

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол №____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2023 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ МЕТФОРМІНУ З ТРАНСПОРТЕРОМ
ОРГАНІЧНИХ КАТІОНІВ РИБКИ ДАНІО IN SILICO**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності 091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

Яринки Валентина Віталійовича

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

к.б.н. **Нипорко Олексій Юрійович**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Яринка В.В. Дослідження взаємодії метформіну з транспортером органічних катіонів рибки даніо *in silico*. - Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП “Біологія (високі технології)”

У роботі було досліджено взаємодію протидіабетичного препарату метформіну із білками-транспортерами органічних катіонів ОСТ1-2 модельного організму рибки даніо (*Danio rerio*) з використанням методів комп’ютерного моделювання і візуалізації. Таким чином, були спрогнозовані найбільш вигідні позиції зв’язування і оцінена стабільність формування комплексу метформіну з ОСТ1 і ОСТ2. Так передбачається, що ОСТ1 приймає більшу участь у транспорті такого ксенобіотику як метформін за рахунок своєї поліспецифічності і більшому рівню експресії в тканинах, аніж ОСТ2. Отримані результати можуть бути корисними для всебічного розуміння ролі транспортерів органічних катіонів у процесах метаболічних змін і токсичних ефектів, які викликає метформін у рибок даніо. Цим можуть скористатись вчені, які займаються розробкою і випробуванням ліків на таких моделях, а також вивчають екологічну токсикологію водних середовищ.

Ключові слова: метформін, рибка даніо (*Danio rerio*), екологічна токсикологія, ксенобіотик, докінг білок-ліганд.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Загальна характеристика метформіну.....	8
1.1.1. Місце метформіну в медицині.....	8
1.1.2. Фармакологічні властивості.....	9
1.1.3. Вплив на навколишнє середовище.....	12
1.2. Використання риби даніо (<i>Danio rerio</i>) у вивченні стресових впливів метформіну на водне середовище.....	13
1.2.1. Риба даніо як модельний організм.....	13
1.2.2. Вплив метформіну на ріст, розвиток і розмноження.....	16
1.2.3. Роль вивчення транспортерів органічних катіонів (ОСТ).....	21
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	25
2.1. Об'єкт дослідження.....	25
2.2. Матеріали і програмні застосування.....	25
2.3. Методи дослідження.....	26
2.3.1. Пошук і підготовка структур білків-транспортерів і метформіну.....	26
2.3.2. Проведення докінгу через AutoDock Vina.....	27
2.3.3. Візуалізація результатів докінгу.....	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	30
3.1. Взаємодія метформіну з транспортерами органічних катіонів риби даніо.....	30
3.1.1. Комплекс ОСТ1-метформін.....	30
3.1.2. Комплекс ОСТ2-метформін.....	33

3.2. Порівняння даних докінгу метформіну з ОСТ1 і ОСТ2..... 35

ВИСНОВКИ..... 38

Список використаних джерел..... 39

ДОДАТКИ..... 47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ЦД2 - цукровий діабет 2 типу;

МЕТ - метформін (скорочення, яке можна часто знайти в англомовних статтях);

ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) - фармакологічна аббревіатура, що позначає “абсорбцію, розподіл, метаболізм та екскрецію”;

SLC (solute carrier family) - сімейство носіїв розчиненої речовини;

PMAT (plasma membrane monoamine transporter) - транспортер моноамінів плазматичної мембрани;

OCT (organic cation transporter) - транспортер органічних катіонів;

MATE (multidrug and toxin extrusion protein) - протеїн сімейства екструзії токсичних речовин;

AMФК - АМФ-активована протеїнкіназа;

АТФ - аденозинтрифосфорна кислота;

НАДН - нікотинамідаденіндинуклеотид;

hpf (hours post fertilization) - годин після запліднення; є мірою часу в біології розвитку;

EDCs (endocrine-disrupting compounds) - сполуки, що руйнують ендокринну систему.

ВСТУП

За останніми оцінками, на сьогодні відомо близько 415 мільйонів людей, які страждають на цукровий діабет. Безперечно, найрозповсюдженіша його форма це діабет 2-го типу (ЦД2). Приблизно 90% усіх випадків діабету припадає саме на цей тип, решта - діабет 1-го типу і гестаційний діабет [1]. Метформін - найрозповсюдженіший неінсуліновий препарат для лікування ЦД2. Завдяки ретельним дослідженням як представника бігуанідів, вже протягом 50 років він є безпечним і широко застосованим по всьому світу. Крім того, останні дослідження кажуть про перспективи застосування метформіну при інших захворюваннях, таких як: синдром полікістозних яєчників, діабетичної нефропатії, гестаційного діабету і навіть раку. [2-5].

Як відомо, метформін екскретується без якісних перетворень у навколишнє середовище. А через широке застосування по всьому світу, частка забрудненого водного середовища цим препаратом є найбільшою. Багато досліджень вказують на ембріотоксичні і тератогенні ефекти метформіну на ембріони риб [6]. А також порушення функціональності ендокринної системи, в особливості вплив на формування інтерсексуальності у самців [7-8]. Дослідження токсичного впливу ксенобіотиків, такі як метформін, є важливою проблемою для захисту водних екосистем. Для цього вченими широко використовується такий модельний організм, як рибка даніо (*Danio rerio*). Подібність до фізіології і метаболізму ссавців обумовлює слушність її використання у дослідженнях патологічних станів при таких метаболічних розладах, як ЦД2. Ця модель також прогнозує усі токсичні впливи лікарських засобів при гранично допустимих концентраціях на мешканців водних середовищ. І для кращого розуміння токсичних впливів і метаболічних змін, які обумовлює метформін, важливо зрозуміти роль взаємодії із білками-транспортерами, що залучені до процесів абсорбції, розподілу, метаболізму і виведення (ADME). Особливо, визначення взаємодії

ксенобіотиків із білками сімейства транспортерів органічних катіонів (ОСТ), - які відіграють ключову роль у транспорті розчинених речовин [9-10].

Метою цієї роботи є узагальнення знань про метформін і вивчення його токсичного впливу на організмів водного середовища. Встановлення його особливостей впливу на ріст, розвиток і розмноження на прикладі модельного організму рибки даніо (*Danio rerio*). А також дослідження значення білків сімейства транспортерів органічних катіонів (ОСТ) в процесах абсорбції, розподілу і виведення ксенобіотиків. Відповідно до мети було визначено наступні **завдання**:

1) Висвітлити сучасні уявлення про місце метформіну у медицині, його фармакологічні властивості і вплив на навколишнє середовище в якості ксенобіотика.

2) Об'єднати літературні дані про використання модельного організму рибки даніо (*Danio rerio*) у дослідженні метаболічних патологій та у вивченні впливу ксенобіотиків на водні екосистеми.

3) Встановити роль транспортерів органічних катіонів (ОСТ) у токсикологічних дослідженнях.

4) Провести моделювання взаємодії метформіну з ОСТ1-2 рибок даніо з використанням комп'ютерних засобів методом молекулярного докінгу.

5) Порівняти спорідненість і стабільність комплексів метформіну з транспортерами органічних катіонів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика метформіну

1.1.1. Місце метформіну в медицині

Цукровий діабет 2-го типу це хронічний метаболічний розлад, що пов'язаний із резистентністю до інсуліну. Цей стан викликаний через недостатню секрецію інсуліну β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози в поєднанні з порушенням його дії на тканини-мішені, такі як м'язи, печінка та жирова тканина. Основними факторами розвитку ЦД2 є ожиріння і генетична схильність [11].

Метформін - це найпоширеніший пероральний протидіабетичний лікарський засіб першої лінії, який рецептурно призначається для лікування ЦД2. Відноситься до класу бігуанідів (N,N-диметилбігуанід), речовин рослинного походження, які були виведені з козлятнику (*Galega officinalis*) [5].

Історично, становлення метформіну як лікарського засобу мало свої перешкоди. Так, на початку досліджень властивостей бігуанідів, до метформіну приділялось найменше уваги, бо два інших представника - фенформін і буформінд мали більш сильний гіпоглікемічний ефект. А коли у 1970-х рр. вони були вилучені через високий ризик розвитку лактоацидозу, метформін отримав погану репутацію як їх представник. І лише після ретельних дослідів було встановлено, що метформін має найкращий профіль безпеки та добре переноситься [12]. Частота лактоацидозу при застосуванні метформіну в терапевтичних дозах рідкісна. Так званий "метформін-асоційований лактоацидоз" (в англійській літературі позначають як MALA) нині піддається критиці з боку наукового товариства. Його застосування може бути не рекомендованим лише у випадку гострої ниркової і печінкової недостатностей у пацієнтів [13]. Натомість метформін має низку клінічних переваг, оскільки не викликає гіпоглікемії чи збільшення маси тіла,

і має кардіопротекторні властивості [14]. Оптимальне використання метформіну вимагає чіткого розуміння його ефектів, дозування, безпеки та альтернатив.

Метформін широко використовується для лікування ЦД2 вже понад 50 років і був визнаний безпечним і ефективним як у вигляді монотерапії, так і в комбінації з іншими пероральними протидіабетичними засобами та інсуліном. Більше того, вчені вказують на перспективи його застосування при таких захворюваннях, як: синдром полікістозних яєчників, діабетичної нефропатії, гестаційного діабету і навіть раку [2-5].

1.1.2. Фармакологічні властивості

Не зважаючи на те, що метформін застосовують вже понад 50 років, молекулярний механізм його терапевтичної дії досі залишається об'єктом дослідження. Найпоширеніша думка полягає в тому, що метформін діє як сенсibilізатор інсуліну. Механізм його дії пов'язаний, головним чином, із впливом на енергетичний баланс клітини шляхом інгібування комплексу І ланцюга транспортування електронів. Результуюче зниження рівня клітинного АТФ активує регуляторну АМФ-кіназу (АМФК), сприяючи поглинанню та розщепленню глюкози, а також окисленню жирних кислот, тим самим покращуючи чутливість до інсуліну [15].

Оптимальна доза метформіну для перорального прийому становить 2 г/добу. Пікова концентрація в плазмі досягається через 3 години, а середнє значення періоду напіврозпаду метформіну в плазмі становить приблизно 20 годин. Після одноразового прийому, метформін швидко розподіляється в багатьох тканинах під час всмоктування тонким кишечником. Найбільше накопичення препарату відбувається в основному у шлунково-кишковому тракті, нирках і печінці [16].

Метформін за фізіологічних умов є надзвичайно гідрофільною сполукою, яка існує здебільшого у протонаній формі [5]. Дійсно, транспортування метформіну включає активний процес поглинання через

органічні переносники розчиненої речовини. У ссавців процес поглинання гідрофільних фармацевтичних засобів через плазматичні мембрани залежить від клітинного транспорту, що опосередкований за посередництвом білків-носіїв розчиненої речовини (SLC). Білки SLC мембранних транспортних білків це доволі обширна група, яка складається з: транспортерів органічних катіонів (ОСТ), транспортера моноамінів плазматичної мембрани (PMAT) і протеїнів сімейства екструзії токсичних речовин (MATE) тощо [9]. Більшість цих транспортних білків є поліспецифічними, тобто вони можуть взаємодіяти зі сполуками різної молекулярної структури та розміру, і здатні переносити ендogenousні сполуки, ксенобіотики і метаболіти, такі як ліки. Роль цих транспортних білків є вирішальною в процесах абсорбції, розподілу, метаболізму та екскреції хімічних речовин і лікарських засобів (ADME) [17].

Таким чином, у людей кишкова абсорбція метформіну в основному опосередковується PMAT (ген *slc29a4*), який локалізований на просвітній стороні ентероцитів. OST1 (ген *slc22a1*) експресується на базолатеральній мембрані ентероцитів і здійснює транспорт метформіну в інтерстиціальну рідину. Головний білок-транспортер, що здійснює процес абсорбції метформіну печінкою є OST1 і, можливо, OST3 (ген *slc22a3*), що експресується на базолатеральній мембрані гепатоцитів. Кліренс метформіну залежить від виведення нирками, оскільки метформін не зазнає біотрансформації в печінці або виведення з жовчю. У нирках метформін поглинається епітеліальними клітинами нирок за допомогою OST2 (ген *slc22a2*), які теж експресується на базолатеральній мембрані. Метформін виводиться із сечею за допомогою MATE1 (ген *slc47a1*) і MATE2 і (ген *slc47a2*) [18].

Відповідно до фармакодинаміки, метформін зменшує клітинне дихання шляхом м'якого та специфічного інгібування комплексу дихального ланцюга 1 (НАДН-убіхінон-оксидоредуктаза), не впливаючи на інші етапи

мітохондріального механізму [19]. Це призводить до зміни співвідношення АТФ/АМФ у бік останньої, що викликає активацію АМФК і каскад метаболічних змін (Рис. 1.1.). А саме: зниження активності ключового глюконеогенного ферменту фруктозо-1,6-бисфосфатази (FBPase), інгібування аденілатциклази та передачі сигналів цАМФ-залежною протеїнкіназою А (сАМР-РКА) [5]. Також відомий процес АМФК-незалежний механізм зниження глюконеогенезу. Він характеризується прямим інгібуванням мітохондріальної гліцерофосфатдегідрогенази (mGPD), яке зрушує окисно-відновний баланс і знижує перетворення гліцерину в глюкозу, блокуючи глюконеогенез та підвищуючи цитозольний НАДН, який живить лактатдегідрогеназу, а також порушує включення лактату в глюкозу [20].

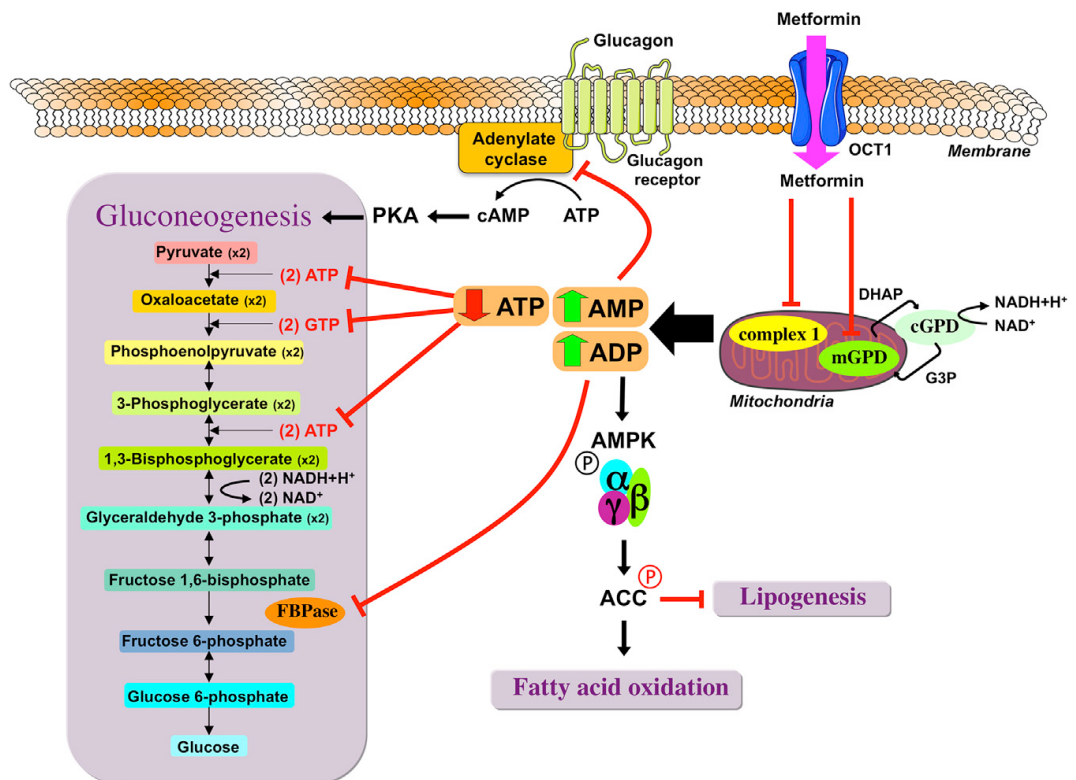


Рис. 1.1. Схема молекулярного механізму гіпоглікемічної дії метформіну в клітині печінки [5]

Проблема досліджень фармакологічних властивостей метформіну полягає у його мультитаргетній дії. Він може опосередковувати інгібування

глюконеогенезу як через АМФК-шлях, так і через інші, які сьогодні тільки досліджуються. Попри складність це розвиває знання про властивості метформіну і разом з тим відкриває нові перспективи його застосування у лікуванні інших патологічних станів [2-4].

1.1.3. Вплив на навколишнє середовище

Як відомо, метформін не зазнає біотрансформації під час метаболізму і екскретується у навколишнє середовище в незміненому вигляді із сечею. Період напіввиведення становить приблизно 5 годин [18]. І через його широке застосування по всьому світу, частка цього препарату є однією з найбільших, що потрапляє у водне середовище через міські очисні споруди. Концентрація метформіну у водних об'єктах по всьому світу коливається від нг/л до мкг/л, в той час як у поверхневих водах було його виявлено до 33,5 мкг/л [21]. Метформін, потрапляючи в очисні споруди, частково біотрансформується в гуанілсечовину. У водних екосистемах обидві сполуки можуть проявляти різні токсичні ефекти для нецільових організмів [6].

До токсичних ефектів, які метформін може викликати у водних хребетних, відносять ендокринні порушення і розвиток інтерсексуальності у самців. Формування інтерсексуальності або міжстатевих риб призводить до зниження кількості запліднених ікринок під час нересту [7-8]. Ці порушення обумовлені впливом препарату на експресію вітелогеніну (VTG) у самців риб, а разом з тим дію на рецептор естрогену α (ER α) і гонадотропін-релізінг-гормон 3 (GnRH3), що впливає на вісь гіпоталамус-гіпофіз-гонади (HPG), що призводить до порушення репродуктивної системи [7, 22-23]. Усі ці дані кажуть про те, що метформін можна відносити до групи сполук, що руйнують ендокринну систему (EDCs). Особливо, враховуючи той факт, що він впливає на стероїдогенез [15] і є ефективним у лікуванні ендокринного розладу синдрому полікістозних яєчників [4, 24].

Крім впливу на ендокринну систему, метформін впливає також і на

ембріогенез риб. При екологічно значущих концентраціях тератогенний вплив метформіну обумовлюється оксидативним стресом [6]. Також від метформіну може виникати метаболічна дисфункція у риб на ранніх стадіях розвитку (стадія ікринки і пуголовки). Це пов'язано із зміною факторів реакції метаболітів і експресії генів в сигнальних шляхах клітини, на які впливає присутність ксенобіотиків [25-26].

В якості вирішення проблеми забруднення довкілля метформіном було проведено ряд експериментів із техніками очищення стічних вод. Ефективними виявились процеси хлорування і озонування. В той час як флокуляція та фільтрація активованим вугіллям виявились непридатними для очищення вод від метформіну і його метаболіту - гуанілсечовини. Однак підземний прохід (фільтрація на березі річки або штучне поповнення ґрунтових вод) все ж виявився найкращим методом для видалення цих двох сполук на гідротехнічних спорудах [27].

1.2. Використання рибки даніо (*Danio rerio*) у вивченні стресових впливів метформіну на водне середовище

1.2.1. Рибка даніо як модельний організм

Дослідження механізмів формування інсулінорезистентності при цукровому діабеті 2-типу та тестування нових препаратів для розробки протидіабетичних засобів є першочерговою задачею для вчених. Вивчення дисфункції метаболізму глюкози здійснюється на тваринних моделях. Було розроблено численні моделі ЦД2 з використанням:

- 1) гібридизації, спричинення змін у генотипі як таких (спланованих і спонтанних) [28-29];
- 2) індукції дієтою (особливо шляхом розвитку ожиріння) [30];
- 3) хімічного впливу [31];
- 4) хірургічних маніпуляцій [32];

- 5) генної інженерії (трансгенна/нокаутна маніпуляція) [33];
- 6) комбінації вищенаведених технік [34].

Більшість тваринних моделей базуються на використанні гризунів, що має свої недоліки. Такі експерименти трудомісткі і через етичні обмеження можна використовувати лише невеликі групи таких тварин [11]. Щоб подолати ці обмеження, вченими все частіше використовуються риби в якості модельних організмів. Сьогодні використання таких тваринних моделей у біомедичних дослідженнях набуває заслуженої популярності. Риби як найпоширеніша і філогенетично найрізноманітніша група хребетних тварин корисна для вивчення еволюційних процесів, біології розвитку, токсикології та патологічних процесів [35]. Особливо популярним таким модельним організмом є рибка даніо (*Danio rerio*). Вперше ця тропічна здебільшо прісноводна риба з родини Коропові (Cyprinidae) була представлена в якості генетичної моделі у 1981 році [36]. Вона має фізіологічну, морфологічну та гістологічну подібність із ссавцями [37]. Більше того, секвенування геному виявило, що ~70% генів людини мають ортолог рибки даніо, а також було встановлено, що приблизно 82% потенційних генів, пов'язаних із захворюваннями людини, мають принаймні один очевидний ортолог рибки даніо [38]. Як тваринна модель вона має низку переваг: малі розміри (3-6 см), високу плодючість, швидкий розвиток і час генерації, оптичну прозорість на ранніх стадіях ембріогенезу і генетичну подібність до людини [39]. Вона простіше і дешевше популярних моделей гризунів; зручна модель для маніпуляцій генної інженерії, в якій легка техніка введення модифікованих генів та яка може поглинати хімічні мутагени через воду. Прозорість ембріонів дозволяє використовувати неінвазивні методи візуалізації.

З поміж переваг, проблемою у використанні такої тваринної моделі є економічний аспект і стандартизація моделі для вдалого утримання і догляду за рибками. Перевага рибок даніо в тому, що вони мають толерантність до широкого діапазону умов навколишнього середовища в неволі. Попри це,

важливим для ефективності використання і покращення відтворюваності експериментів є всебічне дотримання усіх акваріумних характеристик включно з фільтрацією води, умовами розведення і харчування у штучній водній екосистемі.

Завдяки вищенаведеним перевагам рибку даніо використовують як систему для виявлення та характеристики нових діагностичних і терапевтичних цілей для метаболічних захворювань [11]. Такими є, наприклад, вісцеральне ожиріння, атеросклероз, неалкогольний стеатогепатит, і діабет [40-43]. Існує кілька моделей діабету 2-го типу у рибок даніо. Наприклад, індукованою дієтою моделлю за рахунок перегодування кормом [11], використанням опосередкованої токсином абляції β -клітин [44], скрінінгу мутагенезу, індукованого хімічним мутагеном N-етил-N-нітрозосечовиною (ENU) [45], а також методом нокдауну гена, опосередкованого морфоліном та gRNA/Cas9 [46]. Було представлено штам рибок даніо з мутацією гену, що є однією з причин цукрового діабету у людей, а саме гомеобоксу 1 підшлункової та дванадцятипалої кишки (*pxd1*, також відомий як інсуліновий промоторний фактор 1, *ipf1*) в якості генетичної моделі [45]. Попри це, нульова мутація в *pxd1* зменшила розмір тіла риб і знизила їх життєздатність, обмежуючи застосування цього штаму для досліджень ЦД2.

Модель рибки даніо з індукованою гіперглікемією є корисною моделлю для вивчення ЦД2 за допомогою тестування на толерантність до глюкози та вимірювання вироблення інсуліну та глікемічної відповіді на протидіабетичні препарати людини. Крім цього, аналіз секвенування РНК тканин печінки та підшлункової залози рибки даніо показує те, що шляхи патогенезу ЦД2 схожий з людським. Перевагами рибки даніо в якості моделі індукованого діабету 2-го типу є: швидкий прояв фенотипу при ЦД2 порівняно з моделями на гризунах, позитивна відповідь на протидіабетичні препарати людини за допомогою методів експозиції або перорального введення, і подібність

транскриптомних шляхів патогенезу до людського організму [11].

Крім дослідження суто патологічних моделей, відомо багато робіт про залучення рибок даніо у вивченні впливу ксенобіотиків і спортивного допінгу. Вони зосереджені на дослідженні закономірностей роботи метаболізму, особливо цитохромальної системи печінки [35]. В них, як правило, акцент з дослідження фізіології зміщується більше на екологічну токсикологію.

Сьогодні експерименти з рибкою даніо є популярними серед дослідників у багатьох наукових дисциплінах. Серед них це насамперед генетика, біологія розвитку, розділ зоології, що вивчає поведінку тварин - етологія, фармакологія, загальна фізіологія і екологічна токсикологія. через безліч спільних генних ортологів з людиною, рибка даніо залишається еталонним модельним об'єктом для фармакологічних і токсикологічних досліджень. Такі моделі стають в нагоді для випробування нових стратегій лікування діабету 2-го типу. В тому числі для тестування гіпоглікемічних препаратів, такі як метформін [6-7].

1.2.2. Вплив метформіну на ріст, розвиток і розмноження

Актуальною темою для вивчення метформіну в контексті його токсикології є його вплив на водні екосистеми. Відомо, що виведення цього препарату з організму людини проходить без якісних перетворень. З цієї причини і через велику поширеність у всьому світі, метформін є лікарським засобом з найбільшою масою який зустрічається у стічних водах і водозборах по всьому світу [8]. Як було розглянуто вище, вплив на водні екосистеми, в особливості на риб, є токсичним через руйнівний вплив на ендокринну систему і тератогенний ефект. Дослідження впливу ксенобіотиків на рибах здійснюють під час різних етапів онтогенезу (Рис. 1.2.). Часовий діапазон стадії вимірюється у hpf або dpf (тобто кількість годин або днів відповідно від моменту запліднення), що є одиницею вимірювання у біології розвитку, яка часто зустрічається у англійських статтях [47]. Особливо увага вчених

зосереджена на ранніх етапах розвитку. Це стосується стадії ікринки в часовому діапазоні від 4 hpf до 96 hpf. Ембріони рибок даніо вважаються привабливою експериментальною моделлю для систематичного дослідження токсичності ксенобіотиків щодо їх впливу на розвиток організмів, включаючи людину, а також для оцінки потенційних ризиків, які вони можуть створювати для навколишнього середовища. Також використання ембріонів замість дорослих риб має перевагу в тому, що в Європі ембріони *Danio rerio* не вважаються лабораторними тваринами до стадії самостійного годування, що робить їх ідеальними системами для одночасного скринінгу кількох токсичних сполук [35]. В меншій мірі токсичні ефекти досліджують під час стадії пуголовка, молодняка і навіть під час запліднення [48].

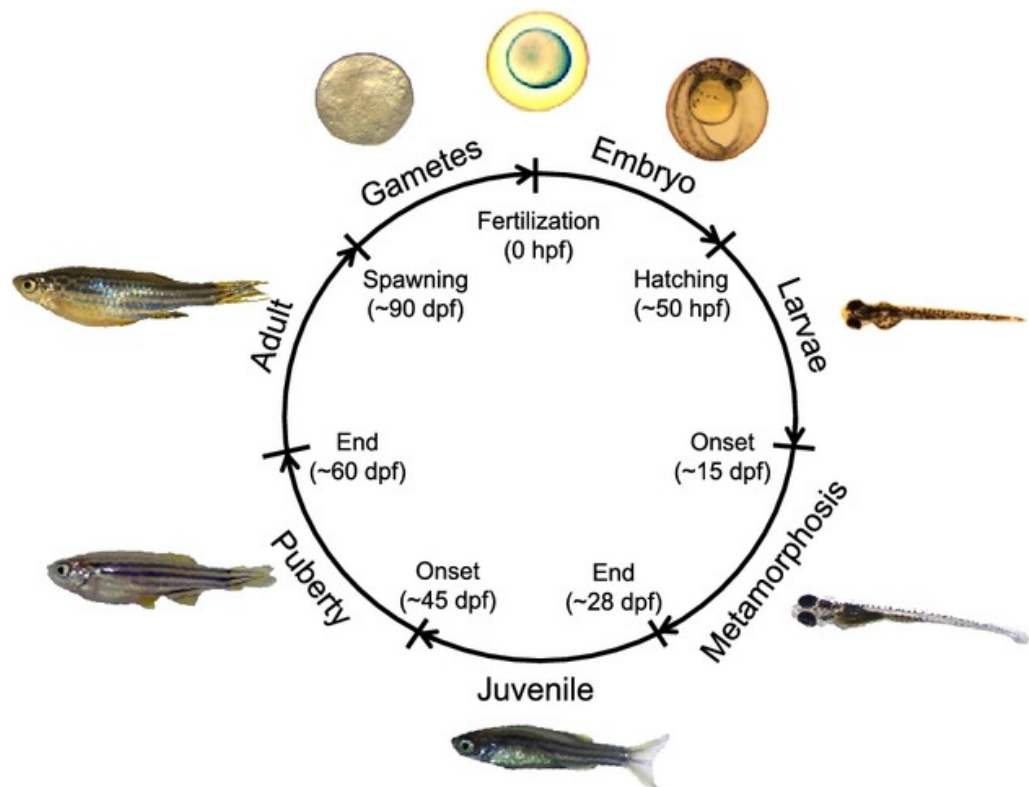


Рис. 1.2. Життєвий цикл рибки даніо (*Danio rerio*) [47]

- **Формування інтерсексуальності**

Дія метформіну на ендокринну систему рибок даніо супроводжується впливом на біосинтез стероїдних гормонів і посиленням експресії вітелогеніну (VTG1) у самців. Загалом, це має такі наслідки, як: естрогенізація гонад, зменшення розміру тіла та зниження плодючості, що проявляється, у великій кількості незапліднених ікринок. Такий ефект найчастіше досліджують на ранніх стадіях онтогенезу в ході формування статевозрілих риб [7]. Крім того, потомство також зазнає впливу від предків, на яких тестували метформін, що позначається на зниженні їх виживання та менших розмірах тіла. Також припускають, що гормональна дисфункція у риб може брати участь у прискореному процесі вилуплення, що має сказується у подальшому розвитку особин. Таким чином, метформін у екологічно значущих концентраціях серйозно впливає на статеву і ендокринну систему рибок даніо. Дослідження на таких моделях актуалізує питання внесення цього препарату до числа сполук, що руйнують ендокринну систему (EDCs), які знаходяться у навколишньому середовищі.

- **Тератогенний ефект**

Також метформін обумовлює ембріотоксичний ефект при хронічному впливі на ембріони риб. Цей ефект обумовлюється оксидативним стресом, що призводить до вад розвитку рибок даніо на ранніх стадіях онтогенезу [6].

Метформін впливає на антиоксидантну ферментну систему, підвищуючи активність супероксиддисмутази (SOD), каталази (CAT) і глутатіонпероксидази (GPx) в ембріонах, які зазнали впливу. Зі збільшенням концентрації метформіну активність ферментів зростає, досягаючи максимального піку при концентрації 75 мкг/л. Активність SOD не має суттєвих відмінностей в залежності від часу експозиції. В той час як CAT має найбільше проявляє антиоксидантну дію при 96 hpf і концентрації 50 мкг/л. А робота ферменту GPx здосягає піку при 40 мкг/л, 50 мкг/л і 75 мкг/л залежно від часу. Отже, антиоксидантний вплив метформіну частково залежить від

часу експозиції (стадії розвитку рибки даніо у межах hpf) і концентрації ксенобіотика.

Активація ферментних антиоксидантів грає ключову роль у тератогенному впливі. Порушуючи органогенез, вона індукує такі вади розвитку як: ваду розвитку хвоста, сколіоз, набряк перикарда, деформацію жовтка, гіпопігментацію, затримку процесу вилуплення, відсутність плавника, відсутність ока та черепно-лицьовий порок розвитку. Серед них найбільш вираженими вадами розвитку є вада розвитку хвоста та сколіоз. Найбільш виражені і різноманітні вади розвитку спостерігаються за 75 мкг/л. Після цієї концентрації метформіну тяжкість вад розвитку знижується. На Рис. 1.3. показаний тератогенний вплив на ембріонах рибки даніо за різних концентрацій. По ній можна прослідкувати цікаву кореляцію від концентрацій і формування резистентності до деструктивних проявів ембріотоксичності. При концентрації 100 мкг/л цього ксенобіотика, негативний вплив мінімізується за рахунок такого явища в екологічній токсикології як гормезис. Що є пристосувальною реакцією організму до стресових навколишніх умов, що при в залежності доза/ефект характеризується низькою дозовою реакцією, протилежною ефектом, який спостерігається при високих дозах. Це можна пояснити активацією захисних механізмів і формування толерантності до впливу ксенобіотика [49]. У рибок даніо при цьому спостерігається значне зниження смертності, тяжкості вад розвитку, частоти вилуплення та окисного пошкодження.

Отже, при гострому впливі метформіну, найбільша кількість мертвих ембріонів, частоту і різноманіття вад розвитку досягається при концентрації 75 мкг/л. До того ж, він прискорив процес вилуплення ікринок. Індекс тератогенності метформіну у *Danio rerio* має значення 8,8 [6], і відповідно до критеріїв його слід класифікувати як препарат із тератогенними властивостями для організмів водних екосистем [50].

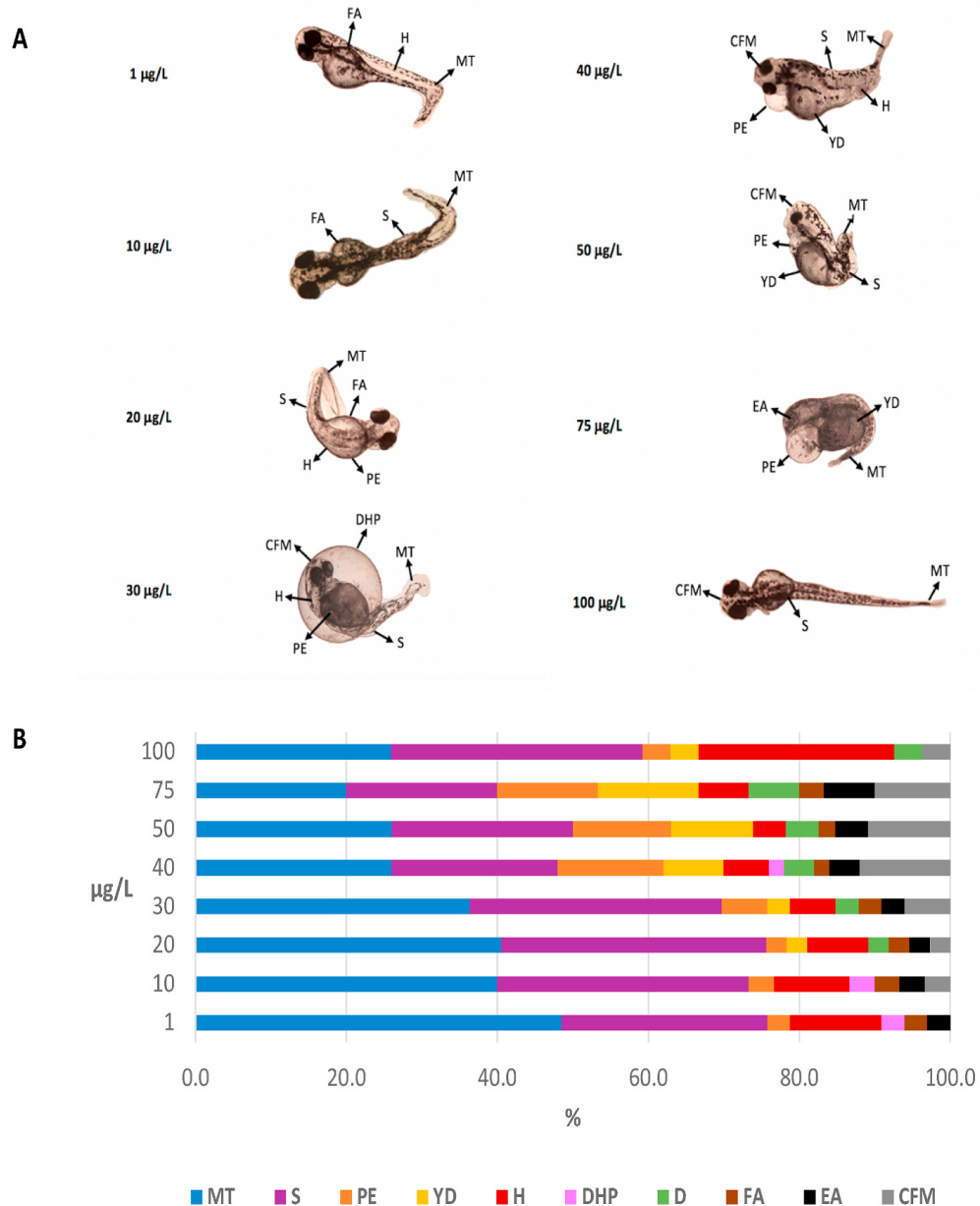


Рис. 1.3. Ембріотоксичність метформіну [6]:

A) Основні вади розвитку, викликані концентраціями метформіну в ембріонах *Danio rerio* при 96 hpf;

B) Частота і різноманітність тератогенних ефектів в залежності від концентрацій.

Примітка: MT: вада розвитку хвоста; S: сколіоз; PE: набряк перикарда; YD: деформація жовтка; H: гіпопигментація; DHP: затримка процесу вилуплення; FA: відсутність плавника; EA: відсутність ока; CFM: черепно-лицева вада розвитку.

1.2.3. Роль вивчення транспортерів органічних катіонів (ОСТ)

Оцінка токсичності сполуки є критичним кроком у відкритті нових ліків і аналізу ризиків забруднення для довкілля. Щоб зрозуміти або передбачити токсичний потенціал сполуки, необхідні знання закономірностей ADME, тобто механізмів абсорбції, розподілу, метаболізму і виведення сполуки [9-10]. Ключову роль в яких виконують білки-транспортери, через які препарат власне потрапляє і виводиться з організму. Робіт з дослідженнями білків-переносників рибки даніо і їх взаємодії з лігандами не так багато, проте сама тема не позбавлена уваги [51-55]. У розділі вище було описано роль сімейства носіїв розчиненої речовини (SLC), які експресуються у вигляді білків-переносників у деяких тканинах людини. У контексті вивчення метформіну як катіонної сполуки, в процесі клітинного транспорту в процесах абсорбції, розподілу та кліренсу залучені переносники органічних катіонів (ОСТ1, ОСТ2 і ОСТ3). Проведений філогенетичний аналіз SLC рибок даніо показав ортологічні зв'язки, експресії генів в порівнянні з ортологами людини [10].

Важливою обставиною у процесах клітинного транспорту у риб є те, що розчиненні у воді сполуки потрапляють в організм через зябра шляхом як пасивної, так і полегшеної дифузії. Причому пасивна дифузія переважає при вищих концентраціях (>100 мкг/л), в той час як полегшена дифузія - при нижчих екологічно значущих концентраціях ($<0,14$ мкг/л) [56]. Для ксенобіотиків полегшеної дифузії є домінуючою [54]. Це варто взяти до уваги через те, що більшість ортологів білків-транспортерів рибок даніо експресуються у зябрах через особливості пристосування до навколишніх умов.

Транспортери органічних катіонів (ОСТ) служать в якості мембранних білків-переносників розчинених речовин, поглинаючи багатьох ендо- та ксенобіотиків. Вони перебувають у центрі уваги медичних токсикологічних досліджень протягом більше десяти років через їхню ключову роль у

поглинанні, розподілі, метаболізмі та виведенні через їх експресію на базолатеральних мембранах різних бар'єрних тканин. ОСТ належать до сімейства *slc22a* в надродині білків SLC.

В ході філогенетичного аналізу, було встановлено ортологи білків-транспортів органічних катіонів *Danio rerio*, які, скоріше за все, абсорбуються ксенобіотичні речовини у клітини, в тому числі і метформін. Так, було визначено, що у цих риб немає ортолога людському ОСТ3 [10]. Припускається, що виявлені транспортери ОСТ1 (ген *slc22a2*) і ОСТ2 (ген *slc22a3*) компенсують функцію ОСТ3, особливо враховуючи широке перекривання субстратів серед ОСТ1, ОСТ2 і ОСТ3 ссавців. Це припущення також підтверджується найвищою експресією ОСТ2 порівняно з іншими дослідженими транскриптами *slc22* в очах рибки данію, яка подібна до експресії ОСТ3 людини та миші в цьому ж органі, де він відіграє важливу роль у поглинанні, розподілі та кліренсі різноманітних ксенобіотичних субстратів [57]. Цікаво, що транспортери органічних катіонів показують різницю в тканинній експресії залежно від статі. Така різниця, можливо, є результатом диференціальної регуляції генів стероїдними гормонами, яка може мати місце не лише в статевих залозах, але й в інших тканинах [58]. Ідентифіковані стероїдно-залежні регуляторні елементи в промоторних областях *slc22* також підтверджують спостережувані відмінності експресії. Субстратна специфічність ОСТ2 рибки данію подібна до людських ОСТ1 і ОСТ3, але виявляє значну відмінності в спорідненості із субстратом і може транспортувати такі сполуки, як нейромедіатори. У рибок данію аналіз профілю експресії транскрипту ОСТ2 демонструє широке поширення в тканинах: окрім нирок транспортер знаходиться в очах, яєчниках та селезінці, а також у кишечнику, печінці та зябрах. Помірна експресія ОСТ2 у всіх досліджуваних тканинах свідчить про більш специфічну фізіологічну роль і можливу участь у виведенні ендогенних катіонів через нирки.

Спостерігається збережена синтенія ОСТ1 риби даніо (20-та хромосома) з кластером ОСТ1-3 людини, який знаходиться на 6-ій хромосомі. Сусідні гени ОСТ1 збігаються з безпосереднім генним оточенням кластера людського ортолога. Тобто ОСТ1 риби даніо є ортологом до трьох білків-транспортів людини: ОСТ1, ОСТ2 і ОСТ3 [10]. Найбільша ж експресія ОСТ1 спостерігається в нирках (особливо у самок) і печінці (у самців), а також помірна експресія виявлена в мозку. Що аналогічно до експресії людських ОСТ1 та ОСТ2. Це вказує те, що ОСТ1 у рибок даніо може відігравати подібну роль, як людські ОСТ1 та ОСТ2 [59]. Цікаво також те, що ОСТ1 експресується вже на етапі пуголовка у пронефросі, в той час як ОСТ2 тільки під час дорослої стадії [60] (Таблиця 1.1).

Для визначення субстратної специфічності цих транспортів органічних катіонів були проведені дослідження з визначенням субстратів з деякими фармакологічними засобами, або ж ксенобіотиками. Експерименти з цитотоксичністю з клітинами ембріональної нирки людини (НЕК293Т), що стабільно експресують ОСТ1 риби даніо. Завдяки цим даним відомо, що структура ОСТ1 риби даніо складається з 12 трансмембранних альфа-спіралей, які утворюють активну область з більш ніж одним активним центром. Що дозволило визначити берберин, оксаліплатин і 1-метил-4-фенілпіридиній (МРР+) в якості субстратів ОСТ1 [55].

У свою чергу, ОСТ2 рибок даніо при експресії в ооцитах жаби *Xenopus* може сприяють транспорту ранітидину, пропранололу та тетраетиламонію (ТЕА), які є субстратами ОСТ2 людини. Більше того, для ОСТ2 рибок даніо було з'ясовано роль рН зовнішнього середовища. Таким чином, при рН 7 і 8 поглинання пропранололу в 100 разів більше, ніж при рН 6. Поглинання деяких же субстратів не впливає на рН (ранітидин або ТЕА) [54]. Цим вказують на субстратну специфічність ОСТ2 рибок даніо. Ці мембранні білки можуть транспортувати широкий спектр ендогенних сполук, включаючи

стероїди та стероїдні кон'югати, ксенобіотики, ліки та їхні метаболіти. І, скоріше за все, відігравати значну роль у процесах ADME у риб.

Таблиця 1.1. Переважна тканинна експресія білків-транспортів ОСТ1 і ОСТ2 [10, 60]

Білок-транспорт	Людський ортолог	Тканинна експресія	Стадія життя
ОСТ1 (<i>slc22a2</i>)	ОСТ1(<i>slc22a1</i>) ОСТ2(<i>slc22a2</i>) ОСТ3 (<i>slc22a3</i>)	Нирки (особливо у самок), печінка (самці), мозок	Пуголовок (120 hpf) і доросла особина (90 dpf)
ОСТ2 (<i>slc22a3</i>)	ОСТ3 (<i>slc22a3</i>)	Нирки, око, яєчники, селезінка, кишечник, печінка та зябра	Доросла особина (90 dpf)

Структурні та функціональні властивості і токсикологічне значення транспортів органічних катіонів рибок даніо потребують детальнішого вивчення. Особливо варто зосередити увагу на вивченні субстратної специфічності ОСТ1 і ОСТ2. Дані з цих дослідів можуть надати всебічне розуміння метаболічних процесів, токсичному впливу і особливостей процесів абсорбції і виведення ліків в ході роботи з таким модельним організмом як *Danio rerio*. А розуміння їх взаємодії з поширеними у навколишньому середовищі позитивно зарядженими ксенобіотиками, такими як метформін, дозволить більше розкрити їх механізми метаболічних змін, які вони спричиняють. Це стане в нагоді вченим, які займаються розробкою і випробуванням ліків, а також вивчають екологічну токсикологію водних середовищ.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження цієї роботи було взято транспортери органічних катіонів 1 і 2 (OCT1 і OCT2) риби даніо і їх молекулярну взаємодію із метформіном в якості ліганду. Метформін, як ксенобіотик, є субстратом до людських OCT1, OCT2 і OCT3. Які, у свою чергу виконують функцію абсорбції цього лікарського засобу в гепатоцитах (OCT1 і OCT3) і епітеліоцитах нирок (OCT2). У риби даніо OCT1 є ортологом до одразу трьох таких людських білків-переносників: OCT1, OCT2 і OCT3. Також до людського OCT3 наявний ортолог OCT2. Тобто моделювання взаємодії розраховано аналогічно до процесу транспортування метформіну в людському організмі.

2.2. Матеріали і програмні застосування

Послідовності генів, що кодують білки-транспортерів OCT1 і OCT2, були запрошені з відкритих джерел і банків даних, зокрема з NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) і ZFIN (<https://zfin.org/>). The Zebrafish Information Network (ZFIN) це база даних генетичних і геномних даних для рибок даніо (*Danio rerio*) як модельного організму із зовнішніми посиланнями на GenBank. Завдяки глобальній базі даних про білкові послідовності UniProt (<https://www.uniprot.org/>) і сайті-репозиторії про тривимірні структури білків RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) було знайдено обчислені моделі шуканих білки-транспортери. Модель була отримана у сервісі, що прогнозує просторові структури білка за допомогою штучного інтелекту AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) від DeepMind. Ліганд, а саме

тривимірна модель молекули метформіну, був взятий з PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) - найбільшого архіву хімічних сполук у вільному доступі. Ці бази даних визнані авторитетними в галузі біотехнології та геноміки і надають доступ до високоякісних генетичних послідовностей і білків.

Моделювання взаємодії ліганду з білками-транспортерами були здійснені у програмному забезпеченні для автоматичного докінгу молекул AutoDock Vina версії 1.2.0 і інструментом графічного інтерфейсу AutoDock Tools [61-62]. Аналіз даних докінгу проводилась в програмі візуалізації молекулярних структур і аналізу молекулярних даних PyMOL і BIOVIA Discovery Studio Visualizer [63-64]. З останньої були взяті проаналізовані дані з докінгу і схематичні зображення.

Графічне представлення порівняльного аналізу афінності метформіну до OCT1 і OCT2 було виконано в Origin 2023 версії 10.0.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Пошук і підготовка структур білків-транспортерів і метформіну

На початку роботи було здійснено пошук генетичних послідовностей, а саме *slc22a2* і *slc22a3*, які відповідають білкам-транспортерам OCT1 і OCT2 відповідно в базі даних про рибку даніо ZFIN. Через зовнішні посилання було визначено необхідні транскрити для обох генів у Ensemble, а через це знайдено необхідні білкові послідовності у UniProt. Пептидні послідовності у текстовому форматі FASTA були використаний для пошуку 3D-моделі у базі даних з тривимірними макромолекулами RCSB PDB з обов'язковою опцією включення моделей з обчисленою комп'ютерною структурою (CSM). Проблема полягає в тому, що більшість білків рибки даніо маловивчені, і тому не існує експериментальних структур OCT1 і OCT2, наявні тільки теоретично обґрунтовані. Сервісу для пошуку і прогнозування тривимірних

моделей білків AlphaFold було використано для завантаження файлів цільових білків-транспортерів у PDB-форматі. Файли в такому форматі зазвичай використовуються для дослідження 3D-структури білків та проведення докінгу.

У свою чергу, пошук метформіну як ліганду було здійснено в архіві хімічних сполук PubChem і завантажено у форматі SDF-файлу. SDF-файли використовуються для хімічного аналізу та віртуального скринінгу. Цей формат не підходить для проведення докінгу, тому його було конвертовано у PDB-формат у програмі для візуалізації PyMOL.

2.3.2. Проведення докінгу через AutoDock Vina

Після підготовки білків і лігандів у формі PDB-файлів можна починати працювати в пакеті програм AutoDock. В графічному інтерфейсі AutoDockTools зображались білки OCT1 і OCT2 у дві різні сесії. При зображенні кожного білку проводилась стандартна процедура оптимізації структури для збільшення точності і надійності результатів. До таких змін входило: видалення води, додавання полярних атомів водню і обчислення зарядів атомів у молекулі методом Колмана. Для OCT1 цей показник був на рівні -5.0, в той час як для OCT2 це значення становило 12.0. Що свідчить про відносно негативний заряд атомів у моделі OCT1 і високий позитивним зарядом для OCT2, що обумовлено наявністю відповідно заряджених груп і атомів.

Після оптимізації структури білка додавався ліганд і за рахунок такого інструменту як Grids було створено сітку, що являє собою просторовий об'єм навколо активного сайту. Вона визначає геометричні та енергетичні властивості активного сайту, в тому числі розташування і типи атомів, електростатичний і Ван дер Ваальсові радіуси, а також параметри взаємодії. Це і визначає центр взаємодії білка і ліганда. Розміри активного сайту встановлювали як розмір сітки просторових центрів X, Y і Z. Для першого досліджуваного білку OCT1, координати центрів становили: X: -0.244 Å,

центру Y: -1.002 Å і центру Z: 3.187 Å, в той час як для OCT2: X: -0.248 Å, центру Y: -1.53 Å і центру Z: -0.718. В двох випадках за замовчуванням була встановлена максимальна вичерпність (exhaustiveness) значенням 8.

За усіма цими значеннями і координатами було сформовано конфігураційний файл, і через командний рядок було проведено обчислення докінгу через AutoDock Vina. В якості результатів були представлені показники афінності (спорідненості) в ккал/моль метформіну до цільових білків у комплексі в 9 обрахованих позиціях. Перша позиція розглядається як найбільш енергетично оптимальна, а тому воно має найвід'ємніше значення. Крім цього, в результатах фігурує два параметри середньоквадратичного відхилення (RMSD). По-перше, це RMSD l.b., який визначає максимальне значення відстані між початковою позицією ліганду і його позицією після докінгу в межах допустимих значень. Цей параметр встановлює нижню межу. І, по-друге, це - RMSD u.b., який вказує на максимальне значення, яке є допустимим для вибору найкращого режиму (позиції) ліганду після процедури докінгу. Відповідно, це верхня межа для зміни позиції ліганду. Крім цього, на основі цих результатів докінгу були сформовані файли з вихідними даними, що стосуються розміщення метформіну. В них є інформація про найвигідніше положення ліганду в активному центрі цільового білку, енергетичні значення різних типів взаємодій, їх відстані і кутові значення та інші параметри. За усіма цими даними і проводять подальший аналіз молекулярного докінгу.

2.3.3. Візуалізація результатів докінгу

Усі ці вихідні дані було проаналізовано в таких програмах-візуалізаторах, як PyMOL і BIOVIA Discovery Studio Visualizer. За рахунок цих програм було показано взаємне розташування ліганду відносно вигину білку в оточенні ключових амінокислот, з якими він взаємодіє і типи зв'язків. Крім цього було розглянуто положення ліганду в усіх основних режимах (конформаціях) і відстань між зв'язками. Найбільш

вигідна позиція взаємодії для обох транспортерів були зображені у вигляді схем. Крім того, проведена симуляція взаємодії метформіну з білками OST1-2 протягом усіх обраних 9 позицій була наближена до прогнозованого руху молекули через трансмембранний білок. Найбільше це видно на прикладі взаємодії з OST1, через велику різницю у відстані між початковою точкою докінгу до кінцевої.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Взаємодія метформіну з транспортерами органічних катіонів риби даніо

Загалом, тема дослідження трансмембранних білків, що відіграють ключову роль у процесі транспортування речовин в клітини, є доволі малодослідженою. Власне людські транспортери органічних катіонів (ОСТ) і сьогодні представляють широкий науковий інтерес через неповну визначеність їх структурних і функціональних властивостей [65]. Що вже казати про ортологи модельних організмів, таких як *Danio rerio*. Ці ОСТ1 і ОСТ2, відповідно до людських ортологів, мають таке ж саме значення для поглинання, розподілу і кліренсу позитивно заряджених сполук. Метформін, як один із них, є еталонним препаратом для проведення досліджень. Вибір його в якості ліганду у проведенні дослідження обґрунтований його широкою популярністю як лікарського засобу і, як наслідок, великою поширеністю у навколишньому середовищі.

Дослідження спорідненості метформіну до ОСТ1 і ОСТ2 було проведено засобами комп'ютерної симуляції методом молекулярного докінгу. Результати аналізу зв'язування є суто прогнозованими (див. Додаток 2 і 3), для валідації даної моделі необхідне експериментальне підтвердження. Більше того, в базах даних тривимірних білків були доступні лише теоретичні моделі шуканих ОСТ1-2, що свідчить про відсутність експериментальної моделі. Тому значення, які розраховувались під час оптимізації структури білка для докінгу можуть мати наближений характер.

3.1.1. Комплекс ОСТ1-метформін

Вихідні дані взаємодії метформіну з ОСТ1 риби даніо вказують на велику різницю між показниками середньоквадратичного відхилення впродовж усіх 9 позиціях. Це свідчить про значні конформаційні зміни ліганду до та після докінгу, що є результатом флексибільності ліганду. Що є

притаманною ознакою білків-транспортів. Під час проведення симуляції взаємодії в PyMOL це показувало прогнозований рух молекули метформіну через трансмембранний білок OCT1 у цільову клітину.

Ключовими амінокислотами OCT1, з якими зв'язувався метформін у найбільш оптимальній позиції були: Тирозин (TYR362), Триптофан (THR444), Глутамат (GLU387 і GLU448), Серин (SER247), Фенілаланін (PHE447) і Глутамін (GLN243). На Рис. 3.1. показана взаємодія метформіну з цими амінокислотними залишками у вигині білка-транспортера з характером взаємодій водних зв'язків. У цій ділянці були виявлені такі типи зв'язків як: водневий і електростатичні взаємодії, ковалентний зв'язок і π -взаємодія (Рис. 3.2.).

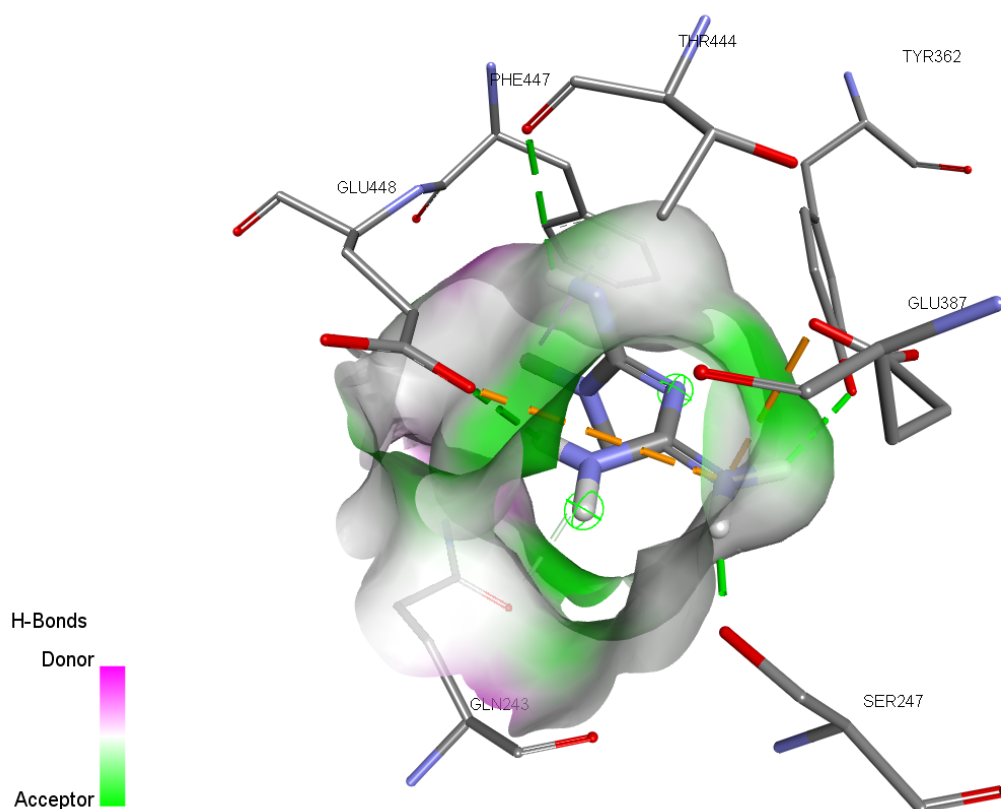


Рис. 3.1. 3D-зображення метформіну в ділянці зв'язування білку OCT1

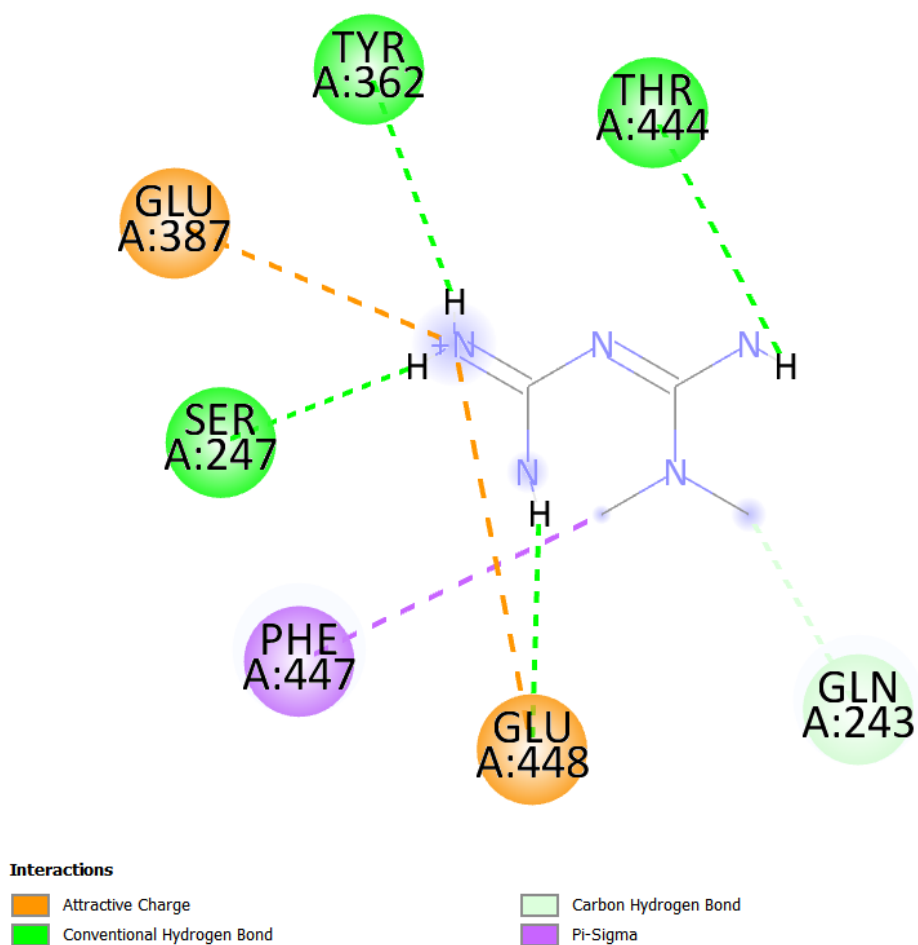


Рис. 3.2. Схема типів взаємодії метформіну з ключовими амінокислотами у активному центрі OCT1

Примітка: оранжевий колір - електростатична взаємодія;
зелений - водневий зв'язок; блідо-зелений - ковалентний зв'язок
фіолетовий - π -взаємодія.

Загалом, у взаємодії метформіну з OCT1 спостерігається стійке зв'язування, а в процесі змодельованого процесу транспортування спостерігається флексибільність ліганду на усіх 9 можливих конформаціях, що свідчить про нагромадження більше ніж одного активних центрів вздовж усього білка-транспортера [55]. Це вказує на можливість зв'язування із різноманітними субстратами і транспортувати широкий спектр речовин через мембрану. Таким чином OCT1 у риби даніо є більш функціонально гнучким

в процесах клітинного транспорту, що характеризує цей білок як поліспецифічним, об'єднуючи функції трьох людських ортологів ОСТ1-3.

3.1.2. Комплекс ОСТ2-метформін

У свою чергу, у взаємодії метформіну з ОСТ2 спостерігається консервативність у різних конформаційних положеннях. Про це свідчить про невелику середньоквадратичну різницю відстані між початковим положенням ліганду і протягом усієї взаємодії. Це характеризує комплекс ОСТ2-метформін як стабільний, а результати докінгу точними. А під час симуляції взаємодії було показано менш динамічний рух з меншою кількістю активних центрів. На Рис. 3.3. показано найбільш енергетично вигідну позицію зв'язування і разом з цим амінокислотні елементи сусідніх вигинів білку, які за рахунок низьких відстаней між собою відображаються в одному режимі докінгу.

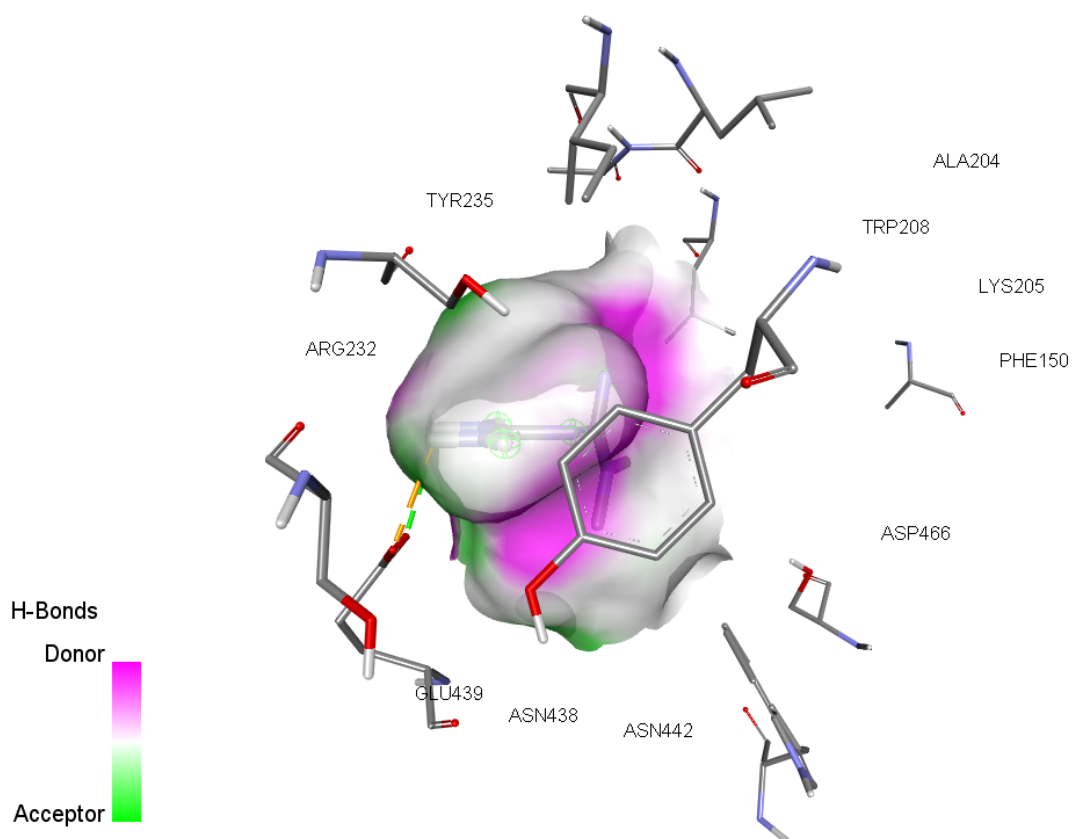


Рис. 3.3. 3D-зображення метформіну в ділянках зв'язування білку ОСТ2

Щодо типів зв'язків, то найвигідніша позиція зв'язування метформіну з ОСТ2 характеризується великою кількістю Вандерваальсівського зв'язків (Рис. 3.4.). В тому числі із амінокислотними залишками з сусідніх режимів докінгу. Серед них було представлено: серин (SER228 і SER231), тирозин (TYR212, TYR235), аргінін (ARG232), триптофан (TRP208 і TRP346) та аспарагін (ASN442). В той час як водневий зв'язок з сольовим мостом (комбінація ковалентного і йонного зв'язку) формується з глутаматом (GLU439).

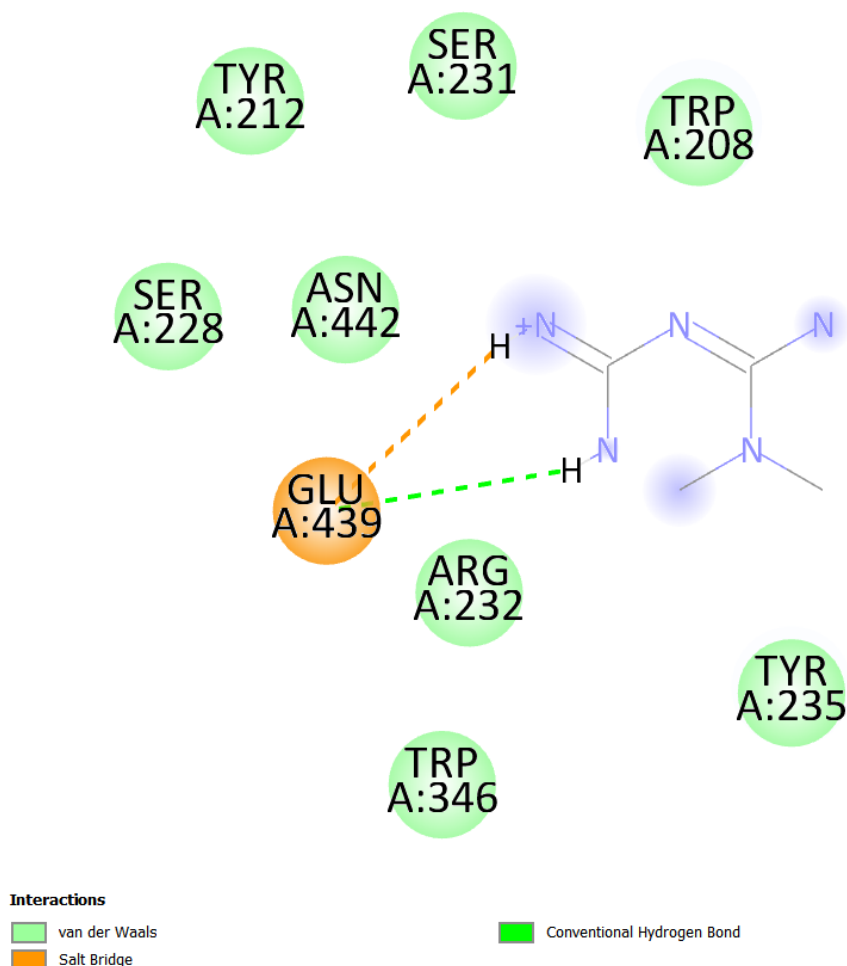


Рис. 3.4. Схема типів взаємодії метформіну з ключовими амінокислотами у активному центрі ОСТ2

Примітка: оранжевий колір - сольовий міст (ковалентний і йонний зв'язок); зелений - водневий зв'язок; світло-зелений - сили Ван дер Ваальса.

Загалом, комплекс ОСТ2-метформін виявляє більшу стабільність зв'язків і меншу кількість активних центрів на відміну від комплексу з ОСТ1. Консервативність зв'язування також обумовлюється збереженням зв'язків із амінокислотними залишками в усіх 9 обчислених конформаціях. Через своє широке поширення в тканинах і помірну експресію показує більш специфічну субстратну спорідненість в нативних умовах *in vivo*. Передбачається, що головна функція цих білків полягає у транспортуванні ендогенних катіонних сполук рибки даніо [10, 54]. До ксенобіотичних сполук, таких як метформін, прогнозується таке ж стійке зв'язування. Через це можна припустити, що ОСТ2 залучений у процесах клітинного транспорту цієї речовини, але в меншій мірі, ніж ОСТ1.

3.2. Порівняння даних докінгу метформіну з ОСТ1 і ОСТ2

Аналізуючи результати проведення докінгу можна описати певні властивості досліджуваних сполук. В якості ключових параметрів тут афінність і середньоквадратичне відхилення верхньої і нижньої межі.

Перший найстабільніший з точки зору афінності режим докінгу у випадку ОСТ1 показував значення -5.2 ккал/моль, в той час як останній, найменш стабільний - 4.0 ккал/моль. У свою чергу, ОСТ2 мала $-4,8$ ккал/моль і $-4,4$ ккал/моль відповідно. Поступове зниження показнику спорідненості до ліганда, каже про більш стабільні зв'язки комплексу ОСТ2-метформін (Рис. 3.5.).

Порівнюючи верхні (Рис. 3.6.) та нижні (Рис. 3.7.) межі значення середньоквадратичного відхилення можна помітити, що у комплексі ОСТ1-метформін спостерігається значна різниця між показниками усіх 9 режимів (конформаціях) докінгу, в той час як у випадку з ОСТ2 зв'язування характеризується невеликою розбіжністю і невеликими значеннями відстані. Ці результати свідчать про те, що зв'язування ОСТ1 супроводжується значними конформаційними змінами положення ліганду відносно усього білка-транспортера, тобто його флексибільності. Це також обумовлює менш

стабільні зв'язки комплексу, враховуючи поступове зменшення параметру афінності. У свою чергу, комплекс ОСТ2-метформін зберігає стабільність зв'язування протягом усієї процедури докінгу.

Також причиною великої різниці між параметрами середньоквадратичного відхилення у комплексі ОСТ1-метформін може бути неточність проведеної процедури докінгу. Як вже згадувалось, причиною може бути відсутність експериментальних моделей, які роблять подібні дослідження з теоретично обрахованими моделями лише прогнозуванням, яке може підтвердитись лише після валідації у дослідах *in vivo* та *in vitro*.

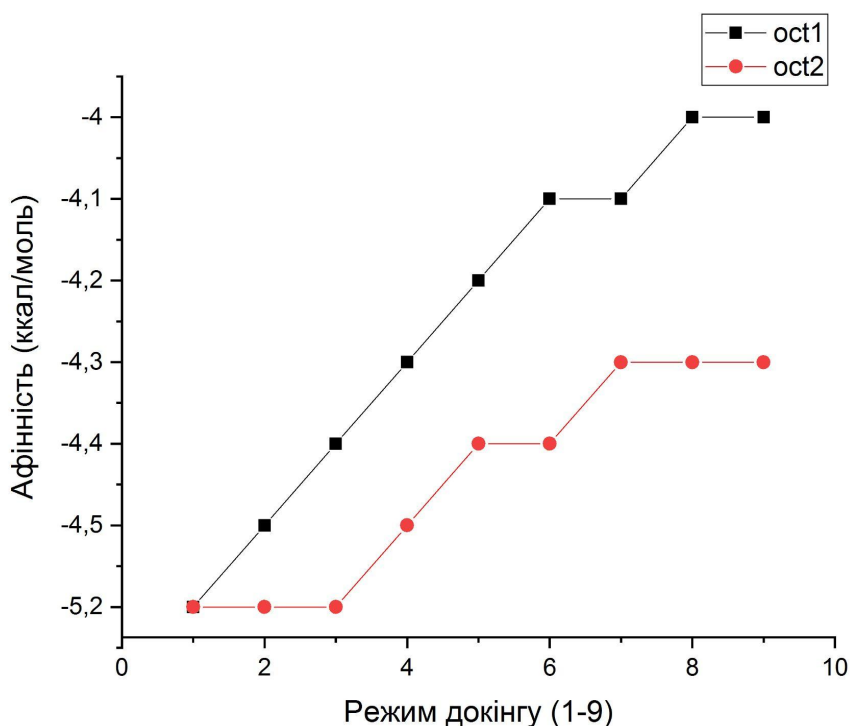


Рис.3.5. Порівняльний графік показників афінності метформіну до ОСТ1 і ОСТ2

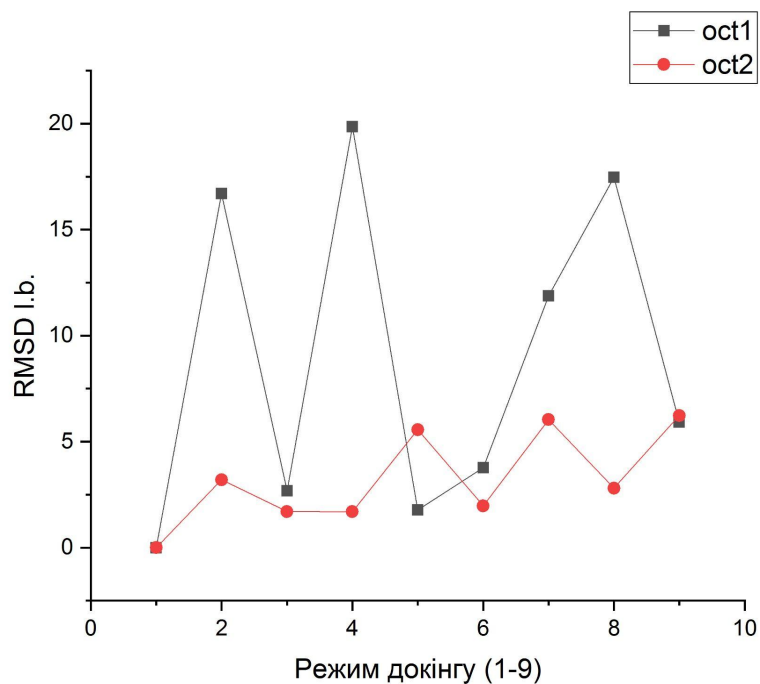


Рис. 3.6. Порівняння нижніх меж середньоквадратичного відхилення (RMSD l. b.) відстані між початковим положенням ліганду та під час докінгу

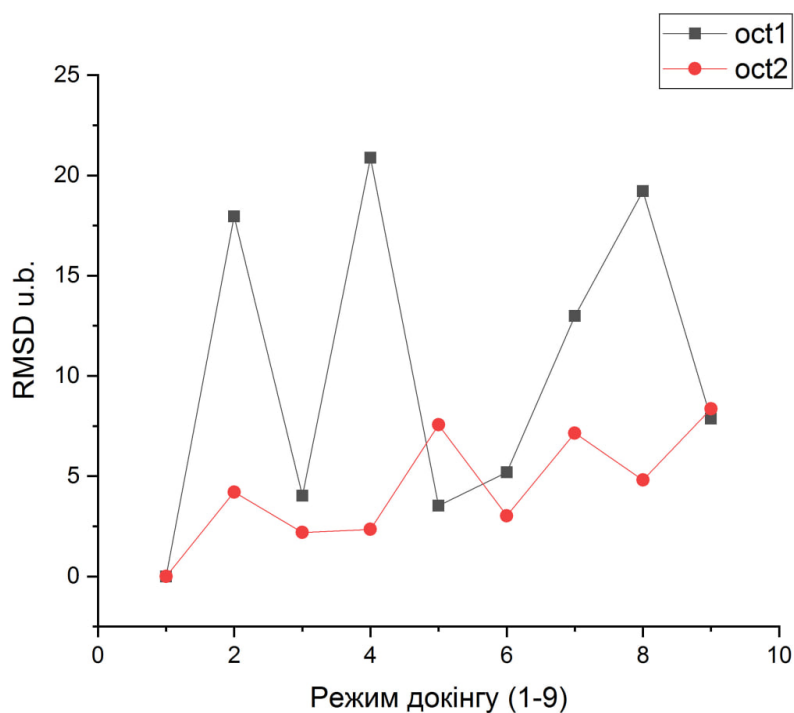


Рис. 3.7. Порівняння верхніх меж середньоквадратичного відхилення (RMSD u. b.) відстані між початковим положенням ліганду та під час докінгу

ВИСНОВКИ

В ході опрацювання матеріалу, було висвітлено сучасні дані про метформін і його впливу на водні екосистеми, а також використання модельного організму риби даніо (*Danio rerio*) у токсикологічних дослідженнях і встановлення ролі транспортерів органічних катіонів (ОСТ) в цьому. І з огляду цього, під час проведення комп'ютерного моделювання взаємодії метформіну з ОСТ1-2 методом молекулярного докінгу було встановлено:

1) Взаємодія метформіну з ОСТ1 має відносно стійку спорідненість, а білок-транспортер має субстрату поліспецифічність, яка зумовлена нагромадженням різних активних центрів по всій довжині досліджуваного білку. Також завдяки симуляції формування комплексу ОСТ1-метформін і даних про значну різницю відстані між усіма можливими конформаціями була показана гнучкість ліганду, що характерно для процесу клітинного транспорту в трансмембранних білках.

2) Комплекс ОСТ2-метформін характеризується більшою консервативністю зв'язків, їх стабільністю впродовж усієї процедури докінгу та меншою кількістю активних центрів. А через його суто помірну експресію у більшості тканин риби можна сказати, що у процесах транспортування такого ксенобіотику як метформін цей білок відіграє меншу роль, ніж більш поліспецифічний ОСТ1.

Список використаних джерел:

1. Saeedi, Pouya et al. "Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition." *Diabetes research and clinical practice* vol. 157 (2019): 107843. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
2. Zaidi, Saher et al. "The anticancer potential of metformin on prostate cancer." *Prostate cancer and prostatic diseases* vol. 22,3 (2019): 351-361. doi:10.1038/s41391-018-0085-2
3. Bahrambeigi, Saman, and Vahid Shafiei-Irannejad. "Immune-mediated anti-tumor effects of metformin; targeting metabolic reprogramming of T cells as a new possible mechanism for anti-cancer effects of metformin." *Biochemical pharmacology* vol. 174 (2020): 113787. doi:10.1016/j.bcp.2019.113787
4. Guan, Yuanyuan et al. "The Effect of Metformin on Polycystic Ovary Syndrome in Overweight Women: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *International journal of endocrinology* vol. 2020 5150684. 16 Sep. 2020, doi:10.1155/2020/5150684
5. Foretz, Marc et al. "Metformin: from mechanisms of action to therapies." *Cell metabolism* vol. 20,6 (2014): 953-66. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.018
6. Elizalde-Velázquez, Gustavo Axel et al. "Antidiabetic drug metformin disrupts the embryogenesis in zebrafish through an oxidative stress mechanism." *Chemosphere* vol. 285 (2021): 131213. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131213
7. Barros, Susana et al. "Are Fish Populations at Risk? Metformin Disrupts Zebrafish Development and Reproductive Processes at Chronic Environmentally Relevant Concentrations." *Environmental science & technology* vol. 57,2 (2023): 1049-1059. doi:10.1021/acs.est.2c05719

8. Niemuth, Nicholas J, and Rebecca D Klaper. "Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes." *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) vol. 195 (2018): 33-40. doi:10.1016/j.aquatox.2017.12.003
9. Nigam SK. The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018 Jan 6;58:663-687. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052713. PMID: 29309257; PMCID: PMC6225997.
10. Mihaljevic I, Popovic M, Zaja R, Smital T. Phylogenetic, syntenic, and tissue expression analysis of slc22 genes in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Genomics.* 2016 Aug 12;17(1):626. doi: 10.1186/s12864-016-2981-y. PMID: 27519738; PMCID: PMC4982206.
11. Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci Rep.* 2017 May 3;7(1):1461. doi: 10.1038/s41598-017-01432-w. PMID: 28469250; PMCID: PMC5431185.
12. Bailey, Clifford J. "Metformin: historical overview." *Diabetologia* vol. 60,9 (2017): 1566-1576. doi:10.1007/s00125-017-4318-z
13. Lalau, Jean-Daniel et al. "Metformin-associated lactic acidosis (MALA): Moving towards a new paradigm." *Diabetes, obesity & metabolism* vol. 19,11 (2017): 1502-1512. doi:10.1111/dom.12974
14. Whittington, Hannah J et al. "Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon." *Cardiovascular drugs and therapy* vol. 27,1 (2013): 5-16. doi:10.1007/s10557-012-6425-x
15. Viollet, Benoit et al. "Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview." *Clinical science* (London, England : 1979) vol. 122,6 (2012): 253-70. doi:10.1042/CS20110386

16. Wilcock, C, and C J Bailey. "Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse." *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* vol. 24,1 (1994): 49-57. doi:10.3109/00498259409043220
17. Koepsell, Hermann. "Update on drug-drug interaction at organic cation transporters: mechanisms, clinical impact, and proposal for advanced in vitro testing." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* vol. 17,6 (2021): 635-653. doi:10.1080/17425255.2021.1915284
18. Gong, Li et al. "Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics." *Pharmacogenetics and genomics* vol. 22,11 (2012): 820-7. doi:10.1097/FPC.0b013e3283559b22
19. Stephenne, X et al. "Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status." *Diabetologia* vol. 54,12 (2011): 3101-10. doi:10.1007/s00125-011-2311-5
20. Madiraju, Anila K et al. "Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase." *Nature* vol. 510,7506 (2014): 542-6. doi:10.1038/nature13270
21. Posselt, Malte et al. "Determination of polar organic micropollutants in surface and pore water by high-resolution sampling-direct injection-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Environmental science. Processes & impacts* vol. 20,12 (2018): 1716-1727. doi:10.1039/c8em00390d
22. Crago, Jordan et al. "Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin." *General and comparative endocrinology* vol. 232 (2016): 185-90. doi:10.1016/j.ygcen.2015.12.030
23. Lee, Jin Wuk et al. "Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition." *Journal of hazardous materials* vol. 367 (2019): 171-181. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.12.084
24. Tang, Thomas et al. "Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome,

- oligo amenorrhoea and subfertility.” The Cochrane database of systematic reviews ,5 CD003053. 16 May. 2012, doi:10.1002/14651858.CD003053.pub5
25. Jacob, Stefanie et al. “Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?.” *Environmental sciences Europe* vol. 30,1 (2018): 48. doi:10.1186/s12302-018-0179-4
 26. Ussery, Erin et al. “Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*).” *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) vol. 205 (2018): 58-65. doi:10.1016/j.aquatox.2018.10.003
 27. Scheurer, Marco et al. “Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment.” *Water research* vol. 46,15 (2012): 4790-802. doi:10.1016/j.watres.2012.06.019
 28. Haskell, Bradford D et al. “The diabetes-prone NZO/HILt strain. I. Immunophenotypic comparison to the related NZB/BINJ and NZW/LacJ strains.” *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* vol. 82,7 (2002): 833-42. doi:10.1097/01.lab.0000018915.53257.00
 29. Durham, Holiday A, and Gary E Truett. “Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats.” *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* vol. 290,3 (2006): R652-8. doi:10.1152/ajpregu.00428.2004
 30. Morris JL, Bridson TL, Alim MA, Rush CM, Rudd DM, Govan BL, Ketheesan N. Development of a diet-induced murine model of diabetes featuring cardinal metabolic and pathophysiological abnormalities of type 2 diabetes. *Biol Open*. 2016 Aug 15;5(8):1149-62. doi: 10.1242/bio.016790. PMID: 27402965; PMCID: PMC5004603.
 31. Dufrane, Denis et al. “Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity.”

- Transplantation vol. 81,1 (2006): 36-45.
doi:10.1097/01.tp.0000189712.74495.82
32. Risbud, Makarand V, and Ramesh R Bhonde. “Models of pancreatic regeneration in diabetes.” *Diabetes research and clinical practice* vol. 58,3 (2002): 155-65. doi:10.1016/s0168-8227(02)00103-1
33. Butler, Alexandra E et al. “Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes.” *Diabetes* vol. 53,6 (2004): 1509-16. doi:10.2337/diabetes.53.6.1509
34. Srinivasan, K et al. “Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening.” *Pharmacological research* vol. 52,4 (2005): 313-20. doi:10.1016/j.phrs.2005.05.004
35. de Souza Anselmo, Carina et al. “Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans?.” *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* vol. 212 (2018): 34-46. doi:10.1016/j.cbpc.2018.06.005
36. Streisinger, G et al. “Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*).” *Nature* vol. 291,5813 (1981): 293-6. doi:10.1038/291293a0
37. Diekmann, H., Hill, A., 2013. ADMETox in zebrafish. *Drug Discov. Today Dis. Model.* 10, e31–e35. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2012.02.005>
38. Howe, Kerstin et al. “The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.” *Nature* vol. 496,7446 (2013): 498-503. doi:10.1038/nature12111
39. Christian Lawrence “The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review.” *Aquaculture* vol. 269, iss.1–4, (2007): 1-20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

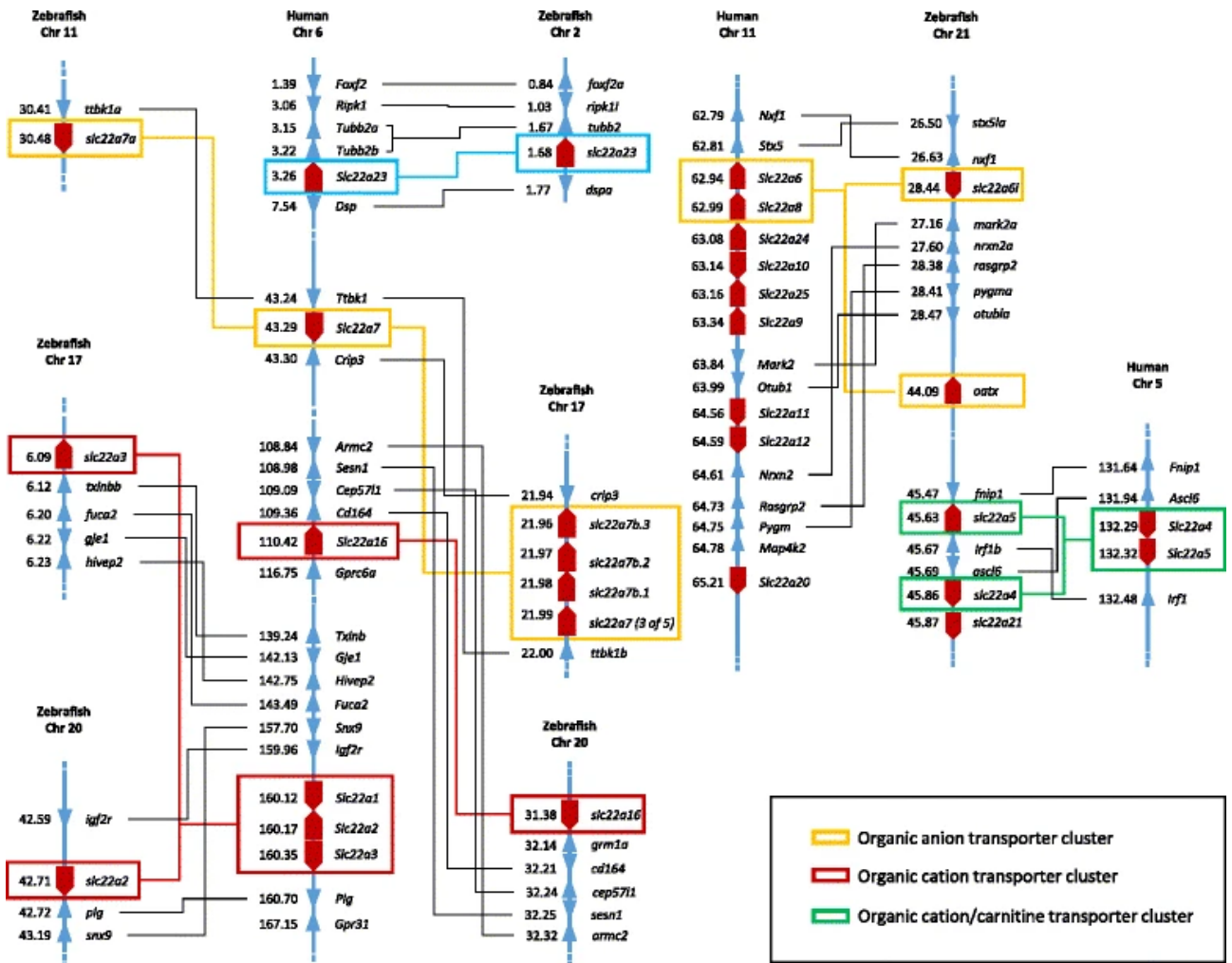
40. Shimada, Y et al. “Downregulation of Max dimerization protein 3 is involved in decreased visceral adipose tissue by inhibiting adipocyte differentiation in zebrafish and mice.” *International journal of obesity* (2005) vol. 38,8 (2014): 1053-60. doi:10.1038/ijo.2013.217
41. Stoletov, Konstantin et al. “Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish.” *Circulation research* vol. 104,8 (2009): 952-60. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.189803
42. Asaoka, Yoichi et al. “The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease.” *Disease models & mechanisms* vol. 6,4 (2013): 905-14. doi:10.1242/dmm.011981
43. Kinkel, M. D. & Prince, V. E. On the diabetic menu: zebrafish as a model for pancreas development and function. *BioEssays*31, 139–152, doi:10.1002/bies.200800123 (2009).
44. Pisharath, Harshan et al. “Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using *E. coli* nitroreductase.” *Mechanisms of development* vol. 124,3 (2007): 218-29. doi:10.1016/j.mod.2006.11.005
45. Kimmel, Robin A et al. “Diabetic *pdx1*-mutant zebrafish show conserved responses to nutrient overload and anti-glycemic treatment.” *Scientific reports* vol. 5 14241. 18 Sep. 2015, doi:10.1038/srep14241
46. Dalgin, G. & Prince, V. E. Differential levels of Neurod establish zebrafish endocrine pancreas cell fates. *Dev Biol*402, 81–97, doi:10.1016/j.ydbio.2015.03.007 (2015).
47. Ribas, L. and Piferrer, F. (2014), The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev Aquacult*, 6: 209-240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>
48. Niemuth, Nicholas J, and Rebecca D Klaper. “Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish.” *Chemosphere* vol. 135 (2015): 38-45. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.060

49. Calabrese, Edward J, and Mark P Mattson. "How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?." *NPJ aging and mechanisms of disease* vol. 3 13. 15 Sep. 2017, doi:10.1038/s41514-017-0013-z
50. Weigt, Stefan et al. "Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens." *Toxicology* vol. 281,1-3 (2011): 25-36. doi:10.1016/j.tox.2011.01.004
51. Lončar, Jovica et al. "The first characterization of multidrug and toxin extrusion (MATE/SLC47) proteins in zebrafish (*Danio rerio*)." *Scientific reports* vol. 6 28937. 30 Jun. 2016, doi:10.1038/srep28937
52. Lončar, Jovica, and Tvrtko Smital. "Interaction of environmental contaminants with zebrafish (*Danio rerio*) multidrug and toxin extrusion protein 7 (*Mate7/Slc47a7*)." *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* vol. 205 (2018): 193-203. doi:10.1016/j.aquatox.2018.10.016
53. Dragojević, Jelena et al. "Environmental contaminants modulate transport activity of zebrafish organic anion transporters *Oat1* and *Oat3*." *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* vol. 231 (2020): 108742. doi:10.1016/j.cbpc.2020.108742
54. Chang, Elisabeth D et al. "Active Pharmaceutical Ingredient Uptake by Zebrafish (*Danio rerio*) *Oct2 (slc22a2)* Transporter Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes." *Environmental toxicology and chemistry* vol. 41,12 (2022): 2993-2998. doi:10.1002/etc.5480
55. Mihaljević, Ivan et al. "Interaction between the zebrafish (*Danio rerio*) organic cation transporter 1 (*Oct1*) and endo- and xenobiotics." *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* vol. 187 (2017): 18-28. doi:10.1016/j.aquatox.2017.03.012
56. Stott, Lucy C et al. "A primary fish gill cell culture model to assess pharmaceutical uptake and efflux: evidence for passive and facilitated transport." *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* vol. 159 (2015): 127-37. doi:10.1016/j.aquatox.2014.12.007

57. Zhang, Tao et al. “Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition.” *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* vol. 36,7 (2008): 1300-7. doi:10.1124/dmd.108.021121
58. Urikami Y, Okuda M, Saito H, Inui K. Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett.* 2000;473:173–6.
59. Koepsell, Hermann. “Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters.” *Biological chemistry* vol. 392,1-2 (2011): 95-101. doi:10.1515/BC.2011.009
60. Thisse, Bernard et al. “Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening.” *Methods in cell biology* vol. 77 (2004): 505-19. doi:10.1016/s0091-679x(04)77027-2
61. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461
62. J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, and S. Forli. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
63. Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). PyMOL. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>
64. BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5 (Dassault Systèmes, 2021)
65. Suo, Yang et al. “Molecular basis of polyspecific drug binding and transport by OCT1 and OCT2.” *bioRxiv : the preprint server for biology* 2023.03.15.532610. 16 Mar. 2023, doi:10.1101/2023.03.15.532610. Preprint.

ДОДАТКИ

Додаток 1



Аналіз синтенії генів *slc22* людини та рибок данію [10]

Примітка: Червоним позначені ортологічні зв'язки транспортерів органічних катіонів (ОСТ)

Результати докінгу комплексу OCT1-метформін

Позиція (конформація)	Афінність (ккал/моль)	Дистанція від RMSD l.b.	Найкраща позиція RMSD u.b.
1	-5.2	0	0
2	-4.5	16.708	17.949
3	-4.4	2.680	4.025
4	-4.3	19.857	20.873
5	-4.2	1.781	3.520
6	-4.1	3.778	5.187
7	-4.1	11.883	12.984
8	-4.0	17.465	19.220
9	-4.0	5.917	7.865

Результати докінгу комплексу OCT2-метформін

Позиція (конформація)	Афінність (ккал/моль)	Дистанція від RMSD l.b.	Найкраща позиція RMSD u.b.
1	-4.8	0	0
2	-4.8	3.201	4.210
3	-4.8	1.701	2.193
4	-4.7	1.694	2.346
5	-4.5	5.561	7.565

6	-4.5	1.971	3.025
7	-4.4	6.036	7.153
8	-4.4	2.806	4.806
9	-4.4	6.233	8.353