргулис Б. А. Белки стресса в эукариотической клетке / Б. А. Маргулис, И. В. Гужова // Цитология, 2000. – № 42 (4) – С. 323-341.
26. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл. – М.: БИНОМ, 1999. – 368 с.
27. Менщикова Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Менщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
28. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке / Д. Мецлер. – М.: Мир, 1980. – 608 с.
29. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1983. – 304 с.

30. Практикум з біологічної хімії / Гарбарець Б. О., Висоцький І. Ю., Качанова А. А. – Суми, 1997. – 415 с.
31. Практикум по биохимии: Учеб. пособие/ Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
32. Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і Типового положення про комісії з питань етики: Наказ Міністерства охорони здоров'я від 23 вересня 2009 року : [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/main/z1010-09>
33. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України від 21 лютого 2006 року: [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15/stru>.
34. Тюкавкина Н. А. Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. Н. Бауков – М.: Медицина, 1991. – 528 с.
35. Хмелевский Ю. В. Основные биохимические константы человека в норме и при патологии / Ю. В. Хмелевский, С. К. Усатенко – К.: Здоров'я, 1987. – 160 с.
36. Beckmann R. P. Science / R. P. Beckmann. – 1990. – Vol. 248. – P. 850.
37. Bianchetti C. M. Comparison of apo- and heme-bound crystal structures of a truncated human heme oxygenase-2 / C. M. Bianchetti, S. W. Ragsdale, // J. Biol. Chem, 2007. – Vol. 282. – № 52. – P. 37624-37631.
38. Buelow R. Protection of grafts by hemoxygenase-1 and its toxic product carbon monoxide / R. Buelow, S. G. Tullius, H. D. Volk // Am. J. Transplant, 2002. – Vol. 1. – № 4. – P. 313-315.
39. Craig E. A. Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones: Mediators of Protein Conformation and Turnover in the Cell / E. A. Craig, J.S. Weissman, A.L. Horwich // Cell Press, 1994. – Vol. 78. – P. 365-372.

40. Delogu G. Heat shock protein (HSP70) expression in septic patients. *J. Crit Care* / G. Delogu, L. Bosco, M. Marandola, G. Famularo // *Care*, 1997. – № 12. – P. 188-192.
41. Dinda A. K. Heat shock protein (HSP) expression and proliferation of tubular cells in end stage renal disease with and without haemodialysis / A. K. Dinda, M. Mathur, S. Guleria, S. Saxena et al // *Nephrol Dial Ntransplant*, 1998.-№ 13.-p. 99-105.
42. Ding Y. Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular «sink» for NO? / Y. Ding, W. K. McCoubrey, M. D. Maines // *Eur. J. Biochem*, 1999. – 264.-№ 3. – P. 854-861.
43. Feige U. Stress-inducible cellular responses / U. Feige. – Basel. : Birkhauser, 1996. – 512 p.
44. Ferris C. D. Heme oxygenase -1 prevents cell-death by regulating cellular iron / C. D. Ferris, S. R. Jaffrey, A. Sawa // *Nat. Cell Biol.*, 1999. –Vol. 1. – P. 152 - 157.
45. Foresti R. Haem and nitric oxide: synergism in the modulation of the endothelial haem oxygenase-1 pathway/ R. Foresti, M. Hoque, S. Bains, C. J. Green, R. Motterlini // *Biochem J.*, 2003. – 372. – № 2. – P. 381-390.
46. Gutteridge J. M. Antioxidant protection by haemopexin of haemstimulated lipid peroxidation / J. M. Gutteridge, A. Smith // *Biochem. J.*, 1988. –Vol. 256. – № 3. – P. 861-865.
47. Guzhova I. V. Cell. StressChap / I. V. Guzhova // *Biochem. J.*, 1997. –Vol. 2. – № 2. – P. 132-139.
48. Hardison R. The Evolution of Hemoglobin Studies: of a very ancient protein suggest that changes in gene regulation are an important part of the evolutionary story / R. Hardison // *Amer. Sci.*, 2006. –Vol. 87. – № 2. – P. 126.

49. Hegg E. L. Heme A Synthase Does Not Incorporate Molecular Oxygen into the Formyl Group of Heme A / E. L. Hegg // *Biochemistry*, 2004. – Vol. 43. – № 27. – P. 8616-8624.
50. Hightower L. E. Heat shock, stress protein, chaperones and proteotoxicity / *Cell*, 1991. – № 66. – p. 191-197.
51. Holoshitz J. Arthritis induced in rats by cloned T lymphocytes responsive to mycobacteria but not to collagen type II / J. Holoshitz, A. Matitiau, I. R. Cohen // *J Clin. Invest*, 1984. – Vol. 73. – P. 211-215.
52. Ishikawa K. Heme oxygenase-1 again stvascularin sufficiency: roleso father osclerotic disorders / K. Ishikawa // *Curr. Pharm. Des.*, 2003. – Vol 9. – № 30. – P. 2489-2497.
53. Keyse S. M. Heme Oxygenase is the major 32 KD a stress protein in duced in human skin fibroblasts of UVA radiation, hydrogen peroxide and sodiumarsenite/ S. M. Keyse, A. M. Tyrrell // *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989. – Vol. 86. – P. 99 - 103.
54. Komatsuda A. Renal localization of the constitutive 73-kDa heat-shock protein in normal and PAN rats / A. Komatsuda, H. Wakui, H. Imai, Y. Nakamoto et. al. // *Kidney Int.*, 1992. – № 41. – p. 1204-1212.
55. Kutty R. K. Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3 / R. K. Kutty, G. Kutty, I. R. Rodriguez // *Genomics*, 1994. – Vol. 20. – № 3. – P. 513-516.
56. Maines M. D. The Heme Oxygenase System; A Regulator of Second Messenger Gases / M. D. Maines // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 1997. – Vol. 37. – P. 517 - 554.
57. Mc Coubrey W. K. Humanheme oxygenase-2: characterization and expression of a full-lengthc DNA and evidence suggesting that the two HO-2

- transcripts may differ by choice of polyadenylation signal / W. K. McCoubrey, J. F. Ewing, M. D. Maines // Arch. Biochem. Biophys, 1992. –Vol. 295. – № 1. – P. 13-20.
58. McCoubrey W. K. The structure, organization and differential expression of the gene encoding heme oxygenase-2 / W. K. McCoubrey, M. D. Maines // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985. –Vol. 82. – P. 155 – 161.
59. Morse D. Heme oxygenase-1: the “Emerging Molecule” has arrived / D. Morse, A. M. Choi, K. Choi // Amer. J. Resp. Cell Mol. Biol., 2002. –Vol. 27. –№ 1. – P. 8 - 16.
60. Nakao A. Immunomodulatory effects of inhaled carbon monoxide on rat syngeneic small bowel graft motility / A. Nakao, B. A. Moore, N. Murase, F. Liu et. al. // Gut, 2003. – № 52. – p. 1278-1285.
61. Ozono R. New biotechnological method to reduce oxidative stress in the cardiovascular system: focusing on the heme oxygenase-1 pathway / R. Ozono // Curr. Pharmac. Biotech, 2006. –Vol. – № 2. – P. 87-93.
62. Petrache I. Heme oxygenase-1 inhibits (TNF)- α – induced apoptosis in cultured fibroblasts / I. Petrache, L. E. Otterbein, J. Alam // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol, 2000. –Vol. 278. – P. 312 - 329.
63. Ramos C. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression / C. Ramos, M. Montano, J. Garcia-Alvarez // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2001. – Vol. 24. – P. 591-598.
64. R. J. Ubiquitin in health and disease / R. J., Mayer, J. Arnold, L. Laszlo, M. Landon // Biochem. Biophys. Acta.- 1991.-Vol 1089, №13.- P. 141-157.
65. Sanchez E. R. Biochemistry / E. R. Sanchez.– 1990. – Vol. 29. – P. 5145.
66. Sarge K. Molec. Cell. Biol / K. Sarge. – 1993.– Vol. 13. –P. 1392-1407.
67. Schlesinger M. Heat Shock from Bacteria to Man / M. Schlesinger. – New York, 1982. – P. 287.

68. Shibahara S. Cloning and expression of c DNA for the heme oxygenase / S. Shibahara, H. Taguchi, T. Yoshida // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985. – Vol. 82. – P. 7865 - 7869.
69. Smith A. Role of Hemopexin in Human T-Lymphocyte Proliferation / A. Smith, A. Eskew // *Exp. Cell. Res.*, 1997. – Vol. 232. – № 2. – P. 246 - 254.
70. Smith M. A. Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease / M. A. Smith, R. K. Kutty, P. I. Richey // *Amer. J. Pathol.*, 1994. – Vol. 145. – № 1. – P. 42 - 47.
71. Takami M. Catabolism of heme moiety of hemoglobin. haptoglobin in rat liver cell *in vivo* / M. Takami // *J. Biol. Chem.*, 1993. – Vol. 268. – P. 20335 - 20342.
72. Tenhunen R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase / R. Tenhunen, H. S. Marver, R. Schmid // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – Vol. 61, No. 2 (Oct. 15, 1968), pp. 748-755
73. Thomas X. *Hematol* / X. Thomas . – 2005. – №10(3). – P. 225-235.
74. Timkovich R. Proposed Structure of Heme d, a Prosthetic Group of Bacterial Terminal Oxidases / R. Timkovich, M. S. Cork, R. B. Gennis, P. Y. Johnson // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1985. – Vol. 107. – № 21. – P. 6069-6075.
75. Torn T. Defense against oxidative tissue injury: the essential role played by heme oxygenase-1 / T. Torn, M. Kiyoshi, A. Reiko, S. Shigeru // *Current Enzyme Inhibition*, 2006. – № 2(2). – p. 105-124.
76. Tsiftoglou A. S. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular and pharmacological aspects / A. S. Tsiftoglou, A. I. Tsamadou, L. C. Papadopoulou // *Pharmacol. Ther.*, 2006. – 111, № 3. – P. 327-345.

77. Wagener F. A. D. T. G. Different faces of the heme-hemeoxygenase system in inflammation / F. A. D. T. G. Wagener, H. D. Volk, D. Willis, N. G. Abraham, M. P. Soares, G. J. Adema, C. G. Figdor // *Pharmacol. Rev.*, 2003. – 55, № 3. – P. 551-571.
78. Wang R. Apoptosis of lung epithelial cells in response to TNF- α requires angiotensin II generation *de novo* / R. Wang, G. Alam, A. Zagariya // *J. Cell. Physiol.*, 2000. – Vol. 185. – P. 253-259.
79. Wang J. Interaction of nitric oxide with human heme oxygenase-1 / J. Wang, S. Lu, P. Moënne-Loccoz // *J. Biol. Chem.*, 2003. – 278, № 4. – P. 2341-2347.
80. Winslow C. S. Heme A of Cytochrome c Oxidase structure and properties: comparisons with hemes B, C, and S and derivatives / C. S. Winslow // *J. Biol. Chem.*, 1975. – Vol. 250. – № 19. – P. 7602-7622.
81. Wu L. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications / L. Wu, R. Wang // *Pharmacol. Rev.*, 2005. – 57, № 4. – P. 585-630.
82. Yachie A. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency / A. Yachie, T. Wada // *J. Clin. Invest.*, 1999. – Vol. 103. – № 1. – P. 129-135.
83. Yokoo T., Kitamura M. IL-1 β (3) depressed expression of the 70-kilodalton heat shock protein and sensitizes glomerular cells to oxidant-initiated apoptosis / T. Yokoo, M. Kitamura // *J. Immunol.*, 1997. – № 272. – p. 18033-18037.

ДОДАТКИ

Додаток А



Рис. А-1. Спектрофотометр ULAB 102UV

Опис приладу

Це однопроменевий інструмент, прилад загального призначення спеціально спроектований для лабораторій. Цей інструмент ідеально підходить для різних областей застосування, таких як: хімія, біохімія, охорона довкілля, аналізу води і стічних вод та інших сферах контролю якості дослідження.

Цей прилад включає 128×64 точковий матричний РК-дисплей для фотометричних результатів, відрізняється простотою експлуатації, діапазон довжин хвиль 190 нм до 1100 нм. Цей прилад ідеально підходить для вимірювань у видимому і ультрафіолетовому діапазоні довжин хвиль спектра.

Принцип роботи

У різних речовин різні точки поглинання довжини хвилі. Крім того,

при фіксованій точці довжини хвилі, поглинання має певний стосунок до концентрації речовини (завжди прозорий розчин) і його товщині.

Складові приладу

Спектрофотометр складається з п'яти частин:

- 1) галогенною або дейтерієвої лампи як джерела світла;
- 2) монохроматора для відділення необхідної довжини хвилі і усунення небажаного випромінювання другого порядку;
- 3) кюветного відділення для приміщення досліджуваного розчину;
- 4) детектора для реєстрації пропущеного світла і його перетворення в електричний сигнал;
- 5) цифрового екрану для відображення значень поглиненого або минулого світла.

Блок-схема (Рис. А-2) показує співвідношення між частинами приладу.

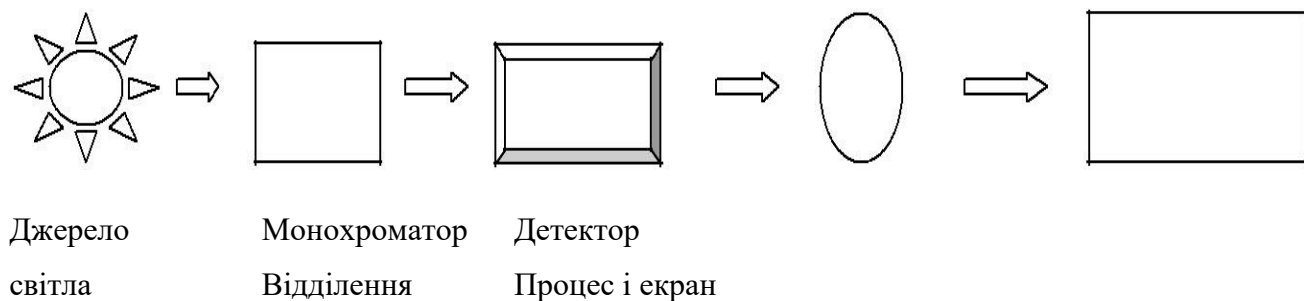


Рис. А-2 Блок-схема спектрофотометра

У спектрофотометрі світло від лампи фокусується на вхідному отворі монохроматора, де колімуєuche дзеркало направляє промінь на дифракційну решітку.

Решітка розкладає промінь світла на спектр, після чого певна порція цього світла фокусується на вихідному отворі монохроматора колімуєuchим дзеркалом. Після виходу з монохроматора промінь світла прямує через один з фільтрів у відділення для зразка. Фільтр допомагає позбутися від небажаного випромінювання другого порядку виникає на дифракційної

решітці. Після проходження через зразок промінь направляється на кварцовий фотодіодний детектор, де перетворюється в електричний сигнал, який подається на цифровий екран, де відображається значення зафіксованого детектором світла.