

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**Активність ензимів поліольного шляху у нирках щурів за умов
різного забезпечення раціону нутрієнтами**

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка VI курсу, групи 600-М
спеціальності 091-біологія
освітня програма – біохімія та
лабораторна діагностика
ЛЮБОМИРА ВАДИМІВНА МОЛДОВАН

Керівник: к.б.н., доц. О. М. Волощук

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____
від „ ____ ” _____ 2022 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці, 2022

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню активності ензимів поліольного шляху, а також інтенсивності вільнорадикальних процесів у цитозольній та мітохондріальній фракціях нирок щурів за умов різного забезпечення раціону нутрієнтами.

Встановлено, що у цитозольній фракції нирок щурів, які споживали високосахарозний раціон, спостерігається максимально виражене підвищення альдозоредуктазної та сорбітолдегідрогеназної активностей. При цьому за досліджуваних умов нами зафіксована інтенсифікація генерації $O_2^{\cdot-}$ та $\bullet OH$, підвищення вмісту ТБК-активних продуктів та білкових карбонільних похідних на тлі зниження вмісту вільних SH-груп.

Показано, що у цитозольній фракції нирок тварин, які отримували надмірну кількість сахарози на тлі нестачі харчового протеїну, активність альдозоредуктази та сорбітолдегідрогенази достовірно не відрізняється від показників групи ВС. Натомість за даних експериментальних умов зафіксована максимальна інтенсифікація вільнорадикальних процесів, зокрема спостерігається посилена генерація $O_2^{\cdot-}$ та $\bullet OH$, накопичення вторинних продуктів ПОЛ та білкових карбоніл-дериватів на тлі зменшення вмісту вільних тіолових груп.

Отже, максимальна активація ензимів поліольного шляху, інтенсифікація продукування супероксидного та гідроксильного радикалів, накопичення вторинних продуктів ПОЛ та окисної модифікації протеїнів спостерігається у нирках тварин за умов споживання високосахарозної дієти на тлі аліментарної депривації протеїну. Отримані результати можуть розглядатися як передумови для поглиблення метаболічних порушень у нирках за умов нутрієнтного дисбалансу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цитозольна фракція, альдозоредуктаза, сорбітолдегідрогеназа, АФК, нутрієнтний дисбаланс

ABSTRACT

The master's work is devoted to the study of the activity of enzymes of the polyol pathway, as well as the intensity of free-radical processes in the cytosolic and mitochondrial fractions of the kidneys of rats under conditions of various nutrition.

It was found that in the cytosolic fraction of the kidneys of rats that consumed a high-sucrose diet, there is a maximal increase in aldose reductase and sorbitol dehydrogenase activities. At the same time, under the studied conditions, we recorded intensification of generation of $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$, an increase in the content of TBA-active products and protein carbonyl derivatives against the background of a decrease in the content of free SH groups.

It was shown that in the cytosolic fraction of the kidneys of animals receiving excessive amounts of sucrose against the background of a lack of food protein, the activity of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase does not significantly differ from the indicators of the HS group. Instead, under these experimental conditions, the maximum intensification of free radical processes is recorded, in particular, there is an increased generation of $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$, the accumulation of secondary products of lipid peroxidation and protein carbonyl derivatives against the background of adhesion of the content of free thiol groups.

Therefore, maximum activation of polyol pathway enzymes, intensification of superoxide and hydroxyl radical production, accumulation of secondary products of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins is observed in animal kidneys under conditions of consumption of a high-sucrose diet against the background of alimental protein deprivation. The results can be considered as prerequisites for deepening metabolic disorders in the kidneys under conditions of nutrient imbalance.

KEYWORDS: cytosolic fraction, aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, ROS, nutrient imbalance

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Особливості метаболічних процесів в організмі щурів за умов нутрієнтного дисбалансу.....	7
1.2. Біологічна роль та шляхи продукування активних форм кисню.....	9
1.3. Механізми вільнорадикального ушкодження біомолекул.....	14
1.4. Особливості будови та функціонування альдозоредуктази як ензиму поліольного шляху.....	22
1.5. Особливості структурно-функціональної організації сорбітолдегідрогенази як ензиму поліольного шляху.....	25
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	28
2.1. Об'єкти та методи дослідження.....	28
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	34
3.1. Активність ензимів поліольного шляху у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами.....	34
3.2. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами.....	45
ВИСНОВКИ.....	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	53
ДОДАТКИ.....	65

ВСТУП

Упродовж останніх років питання виникнення метаболічних порушень за умов надлишку або дефіциту окремих нутрієнтів у харчовому раціоні залишається відкритим. Показано, що аліментарний дефіцит протеїну може зумовлювати виснаження пулу есенціальних амінокислот, що супроводжується виникненням негативного азотистого балансу, дисбалансом прооксидантної/антиоксидантної систем, водно-електролітного стану клітин, порушенням енергозабезпечення [1, 2]. При цьому раціон із надмірним вмістом вуглеводів відомий своїми каріогенними ефектами, розвитком ожиріння, цукрового діабету II типу, резистентності до інсуліну і раку [3, 4]. Так, довготривале споживання раціону, який містить понад 50% вуглеводів, сприяє розвитку протеїнурії, жирової дистрофії гепатоцитів, фіброзу, гломерулосклерозу та інших патологічних станів [5]. Відомо, що негативними факторами також може бути дерегуляція різних шляхів утилізації глюкози і окислювальний стрес, внаслідок чого виникає окисно-відновний дисбаланс в клітинах організму [6, 7].

Недавні дослідження показали [8], що активація вільнорадикальних процесів за умов гіперглікемії пов'язана з посиленням утворенням спирту сорбітолу внаслідок активації альтернативного шляху метаболізму глюкози – поліольного шляху. На першому етапі глюкоза перетворюється на сорбітол за участі ензиму альдозоредуктази (ALR2, EC 1.1.1.21) з одночасним окисненням NADPH до NADP^+ , на другому – трансформація сорбітолу до фруктози та відновлення NAD^+ до NADH за дії сорбітолдегідрогенази (SDH, EC 1.1.1.14) [9]. Показано, що надмірна активація ензимів поліольного шляху може зменшити співвідношення $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, наслідком чого може бути зниження активності низки NADPH-залежних ензимів, зокрема синтази оксиду азоту та глутатіонредуктази, що буде супроводжуватися порушенням регенерації відновленого глутатіону (GSH). У свою чергу, це може бути однією із причин індукції внутрішньоклітинного окисного стресу. Внаслідок надмірної активації альдозоредуктази може спостерігатись накопичення сорбітолу, що

призводить до набухання клітин, підвищення їх осмолярності та розвитку осмотичного дисбалансу. До того ж, за умов надмірної активації сорбітолдегідрогенази буде спостерігатись збільшення внутрішньоклітинного вмісту фруктози, яка бере участь у глікації білків. У свою чергу, активація поліольного шляху також супроводжується збільшенням співвідношення NADH/NAD^+ , що сприяє розвитку окисно-відновного дисбалансу, і, як наслідок, поглиблення окисного стресу [9].

Тому **метою** роботи стало дослідження активності ензимів поліольного шляху, а також інтенсивності вільнорадикальних процесів у мітохондріях та цитозолі нирок щурів за умов різного забезпечення раціону нутрієнтами.

Для досягнення мети були поставлені **завдання**:

1. Визначити альдозоредуктазну (ЕС 1.1.1.21) та сорбітолдегідрогеназну (ЕС 1.1.1.14) активності у цитозольній фракції нирок щурів за умов нутрієнтного дисбалансу.

2. Дослідити інтенсивність генерації супероксид-аніон радикалу та гідроксильного радикалу в мітохондріальній і цитозольній фракціях нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону протеїном та сахарозою.

3. Визначити вміст протеїнових SH-груп, карбоніл-дериватів як біохімічних маркерів окисної модифікації білків та ТБК-активних продуктів як маркерів пероксидного окислення ліпідів у мітохондріях та цитозолі нирок щурів за умов різного забезпечення раціону нутрієнтами.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості метаболічних процесів в організмі щурів за умов нутрієнтного дисбалансу

Нині питання механізмів порушень процесів метаболізму за умов нутрієнтного дисбалансу при дефіциті або надлишку певних мікро- та/або макронутрієнтів, залишається актуальним. Зокрема, за останнє десятиріччя зібрано велику кількість експериментальних досліджень, які підтверджують порушення основних процесів життєдіяльності, наприклад, зміни функціонування імунної, енергетичної системи, порушення водно-електролітного балансу, нервової регуляції, функціональної активності м'язів, організації кісткової тканини та механізмів її регенерації, дисфункцію системи травлення та інших органів і систем за умов дефіциту макронутрієнтів (білків, вуглеводів та жирів). За умов нестачі мікронутрієнтів в організмі також можуть розвиватись метаболічні порушення [10].

Відомо, що протеїни вважаються найціннішими макронутрієнтами, які виконують низку життєво важливих функцій: структурну, захисну, каталітичну, транспортну, регуляторну, виступають джерелом енергії тощо. Нестача білкової їжі може викликати дефіцит нітрогену, що супроводжується посиленням розпадом власних протеїнів організму, наслідком чого буде зниження маси м'язової та жирової тканини [11, 12].

Цікаво, що за умов обмеженого надходження в організм харчового протеїну, метаболічні процеси здатні адаптуватись задля збереження енергії та життєво необхідних субстратів за рахунок використання власних резервів, активуючи гіперкатаболічні процеси. Даний синдром супроводжується нерівномірним розподілом між реакціями анаболізму та катаболізму, що буде призводити до розпаду макромолекул організму та поетапного відключення певних енергозатратних реакцій [13]. У літературі [14] показано, що внаслідок протеїнового голодування в організмі можуть виникати порушення низки процесів, зокрема дезамінування, переамінування, фосфорилування

амінокислот, синтезу сечовини, глікогену, окислення кето- та дикарбонових кислот тощо.

Важливою діагностичною ознакою аліментарної білкової недостатності є зміна концентрації білків плазми крові, оскільки відомо, що нестача протеїну може компенсуватись альбумінами та глобулінами (А/Г). В нормі співвідношення А/Г складає 1,2-2, проте за умов нестачі харчового білка даний показник зменшується, що є основною причиною зниження онкотичного тиску та порушення співвідношення солей крові [15]. Окрім альбумінів та глобулінів, у плазмі крові також знижується рівень транспортних білків, зокрема трансферину, церулоплазміну та ретинолзв'язуючого протеїну; зменшується вміст фібриногену та більшості факторів згортання крові [12]. До того ж, змінюється спорідненість O_2 до гемоглобіну, оскільки знижується вміст гемоглобіну [15].

В літературі [10] показано, що довготривале споживання раціону з дефіцитом протеїну має негативний вплив на психічний стан людини, призводить до набряків, зменшення маси тіла, затримки росту, ожиріння печінки, зниження імунного захисту організму тощо. Характерною хворобою є незбалансована форма аліментарної дистрофії – квашиоркор. Окрім того, нестача протеїну в харчовому раціоні призводить до порушення функціональної активності ензимів, які відповідають за підтримку антиоксидантного захисту клітин, що може призвести до посиленої генерації АФК та розвитку окисного стресу [14].

Водночас вуглеводи є не менш важливими макронутрієнтами у харчовому раціоні, оскільки виконують низку життєво важливих функцій, зокрема підтримку енергетичного стану клітин та синтез більшості вуглеводовмісних біополімерів – гліколіпідів, глікопротеїнів та протеогліканів [16]. В літературі [3] показано, що надмірне споживання вуглеводів може сприяти розвитку інсулінорезистентності, цукрового діабету II типу, карієсу, ожиріння і раку. Також є підтверджені дані, які свідчать про виникнення

неалкогольної жирової хвороби печінки за умов надлишкового споживання простих вуглеводів [17].

Під час метаболічних перетворень глюкози та фруктози в печінці утворюються проміжні сполуки (інтермедіати), які активують фактор транскрипції ChREBP, що в кінцевому результаті призводить до експресії матричної РНК ліпогенних генів. Окрім ожиріння, високосахарозна дієта призводить до різних ендокринних та метаболічних порушень, зокрема до інсулінемії, гіперліпідемії, непереносимості глюкози тощо [18]. Цікаво, що при ожирінні можуть продукуватись загальні печінкові та системні цитокіни, основною функцією яких є активація внутрішньоклітинних кіназ, які відповідають за пригнічення сигнального шляху інсуліну. В подальшому це фізіологічне порушення призводить до розвитку інсулінорезистентності [19].

Згідно наукового джерела [19], за умов надлишкового споживання вуглеводів також можливе накопичення триацилгліцеролів. Таким чином, гіпертриацилгліцеронемія разом з високою концентрацією вільних жирних кислот можуть призводити до пошкодження нирок, зокрема викликати дисфункцію мітохондрій за умов посиленої емісії АФК та ліпотоксичність, в основі чого лежить зміна фосфоліпідного шару мембран [20]. Поряд з тим, порушення метаболічних процесів, які розвиваються за участі АФК при споживанні надмірної кількості сахарози, лежать в основі розвитку патологічних станів організму [19]. За таких умов порушення співвідношення прооксидантної/антиоксидантної систем буде визначальним фактором для розвитку окисного стресу та окисно-відновних відхилень. Найчутливішими органами до зміни швидкості окисно-відновного стану є нирки, серце, підшлункова залоза та печінка [3]. Так, при цукровому діабеті гіперглікемія може викликати ниркові ускладнення, передуючи дисфункції нирок [21].

1.2. Біологічна роль та шляхи продукування активних форм кисню

У всіх аеробних організмах активні форми кисню (АФК) безпосередньо (як мутагени) або опосередковано (як посередники та регулятори) впливають на всі компоненти клітин. Проте дисбаланс у швидкості генерації АФК може

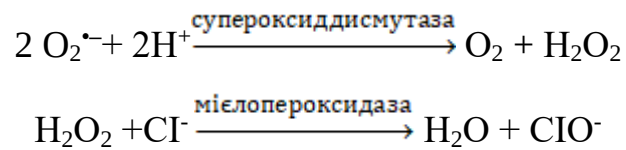
викликати не тільки геномні мутації, а й призводити до виникнення необоротної окисної модифікації білків, ліпідів та гліканів, що погіршує їхню функцію та сприяє ушкодженню або загибелі клітин [21]. І навпаки, АФК у невеликих кількостях відіграють важливу роль як окисно-відновні сигнальні молекули в широкому спектрі шляхів, що беруть участь у підтримці клітинного гомеостазу (MAPK/ERK, PTK/PTP, PI3K-AKT-mTOR), регуляції ключових транскрипційних факторів (NFκB/IκB, Nrf2/KEAP1, AP-1, p53, HIF-1), контролюючи різноманітні клітинні функції, включаючи проліферацію, диференціацію та апоптоз [22].

Поряд з тим, внутрішньоклітинна генерація АФК та їх локальний окисно-відновний статус є специфічними ознаками при дослідженні патофізіології клітин. Показано, що рівень АФК відрізняється між субклітинними компартментами, створюючи сприятливі ефекти для протікання метаболічних процесів або індукуючи різні ушкодження [22].

Відомо, що основним джерелом АФК *in vivo* є аеробне дихання. Тим не менш, АФК також виробляються у процесі пероксисомального β-окислення жирних кислот, функціонуванні мікросомальної системи цитохрому Р-450, метаболізму ксенобіотичних сполук, стимуляції фагоцитозу патогенами або ліпополісахаридами, метаболізму аргініну та тканиноспецифічних клітинних ферментів [22].

В літературі [23] показано, що утворення АФК починається з активації цитоплазматичного ферменту NADPH-оксидази за участі ростових факторів та цитокінів (INF-γ, TNF-β, IL-1β), яка генерує супероксид-аніон радикал і H₂O₂. Відомо, що даний фермент прискорює відновлення кисню, оскільки приймає відновлений еквівалент від NADPH. Експресія NADPH-оксидази характерна для багатьох типів клітин, зокрема найбільш виражена функція ензиму у фагоцитах, ендотеліоцитах, хондроцитах та астроцитах. Цікаво, що внаслідок активації NADPH-оксидази в 1 клітині може генеруватись понад 200 млн молекул O₂^{•-} за 1 с. Проте супероксид не володіє антимікробними властивостями, і тому за участю різних ферментів (супероксиддисмутази,

мієлопероксидази) може перетворюватись на пероксид водню (H_2O_2) або реакційноздатний гіпохлорит (ClO^-):



Ще одним джерелом АФК вважаються мітохондрії, при цьому на них припадає понад 90% всього кисню в клітині [22]. Відомо, що електронний транспорт у комплексах I, III та IV поєднується з переміщенням протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану з матриксу в міжмембранний простір, цим самим створюючи мембранний потенціал $\Delta\Psi_m$ і градієнт рН ΔpH_m (переважно $\Delta\Psi_m$), які використовуються комплексом V (АТФ-синтаза) для виробництва АТФ з АДФ і фосфату, при цьому додатково генеруючи АФК [24].

Першим місцем надходження електронів у дихальний ланцюг є I комплекс *NADH:убіхіноноксидоредуктаза* [25], яка каталізує перенесення електрону від NADH до убіхінону з переміщенням протонів через мітохондріальну мембрану, сприяючи рушійній силі протонів. Зокрема в літературі [25] показано, що FMN, первинний акцептор електронів і місце окислення NADH, каталізує побічну реакцію виробництва АФК [26].

Убіхінон-цитохром c оксидоредуктаза (комплекс III, цитохром bc_1) – ключовий компонент ланцюга транспортування електронів від I та II комплексів у більшості бактерій і мітохондрій, відповідає за відновлення убіхінолом цитохрому c [26]. Наслідком роботи даного каталітичного механізму (відомого як Q-цикл) може бути ризик виникнення побічних реакцій, що призводять до утворення АФК, зокрема супероксидного аніон-радикалу ($\text{O}_2^{\bullet-}$), утворення якого посилюється в присутності антимицину [26, 27].

Окрім комплексів ЕТЛ, існують інші мітохондріальні ферменти, які здатні генерувати АФК. До них належать аконітаза, α -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс, α -гліцерофосфатдегідрогеназа, дигідрооратдегідрогеназа та сукцинатдегідрогеназа, які продукують пероксид водню, в той час як ензими моноаміноксидаза (MAO) та цитохром b5 редуктаза продукують $\text{O}_2^{\bullet-}$ [28].

Аконітаза (ЕС 4.2.1.3) – фермент, що містить залізо-сірчаний кластер, каталізує оборотну стереоспецифічну ізомеризацію цитрату в ізоцитрат за допомогою *цис*-аконітату як проміжного продукту без окисно-відновної дії. Основна роль мітохондріальної форми ензиму, як вважають, полягає в контролі клітинного виробництва супероксиду за допомогою регулювання проміжного потоку в циклі Кребса [29]. Не менш важливим місцем утворення АФК є α -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс (α -KGDC), який каталізує перетворення α -кетоглутарату в сукциніл-СоА, використовуючи в якості кофактора похідне вітаміну В₁. Проте в літературі [30] показано, що дигідроліпоаміддегідрогеназа (Е₃) – третій ензим α -KGDC, може брати участь у генерації АФК, зокрема $O_2^{\cdot-}$ та H_2O_2 , підвищення рівня яких може знижувати або повністю пригнічувати функцію комплексу.

Необхідно зауважити, що пероксид водню також може генеруватись за допомогою флавіновмісної α -гліцерофосфатдегідрогенази, яка каталізує реакцію окислення α -гліцерофосфату до дигідроксиацетонфосфату за допомогою акцептора електронів, у ролі якого виступає мітохондріальний убіхінон [31]. Окрім того, *дигідрооротатдегідрогеназа* (ЕС 1.3.5.2) – флавінзалежний мітохондріальний фермент, який каталізує реакцію окислення дигідрооротату в оротат [32], також може генерувати $O_2^{\cdot-}$ та пероксид водню.

Ще одним ензимом, який здатен генерувати АФК, є *сукцинатдегідрогеназа* (Комплекс II). Недавні дослідження показали, що даний ензим може суттєво сприяти загальному виробленню мітохондріальних АФК, зокрема $O_2^{\cdot-}$ та H_2O_2 [33]. Причиною утворення АФК може також слугувати неправильно зібраний або пошкоджений II комплекс за умов відкриття FeS кластерів або зменшення вмісту FAD [34].

Одним із найважливіших джерел АФК у мітохондріях є дезамінування моноамінів, яке каталізує фермент *моноаміноксидаза* (MAO-A, MAO-B, КФ 1.11.1.7) [35]. В процесі окислювального дезамінування моноамінів за рахунок регенерації молекулярним киснем окисленої простетичної групи FAD одночасно генерується H_2O_2 [35, 36].

Крім того, джерелом АФК на зовнішній мембрані мітохондрій слугує *NADH-цитохром b_5 -редуктаза* (CYB5R) – флавопротеїн, який каталізує реакцію відновлення цитохрому b_5 , використовуючи при цьому відновлений NADH як донор електронів [37]. У науковій літературі [37] повідомляється, що неефективне перенесення CYB5R електронів до редокс-акцепторів може призвести до роз'єднання і утворення АФК, зокрема супероксид-аніон радикалу.

Вважається, що окисно-відновні ензими збираються в «окисно-відновний трикутник», утворений мітохондріями, пероксисомами та ендоплазматичним ретикулумом, збираючи «редоксосоми» (рис. 1), які чутливі до окисно-відновного дисбалансу [38]. Зокрема, мікросомальна цитохром Р-450-залежна монооксигеназна система, відповідальна за окислювальний метаболізм ксенобіотиків, є одним з основних генераторів АФК у клітинах організму [38]. Ензими цитохрому Р-450 здатні каталізувати оксигенацію органічного субстрату та одночасне відновлення молекулярного кисню. При цьому важливим є контроль передачі кисню до субстрату, оскільки може відбуватись роз'єднання та подальша генерація АФК, таких як $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 та $\cdot OH$ [39].

Цікаво, що після приєднання ферменту до субстрату на першій стадії монооксигеназного каталітичного циклу цитохрому Р-450, ензим додатково зв'язується з однією молекулою O_2 , утворюючи оксикомплекс, при якому можлива генерація супероксид-аніон радикалу. Проте після перетворення оксиду до пероксикомплексу, який за допомогою двох протонів утворює H_2O , додатково може генеруватись H_2O_2 [40]. Пероксид водню в подальшому може ініціювати реакцію Фентона за наявності іонів металів змінної валентності, продукуючи $\cdot OH$:



АФК можуть генеруватись як побічні продукти за допомогою *ксантиноксидази* (ХО). Цей ензим каталізує реакцію окислення гіпоксантину та ксантину до сечової кислоти, при цьому може каталізувати перенесення електронів до O_2 , генеруючи супероксид та пероксид водню.

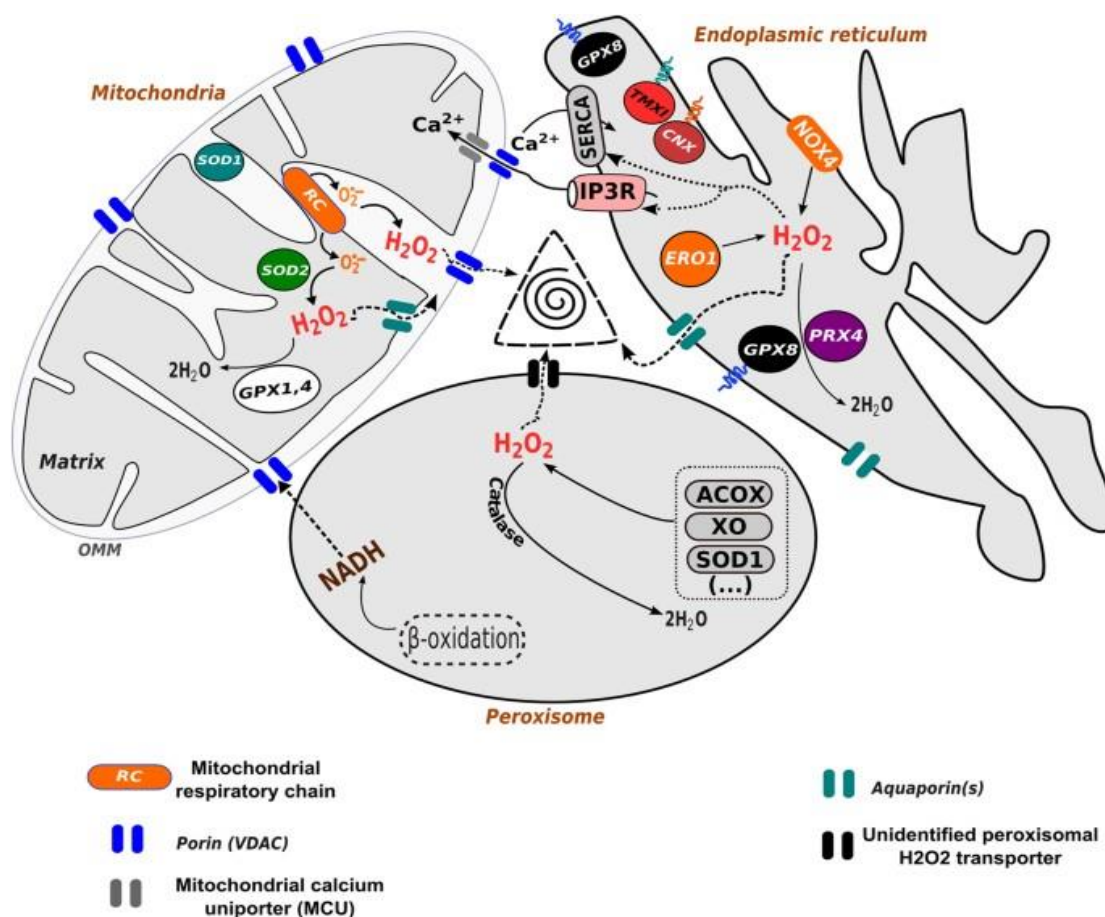


Рис. 1. «Окисно-відновний трикутник» із трьома редокс-чутливими органелами

Тому глибоке знання молекулярних механізмів активації генерації АФК та їх впливу в стаціонарних і стресових умовах може лежати в основі розробки нових терапевтичних заходів [22, 41].

1.3. Механізми вільнорадикального ушкодження біомолекул

Активні форми кисню (АФК) в нормі продукуються за фізіологічних процесів і відіграють важливу роль у клітинній передачі сигналів та гомеостазі тканин [42]. Однак їх надлишок може викликати несприятливі модифікації клітинних компонентів, зокрема пошкодження ліпідів, білків і ДНК [43, 44]. Клітинні мембрани або мембрани органел через високий вміст поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) особливо чутливі до пошкодження АФК, яке називається «пероксидним окисленням ліпідів» [45], що відіграє вирішальну роль у загибелі клітин, включаючи апоптоз, аутофагію та фероптоз [46]. Зокрема, в літературі [47] показано, що генерація АФК в біомембранах дуже висока через розчинність молекулярного кисню. При цьому мембранні

фосфоліпіди, що містять високі рівні ПНЖК, надзвичайно чутливі до атак АФК. Більше того, самі ПНЖК перетворюються на реакційноздатні вільні радикали після реакції з АФК, які здатні поширювати ланцюгові реакції пероксидного окислення ліпідів [48].

Пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ) – це процес, у якому вільні радикали, такі як окисильні, пероксильні та гідроксильні радикали, видаляють електрони з ліпідів і згодом утворюють реакційноздатні проміжні продукти, які можуть вступати у подальші реакції. Внаслідок процесів ПОЛ можуть пошкоджуватися фосфоліпіди, а також активуватись запрограмована клітинна смерть. Окиснені фосфоліпіди також можуть відігравати важливу роль у багатьох запальних захворюваннях і часто опосередковують прозапальні зміни [45]. Нещодавно було виявлено, що фероптоз – нова форма запрограмованої клітинної смерті, спричинена саме процесами пероксидного окислення ліпідів [49], що підкреслює особливість ПОЛ під час фізіологічного процесу загибелі клітин.

В літературі [50] показано, що продукти ланцюгових реакцій ПОЛ виявляють високу біологічну активність – руйнують ДНК, білки та інактивують ферменти, а також активують сигнальні шляхи, що ініціюють загибель клітин [51]. Важливим є те, що всі біомембрани в організмі чутливі до пероксидного окислення ліпідів, яке може відбуватися двома шляхами: ферментативним і неферментативним.

Неферментативним шляхом, який також називають «неферментативним фосфоліпідним (PL) автоокисленням», є залізо залежне пероксидне окислення ліпідів, що складається з трьох стадій: ініціювання – поліненасичений ацильний ланцюг RH окислюється з утворенням $R^\bullet$ шляхом втрати водню з подальшим утворенням гідроксилу ($^\bullet OH$); подовження – $R^\bullet$ легко реагує з молекулярним киснем з утворенням пероксильного радикала ($R-OO^\bullet$) [52], та обриву ланцюга – два радикали ланцюгової реакції реагують один з одним, утворюючи стабільні молекули [53].

Ферментативне пероксидне окислення каталізується ліпоксигеназою (LOX), яка також може брати участь в утворенні R-ООН [54]. Зокрема арахідонова (C20:4) і лінолева (C18:2) є найпоширенішими полієновими жирними кислотами, які слугують субстратами для LOX, використовуючи молекулярний кисень для утворення гідропероксильних груп у різних вуглецевих позиціях ацильних ланцюгів [55].

Білки також можуть пошкоджуватись за умов окислювального стресу, зазнаючи конформаційних модифікацій, які здатні призводити до втрати або порушення їх функціональної активності [56]. Було підраховано [56, 57], що продукти модифікації білків у відсотковому співвідношенні становлять 50-75% від усіх продуктів вільнорадикального окислення за умов окисного стресу, оскільки високореактивні форми кисню пошкоджують численні ділянки на бічних ланцюгах і пептидних скелетах, в той час як менш реактивні форми мають вищу селективність щодо цільових залишків. Внаслідок широкого спектру посттрансляційних білкових модифікацій змінюється склад, заряд, а також гідрофобність/гідрофільність протеїнів. Це впливає на функції рецепторів, ферментів, транспортних або структурних білків.

Процеси окисної модифікації білків (ОМБ) можуть викликати:

I. Активні форми кисню (АФК), азоту (АФА) та хлору (НОСІ), зокрема визначальну роль відіграють $O_2^{\bullet-}$, $NO_2^{\bullet}$, H_2O_2 , $^{\bullet}OH$ [58], посилена генерація яких викликає нітроокиснювальні пошкодження, що негативно впливає на функціональну здатність основних макромолекул клітин [58]. Встановлено, що при взаємодії з АФК акцепторами електронів можуть виступати конкретні функціональні групи протеїнів: карбоксильні, сульфгідрильні, дисульфідні, амідні та аміногрупи. Зокрема найчутливішими амінокислотами при ОМБ є сульфуровмісні (Cys, Met) та циклічні (Tyr, Try, His, Phe).

II. Продукти ПОЛ через неферментативну посттрансляційну модифікацію, що включає ковалентне приєднання реактивних форм ліпідів та протеїнів [59, 60].

III. Іони металів змінної валентності (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), що здатні індукувати металокаталізоване окислення протеїнів [61, 62].

Відомо, що в процесі окисної модифікації білків може спостерігатись розщеплення поліпептидного ланцюга або навпаки – утворення білкових зшивок [61]. Наприклад, в аеробних умовах за наявності $\text{O}_2^{\bullet-}$ та $\bullet\text{OH}$ відбувається генерація алкоксильного радикалу ($\text{RO}^{\bullet}$) шляхом фрагментації поліпептидного ланцюга. Відповідно за анаеробних умов та участі $\bullet\text{OH}$ формуються ковалентні зшивки, при цьому білкові радикали взаємодіють з іншими радикалами, що містять у своєму складі атом карбону, утворюючи ди-, три-, тетра- та олігомери протеїнів [63].

Окисна деструкція білків поділяється на дві категорії: зворотне і незворотне окислення. Встановлено [56], що реверсивні (зворотні) модифікації є актуальними у фізіологічних процесах і являють собою сигнальні механізми («окислювальна сигналізація»), в той час як необоротні модифікації (включаючи утворення карбонілів, нітротирозину і сульфонових кислот, що призводить до агрегації та деградації протеїнів) можуть індукувати патологічні стани [56, 64]. З іншого боку, реверсивне окислення білків, як правило, бере участь в окисно-відновних сигнальних шляхах, регуляції структури та функціональної активності протеїнів. У зворотне окислення залучаються залишки цистеїну, що призводить до S-сульфенування, S-нітрозилювання і S-тіолування [64].

Окислення протеїнів за участі АФК спочатку призводить до сульфенілювання ($-\text{SOH}$), але через свою відносну нестабільність сульфенільований цистеїн може сприяти утворенню внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків або додатково реагувати з АФК, що призводить спочатку до сульфінілювання ($-\text{SO}_2\text{H}$), а потім до сульфонілювання ($-\text{SO}_3\text{H}$). Однак утворення $-\text{SO}_2\text{H}$ може бути зворотнім через каталітичну активність цитоплазматичного ферменту сульфоредаксину-1 (SRXN-1), на відміну від $-\text{SO}_3\text{H}$ [65].

Однією із найбільш поширених зворотних модифікацій протеїнових SH-груп є утворення *білкових дисульфідів* (Cys-S-S-Cys) між залишками Cys різних білкових молекул (міжмолекулярні зв'язки) або однієї протеїнової структури (внутрішньомолекулярні зв'язки). Утворення останніх відбувається виключно між бічними ланцюгами цистеїну шляхом окислення тіолових груп (рис. 2) [66], на відміну від міжмолекулярних дисульфідних зв'язків, які можуть утворюватися з іншим протеїном або низькомолекулярними тіолами (наприклад, глутатіоном) як за фізіологічних умов, так і за дії АФК або АФА [65].

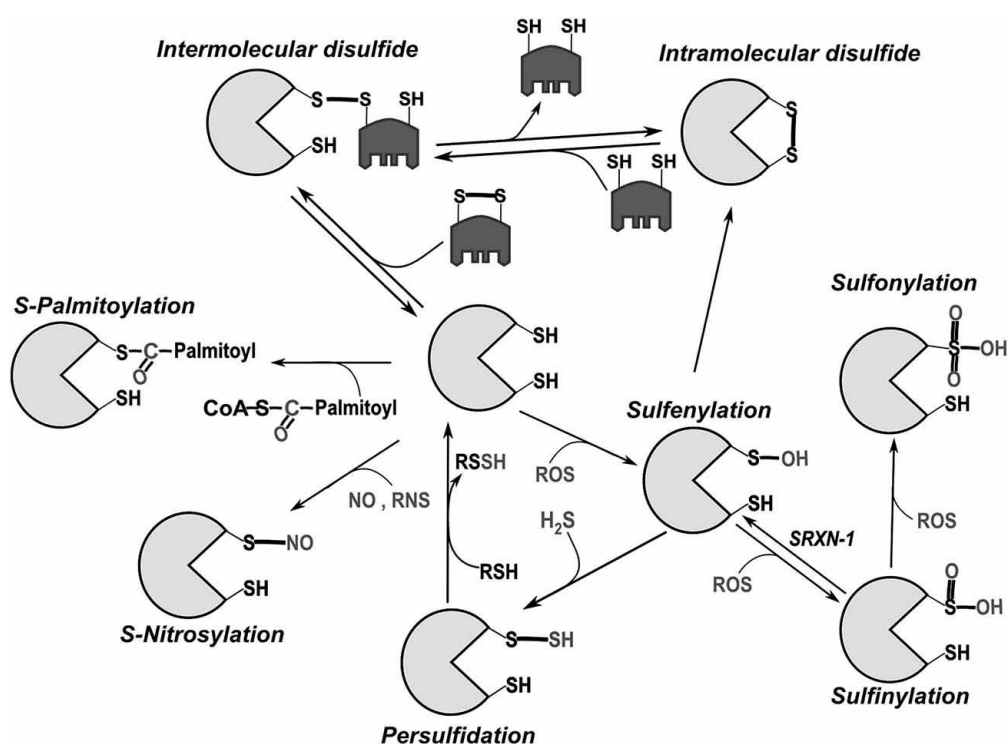


Рис. 2. Основні посттрансляційні модифікації цистеїну

Серед окисних модифікацій залишків Cys також виділяють *S-глутатіонування* білка, що розглядається як захисний механізм протеїнів від окислювальних станів, які призводять до незворотного пошкодження і є оборотною посттрансляційною модифікацією цистеїнових тіолових груп білка через дисульфідний зв'язок із GSH [67]. Глутатіонування може відбуватися через неферментативні або ферментативні реакції. Зокрема, неферментативне глутатіонування є неспецифічним шляхом, який залежить від співвідношення GSH/GSSG. Ферментативне або специфічне глутатіонування може бути оборотним через вивільнення GSH із залишків цистеїну в цільових білках за

допомогою глутаредоксину (Grx) і тіоредоксину (Trx), цим самим запобігаючи окисненню чутливих SH-груп до сульфенової кислоти. Було ідентифіковано кілька цільових білків з потенційним глутатіонуванням. Наприклад, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (GAPDH) і α -кетоглутарат-дегідрогеназний комплекс (KGDHC), які функціонують у гліколітичному шляху та циклі Кребса відповідно, регулюються глутатіонілуванням [67, 68].

Основним продуктом окиснення цистеїнових залишків протеїнів є сульфенова кислота (PSOH) – оборотна окисна модифікація тіолової групи білків [69], яка може бути індукована пероксидом водню, алкілгідропероксидами та пероксинітридом. Крім того, біологічне та патологічне значення P-SOH було додатково продемонстровано повідомленнями про те, що утворення сульфенової кислоти є незамінним процесом для активації Т-клітин, оскільки при блокуванні реакцій сульфенування їхнє дозрівання значно погіршується. Також в літературі [70] показано, що більшість білків у ракових клітинах містять у своєму складі сульфенові кислоти.

Реакційноздатні форми азоту (АФА), такі як оксид азоту ($\text{NO}^\bullet$), нітроксил (NHO) та пероксинітрид (ONOO^-) реагують з деякими цистеїнами, викликаючи S-нітрозилювання/нітрозування. Дані модифікації розглядаються як гуанілатциклазозалежний сигнальний шлях, при якому $\text{NO}^\bullet$ і його активні форми можуть посттрансляційно нітрозувати, нітрозилювати або нітрувати білки, що містять гем, тіолові, тирозинові залишки або метали змінної валентності. Відомо, що при посиленій генерації $\text{NO}^\bullet$ такі реакції можуть вплинути на функціональну активність протеїнів, зокрема викликати пошкодження ДНК (дезамінування, алкілювання, розрив ланцюгів) [71].

Слід зазначити, що формування дисульфідів (P-S-S-P) і S-глутатіонування (P-S-S-G) некоректно вважати окисною модифікацією, оскільки кінцеві продукти не містять атому кисню, на відміну від продуктів, які утворюються внаслідок S-нітрозилювання (-SNO) і S-сульфенування (-SOH). Тим не менш, формування дисульфідів і S-глутатіонових аддуктів вимагає наявності АФК,

зокрема H_2O_2 , тому було б більш доречно назвати їх редокс-модифікаціями [64].

Цистеїнові залишки ліпідів також можуть зазнавати різних модифікацій, включаючи пальмітоїлювання та пренілювання, або зв'язувати метали змінної валентності, такі як Zn^{2+} , Fe^{2+} та Cu^{2+} . Остання властивість має вирішальне значення для утворення цинкових пальців і залізо-сірчаних кластерів. Завдяки своїм нуклеофільним властивостям тіолатні групи також беруть участь у окисно-відновних реакціях [65].

Одним із найпоширеніших маркерів незворотньої окисної модифікації білків є карбонільні похідні. Карбонілювання – це необоротна посттрансляційна модифікація, за допомогою якої утворюються та/або вводяться в білки карбонільні фрагменти. Ця реакція відбувається за різними механізмами, хоча загальновизнано, що карбонілювання зазвичай відбувається в прооксидантному середовищі та в результаті окисного стресу [72]. Найбільш чутливими при цьому виступають амінокислотні залишки проліну, гістидину, лізину та аргініну.

Залежно від того, утворюються карбоніли всередині протеїну або безпосередньо вводяться в склад білків після їх утворення, можна чітко розрізнити два типи карбонілювання. «Первинні карбоніли» утворюються в результаті окисного пошкодження структури білка, тоді як «вторинні карбоніли» утворюються в результаті окислення ліпідів та вуглеводів, продукти якого згодом вводяться в білки через ковалентні взаємодії [72, 73]. У свою чергу, первинні карбоніл-деривати можуть утворюватися за допомогою трьох механізмів, а саме: 1) окисного дезамінування основних амінокислот (лізин, аргінін, гістидин) за допомогою механізму, опосередкованого вільними радикалами; 2) окисного дезамінування основних амінокислот дикарбонілами в реакції Майяра; 3) шляхом окиснювального розщеплення пептидного скелету через α -амідування або через окислення бічних ланцюгів глутамілу [72].

Серед первинних механізмів карбонілювання опосередкований радикалами, відомий як шлях «Штадтмана», зазвичай включає механізм

окислення, каталізованого металами змінної валентності (Fe^{2+} , Cu^{2+}), причому джерелом гідроксильного радикалу та інших АФК виступає реакція Фентона [72]. На першому етапі АФК атакують ε -амінофрагмент основних амінокислот шляхом відриву атома водню від сусіднього вуглецю, що призводить до утворення іміногрупи. Цей проміжний і нестабільний продукт легко гідролізується з утворенням відповідного карбоніл-деривату. Відповідно до цього шляху реакції, α -AS, також відомий як алізін, утворюється в результаті окислювального дезамінування лізину, тоді як γ -глутаміновий напівальдегід (γ -GS) утворюється з аргініну та проліну [72]. Альтернативний опосередкований механізм Майяра, відомий як шлях «Суяма», який також описується як глікоокислення, передбачає деградацію відновлюючих цукрів і утворення реакційноздатних α -дикарбонілів, таких як гліоксаль (GO) і метилгліоксаль (MGO) [72]. Ці високоактивні дикарбоніли реагують з ε -аміногрупами в білках, викликаючи окисне дезамінування основних амінокислот і утворення тих самих вищезгаданих білкових карбонілів.

Значний прогрес також був досягнутий у розумінні механізму формування вторинних білкових карбонілів. Було виявлено, що малоновий діальдегід (MDA), 4-гідроксиноненаль (4-HNE) та інші карбоніли, утворені з ліпідів, реагують з аміногрупами, зв'язаними з протеїнами [72, 74]. На відміну від вищезгаданих дикарбонілів, які утворюються в реакції Майяра (GO і MGO), MDA та інші ліпідні карбоніли не здатні індукувати окисне дезамінування залишків лізину з утворенням первинних карбоніл-дериватів, таких як α -AS, з лізину. Натомість MDA та 4-HNE залишаються зв'язаними з білками як вторинні білкові карбоніли за допомогою реакції Міхаеля. Ця реакція відбувається між MDA (продуктами його розпаду, ацетальдегідом (AA) і формальдегідом (FA) та іншими карбонілами) і лізином та іншими основними амінокислотами з утворенням аддуктів різноманітної стабільності. Варто зазначити, що другий альдегідний фрагмент із доданого MDA залишається вільним і доступним для реакції з DNPH або іншими агентами дериватизації, що дозволяє виявити його як (вторинний) білковий карбоніл. Альтернативно,

вільний альдегід із зв'язаного з білком MDA може реагувати з іншим залишком лізину, що призводить до утворення внутрішньо- та/або міжмолекулярних ковалентних зшивок.

Окисний стрес є основною причиною посттрансляційних змін протеїнів і включає хімічні модифікації, такі як агрегація через зшивання білка та фрагментація через розщеплення пептиду [72, 75]. У результаті утворюється велика кількість продуктів різних модифікацій білка, які, як правило, є більш стабільними порівняно з їхніми реактивними попередниками і, отже, є важливими біомаркерами для моніторингу окисного і нітрозативного стресу [56].

1.4. Особливості будови та функціонування альдозоредуктази як ензиму поліольного шляху

Альдозоредуктаза (альдитол:НАДФН-оксидоредуктаза, ЕС 1.1.1.21, AKR1B1, ALR2) є невеликим, цитозольним мономерним ензимом, який належить до надродини альдо-кеторедуктази і каталізує NADPH-залежне відновлення широкого спектру альдегідів до відповідних їм спиртів, демонструючи широку субстратну специфічність [57, 76-78]. З моменту свого виявлення, на початку шістдесятих років, цей фермент розглядався у аспекті розвитку довгострокових діабетичних ускладнень. Насправді, ALR2 є ключовим ферментом поліольного шляху, показаного на рис. 3. Він перетворює глюкозу в сорбіт, який потім окислюється до фруктози за допомогою сорбітолдегідрогенази (Liditol:NAD⁺-5-оксидоредуктаза, ЕС 1.1.1.14, SD) [76].

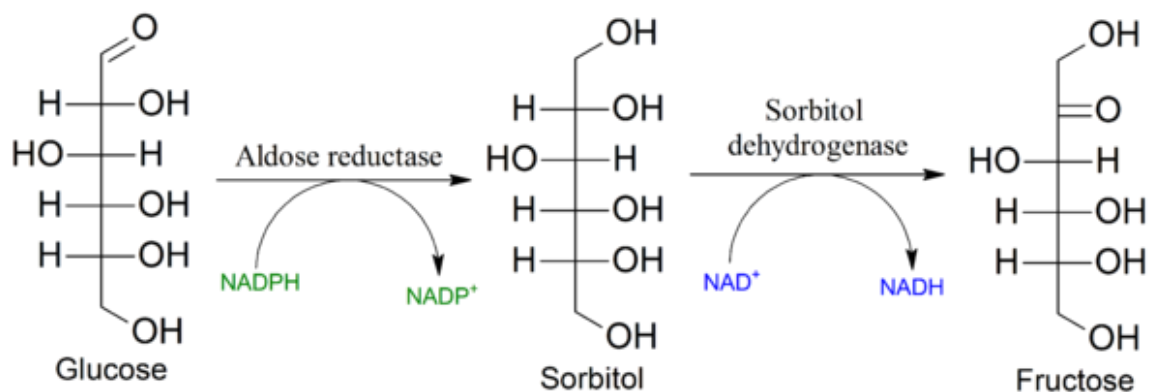


Рис. 3. Поліольний шлях перетворення глюкози

Оскільки ALR2 демонструє низьку спорідненість до глюкози, її перетворення в сорбітол за допомогою цього метаболічного шляху, як правило, незначуще за умов евглікемії – стану, при якому у хворих з порушеною толерантністю до глюкози зберігається нормальний рівень глюкози в крові. Фактично, ALR2 повинна безпосередньо конкурувати з гексокіназою гліколітичного шляху (рис. 4) і, оскільки субстратна спорідненість гексокінази вища, ніж ALR2, глюкоза переважно фосфорилується цим ферментом. Проте при гіперглікемічному стані спостерігається інша картина – гексокіназа швидко насичується і поліольний шлях стає переважаючим. Сорбітол утворюється швидше, ніж перетворюється на фруктозу, але його полярність перешкоджає легкому проникненню через мембрани з подальшим видаленням із тканин шляхом дифузії. Тому він має тенденцію накопичуватися всередині клітини, збільшуючи її осмолярність [76, 77].

Крім осмотичного дисбалансу, підвищення активності поліольного шляху під час гіперглікемії викликає значний дисбаланс у співвідношенні вільних цитозольних коферментів NADPH/NADP^+ і NAD^+/NADH . Зміна окисно-відновного стану піридинових нуклеотидів призводить до псевдогіпоксії, що сприяє виникненню гіперглікемічного окисного стресу через накопичення активних форм кисню (АФК). АФК, у свою чергу, запускають активацію полі(АДФ-рибоза)полімерази (PARP), ізоформи протеїнкінази С (PKC), білка, активованого мітогеном кінази (MAPK), а також запальний каскад, який підтримує патогенез ушкодження та дисфункції діабетичної тканини. Крім того, збільшення рівня фруктози, пов'язаного з активацією поліольного шляху, прискорює розвиток цих ускладнень. Відомо, що фруктоза та її метаболіти є ефективнішими неферментативними індукторами глікації порівняно з глюкозою [76].

В літературі показано [76-78], що осмотичний і окислювальний стрес, викликаний активацією ALR2, відіграють важливу роль у виникненні діабетичних порушень, що вражають переважно нирки, нервову та судинну системи.

Крім біохімічних оцінок, існують також додаткові підходи, що включають генетичний аналіз, який надав недвозначні докази ролі ALR2 у розвитку ускладнень діабету, і кореляція між надмірною експресією гена ALR2 людини та ймовірністю розвитку ускладнень у хворих на цукровий діабет доведена. Відповідно, цей фермент виступає одним із критичних факторів для основної патологічної зміни, що зачіпають з часом діабетичні тканини, і його пригнічення є ефективним засобом профілактики або принаймні затримки прогресування та тяжкості ускладнень діабету [76].

За останні роки науковий інтерес до цього ферменту та його інгібіторів швидко зріс, в результаті чого велику кількість структурно різних сполук було розкрито і запатентовано як сильнодіючі і ефективні інгібітори ALR2 (ARI), ключовими з яких є сорбініл, фідарестат, ранірестат та толрестат [79].

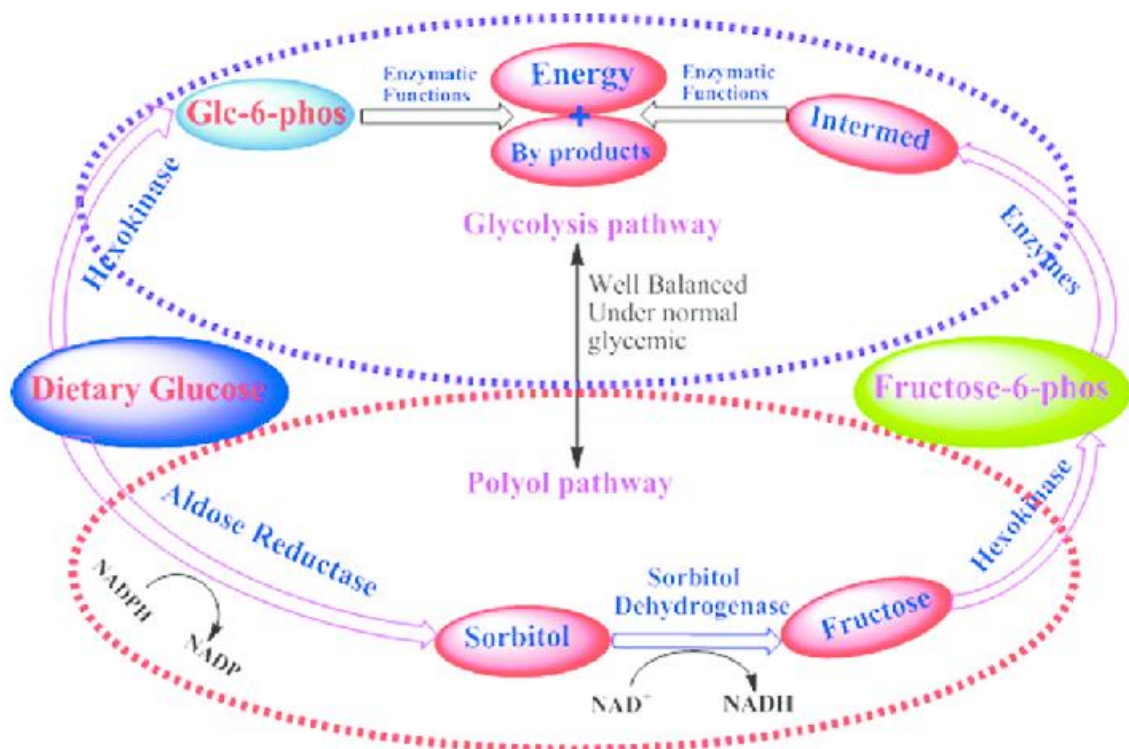


Рис. 4. Метаболізм глюкози в процесі гліколітичного та поліольного шляхів

Насправді, окрім управління поліольним шляхом, цей фермент є ключовим компонентом комплексу антиоксидантної системи захисту клітин, включаючи альдегіддегідрогенази (ALDH), які каталізують окислення альдегідів до відповідних їм кислот, глутатіон-S-трансферази (GST), які каталізують кон'югацію альдегідів з глутатіоном та іншими альдо-

кеторедуктазами (AKR), альдегідредуктаза, ALR1, (EC 1.1.1.2, ALR1), яка демонструє високий ступінь структурної гомології з ALR2, маючи 65% ідентичності в амінокислотних послідовностях. Відповідно, ALR2 є високоефективним ензимом у зменшенні токсичних альдегідів, таких як 4-гідрокси-2,3-ноненаль (HNE), метилгліоксаль і 3-дезоксиглюкозон, що утворюються у великих кількостях при патологічних станах, пов'язаних з окислювальним стресом. Окрім того, вказані токсичні альдегіди задіяні в утворенні кінцевих продуктів глікації (AGE). Фермент забезпечує ефективне і повне видалення кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів, тим самим відіграючи значну детоксикаційну функцію, яка стає особливо актуальною, коли інші антиоксидантні механізми перевантажені [76].

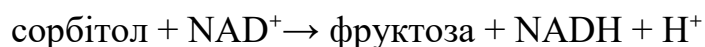
Проте в той же час ALR2 каталізує відновлення глутатіонових кон'югатів ненасичених альдегідів (GS-HNE), демонструючи в більшості випадків вищу каталітичну ефективність, ніж та, що відображається проти вільного альдегіду. У цьому випадку відповідні глутатіонові кон'югати відновлених альдегідів (GS-DHN) проявляють цитотоксичну дію через модуляцію сигнальних шляхів NF- κ B/PKC/IKK/PLC [76]. Ці дані однозначно демонструють причинний наслідок між активністю ALR2 і сигналізацією запалення та цитотоксичності.

Отже, при гіперглікемії альдозоредуктаза є основним ферментом, який сприяє розвитку хронічних ускладнень цукрового діабету, а також є важливим стимулятором запальних процесів і цитотоксичних станів, навіть за нормоглікемічного статусу [76].

1.5. Особливості структурно-функціональної організації сорбітолдегідрогенази як ензиму поліольного шляху

Сорбітолдегідрогеназа (SDH, EC 1.1.1.14) є ключовим ферментом поліольного шляху, який каталізує реакцію взаємоперетворення глюкози та фруктози через утворення проміжного продукту сорбіту, та є важливим альтернативним шляхом метаболізму глюкози [80]. Даний ензим належить до класу оксидоредуктаз, що вказує на ключову функцію ферменту – каталіз

окисно-відновних реакцій. Разом із альдозоредуктазою (ALR2) виробляють фруктозу з глюкози без витрат АТФ, проте з використанням кофактору NAD^+ та іону Zn^{2+} , який також є необхідним компонентом для каталізу:



SDH складається з чотирьох ідентичних ланцюгів (А, В, С та D), кожен з яких на 31% має спіраль (14 спіралей) і 26% бета-листів (23 ланцюги). Усі чотири ланцюги мають по 356 амінокислотних залишків і каталітичному сайту. Каталітичний центр кожного ланцюга містить по сериновому та гістидиновому залишку, що являють собою гідрофільні бічні ланцюги ферменту. І саме вони для каталітичної активності вимагають наявності цинку та еквіваленту NAD^+ [81].

Взаємодія між субодинами, що утворюють тетрамер у SDH, визначається нековалентними взаємодіями – гідрофобними, електростатичними та водневими зв'язками. Цікаво, що для гомотетрамерних білків, таких як SDH, вважається, що структура еволюціонувала від мономерної до димерної і, нарешті, до тетрамерної структури. Зокрема, білки SDH мають тісний еволюційний зв'язок з ензимом алкогольдегідрогеназою (ADH1), який також належить до суперродини білків середньоланцюгових ферментів дегідрогенази/редуктази. Наприклад, SDH білокрилки сріблястолистої та ADH1 дріжджів не мають структурного сайту для цинку та мають тетрамерну четвертинну структуру, таким чином демонструючи тісний еволюційний зв'язок із структурної точки зору між двома класами білків (ADH та SDH) [82].

В літературі [83] показано, що SDH може відігравати ключову роль у рухливості сперматозоїдів, використовуючи сорбітол як альтернативне джерело енергії для рухливості статевих клітин. Цікаво, що сорбітолдегідрогеназа також є індикаторним ферментом, який відображає пошкодження печінки [84]. Тобто SDH концентрується в основному в печінці, подібно до аланінамінотрансферази (АЛТ) [81]. Dongsub Jeon та співавтори [84] встановили, що у пацієнтів із захворюванням печінки, включаючи гепатит,

цироз та гепатоцелюлярну карциному (ГЦК), рівень сорбітолдегідрогенази підвищувався поряд із рівнями аспартатамінотрансферази (АСТ) і АЛТ.

У тканинах, де рівень сорбітолдегідрогенази низький, наприклад у сітківці, кришталику, нирках і нервових клітинах, сорбітол може накопичуватися в умовах гіперглікемії. Так, при неконтрольованому діабеті велика кількість глюкози потрапляє в ці тканини, де згодом перетворюється на сорбітол за допомогою альдозоредуктази. В подальшому спирт накопичується, викликаючи втягування води всередину клітини через підвищений осмотичний тиск, що порушує функцію тканин [81]. Таким чином вважається, що поліольний шлях бере участь у етіології діабетичних ускладнень, таких як діабетична нейропатія та ретинопатія, спричинених гіперглікемією.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти та методи дослідження

Дослідження проводили на безпородних білих щурах з початковою масою 130 ± 7 г та віком 2,5-3 місяці. Усі маніпуляції та умови утримання дослідних тварин відповідали загальним етичним принципам експериментів на тваринах, що регламентовані положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р., зі змінами, 1998 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», прийнятими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Дослідні щури протягом всього експерименту споживали напівсинтетичний раціон AIN-93 згідно рекомендацій *American Institute of Nutrition* (Reeves et al., 1993). Впродовж експерименту протягом чотирьох тижнів щодобово контролювали індивідуальні показники споживання корму. Тварин утримували в індивідуальних пластикових клітках з піщаним наповнювачем та доступом до води *ad libitum*.

На початку експерименту тварин було поділено на групи:

«I (К) – контрольні (інтактні) тварини, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами (10 % жирів, 76 % вуглеводів, 14 % протеїну, збалансоване співвідношення вітамінів та мінералів);

II (НПР) – тварини, які протягом 28 днів споживали низькопротеїновий раціон, що включав 1/3 від добової потреби харчового білка (4,7 % протеїну, 10 % жиру та 85,3 % вуглеводів);

III (ВС) – група щурів, які отримували високосахарозний напівсинтетичний раціон, що містив 40 % сахарози при загальному рівні білка 14 %, жирів – 10 %, вуглеводів – 76 %;

IV (НПР/ВС) – щури, яких утримували на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні (4,7 % протеїну, 40 % сахарози і необхідну концентрацію інших нутрієнтів)» [85].

Цервікальну дислокацію експериментальних щурів проводили на 29 добу, використовуючи легкий ефірний наркоз згідно етичних стандартів у стані наркозу (Закон України № 3447-1 від 21.02.2006р. «Про захист тварин від жорстокого поводження»).

Виділення мітохондріальної фракції нирок щурів

Мітохондріальну фракцію виділяли згідно методу диференційного центрифугування при t 0-4°C. Гомогенізацію нирок проводили за допомогою скляної ступки, попередньо подрібнивши орган ножицями, з додаванням середовища гомогенізації: трис-НCl – 10 ммоль/л, рН 7,4; етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) – 1 ммоль/л; сахароза – 250 ммоль/л [86]. Отриманий гомогенат фільтрували, після чого центрифугували при 1000 g протягом 10 хв для осадження ядерної фракції. Супернатант відбирали і при 12000 g протягом 15 хв осаджували мітохондріальну фракцію, після чого осад двічі промивали буфером гомогенізації без ЕДТА.

Виділення цитозольної (постмікросомної) фракції нирок щурів

Для отримання цитозольної фракції використовували метод Шенкмана [87], який базується на утворенні суспензії при додаванні до реакційного середовища іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} , які виступають в ролі нейтралізаторів негативного заряду мікросом. Усі операції проводились при t 0-4°C. До надосадової рідини, отриманої після виділення мітохондрій, додавали іони двовалентних металів Ca^{2+} та Mg^{2+} (до дев'яти об'ємів надосадової рідини – один об'єм 80 mM розчину хлориду кальцію та один об'єм 160 mM розчину хлориду магнію у 10 mM буфері трис-НCl, рН 7,4). Дослідні зразки перемішували при t 4 °C протягом 10 хв, після чого центрифугували 15 хв при 10 000 g. Отриманий осад – мікросомна фракція, надосадова рідина – цитозоль, який використовували у подальших дослідженнях.

Метод визначення інтенсивності генерації супероксид-аніон радикалу

Принцип методу полягає у здатності супероксиду відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ) з утворенням диформазану характерного забарвлення, що реєструють при довжині хвилі 540 нм [88].

У центрифужні пробірки відбирали по 0,05 мл мітохондріальної/цитозольної фракції, додавали 0,5 мл 3% NADH, після чого перемішували та інкубували на водяній бані протягом 10 хв при t 37°C. Після цього до проб додавали по 0,5 мл 0,2% НСТ, перемішували і знову інкубували 5 хв при t 37°C. Після інкубації додавали по 3 мл суміші хлороформ-диметилсульфоксид у співвідношенні 1:2 за об'ємом, збовтували 1 хв, після чого центрифугували протягом 5 хв при 1500 g. Інтенсивність генерації $O_2^{\cdot-}$ виражали в нмоль диформазану/(хв×мг протеїну).

Метод визначення швидкості генерації гідроксильного радикалу

Швидкість генерації $\cdot OH$ вимірювали при використанні інкубаційного середовища: 1 ммоль H_2O_2 , 20 ммоль дезоксирибози та 20 ммоль натрій-фосфатного буферу (pH 7,4) [89].

У дослідні пробірки вносили інкубаційне середовище та 0,2 мл біологічного матеріалу, після чого інкубували суміш на водяній бані протягом 30 хв при t 37°C. Після інкубації додавали 500 мкл 1% розчину ТБК (тіабарбітурової кислоти) в 50 ммоль гідроксиду натрію і 500 мкл 2,8% розчину ТХО (трихлороцтової кислоти). Центрифугували протягом 5 хв при 3000 g, після чого отриману суміш витримували на киплячій водяній бані 20 хв, а потім охолоджували. Величину екстинції визначали при $\lambda = 532$ нм. Інтенсивність генерації гідроксильного радикалу виражали в умовних одиницях ($\Delta E \cdot 10^{-2}/\text{хв} \times \text{мг протеїну}$).

Визначення вмісту білкових карбоніл-дериватів

Для оцінки визначення вмісту карбонільних похідних білків був використаний метод Дубініної, який базується на здатності окислених

амінокислотних залишків зв'язуватись з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ) з подальшим утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів з максимумом поглинання при 370 нм [90].

У центрифужні пробірки вносили по 50 мкл мітохондріальної/цитозольної фракції та 1 мл 20% трихлороцтової кислоти (ТХО). Центрифугували протягом 5 хв при 3000 g, після чого відбирали надосадову рідину. В контрольні пробірки до осаду вносили 1 мл 2 М хлоридної кислоти, а в дослідні – 1 мл 0,1 М розчину 2,4-DNPH (динітрофенілгідразин). Надалі проби інкубували на водяній бані протягом 60 хв при t 37°C, після чого центрифугували протягом 15 хв при 3000 g. До осаду додавали по 1 мл суміші етанол:етилацетату (1:1) і центрифугували 5 хв при 3000 g, після чого даний етап повторювали тричі. Наступним кроком було додавання в пробірки по 3 мл 8 М сечовини та розчинення осаду на киплячій водяній бані. Реєстрацію утвореного 2,4-DNPH проводили на спектрофотометрі при $\lambda = 370$ нм. Вміст білкових карбніл-дериватів розраховували за допомогою молярного коефіцієнту екстинції $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, та виражали у нмоль/мг протеїну.

Визначення вмісту вільних тіольних груп

Метод базується на взаємодії вільних SH-груп з реактивом Елмана (DTNB, 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна кислота) з подальшим утворенням тіонітрофенільного аніону, кількість якого прямопропорційна концентрації вільних тіольних груп, які провзаємодіяли з DTNB [91].

В центрифужні пробірки додавали 100 мкл мітохондріальної/цитозольної фракції та 1 мл 20% ТХО, після чого центрифугували протягом 10 хв при 3000 g. Надалі до осаду додавали 2 мл суміші 0,3 М HClO_4 , 5 мМ ЕДТА та знову повторювали процедуру центрифугування при 3000 g 10 хв. До осаду додавали по 2 мл суміші етанол-етилацетату у співвідношенні 1:1 і повторно центрифугували. Після додавання до осаду по 3,5 мл 8 М сечовини та буферу (50 мМ KH_2PO_4 та 5 мМ ЕДТА, рН 7,4), проби гріли на водяній бані до розчинення, після чого центрифугували протягом 10 хв при 3000 g. Надалі

вміст розподіляли у три пробірки – у дві дослідні та одну контрольну по 2 мл надосаду, після чого додавали по 1 мл буферу (50 мМ KH_2PO_4 та 5 мМ ЕДТА, рН 7,4). В подальшому у контрольну пробірку вносили 0,02 мл дистилату, а в дослідну – 0,02 мл реактиву Елмана та витримували 30 хв. Оптичну густину вимірювали на СФ при λ 412 нм. Вміст протеїнових SH-груп розраховували за допомогою молярного коефіцієнту екстинції $11,4 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ та виражали у нмоль/мг протеїну.

Метод визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Даний метод базується на реакції взаємодії малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за температури кипіння і кислого середовища, в результаті чого утворюється комплекс характерного забарвлення з максимумом поглинання при $\lambda = 532$ нм [91].

У дослідну центрифужну пробірку вносили 0,01 мл мітохондріальної/цитозольної фракції, 1 мл 20% ТХО і 2,5 мл буферу (0,175 М KCl та 0,025 М трис-HCl, рН 7,4). Надалі центрифугували протягом 15 хв при 4000 g, після чого до супернатанту додавали по 1 мл 0,8 % ТБК. Отриману суміш інкубували на киплячій водяній бані 10 хв до появи характерного забарвлення. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 532 нм.

Концентрацію ТБК активних продуктів виражали в нмоль/мг протеїну.

Визначення активності альдозоредуктази

Активність альдозоредуктази (ALR2, EC 1.1.1.21) у цитозолі нирок щурів визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм [92].

У дослідну пробірку додавали 4 мл реакційної суміші (2 мл 0,8 М Na-фосфатний буфер (рН 5,5), 1 мл 4,7 мМ DL-гліцеральдегіду, 1 мл 0,11 мМ NADPH) та 200 мкл цитозольної фракції. Зміни концентрації NADPH визначали на спектрофотометрі при $\lambda = 340$ нм через кожні 30 секунд протягом 2 хв. Активність альдозоредуктази визначали з використанням молярного коефіцієнту екстинції $6,22 \times 10^{-3}$ та виражали у ммоль/хв×мг протеїну.

Визначення активності сорбітолдегідрогенази

Активність сорбітолдегідрогенази (SDH, EC 1.1.1.14) в цитозолі нирок щурів визначали кінетичним методом, що базується на здатності SDH відновлювати D-фруктозу до D-сорбітолу з одночасним окисненням NADH [93].

У дослідні пробірки додавали 1,7 мл 0,2 М трис-буферу (pH 7,4), 0,05 мл буферного розчину NADH та 1 мл цитозольної фракції. Перемішували 2 хв та інкубували на водяній бані 15-20 хв при t 37 °C. До проб додавали 0,2 мл буферного розчину фруктози, перемішували і надалі вимірювали E_1 через 30-40 с після запуску реакції (внесення фруктози) при довжині хвилі 340 нм. Після інкубації проб протягом 5 хв при t 37 °C, вимірювали E_2 . Активність сорбітолдегідрогенази визначали за допомогою молярного коефіцієнту екстинції $6,22 \times 10^{-3}$ та виражали у ммоль/хв×мг протеїну.

Вміст загального білка в мітохондріальній/цитозольній фракціях нирок щурів визначали згідно стандартного методу Лоурі.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили на ПК за допомогою стандартної програми «*Microsoft Excel 2016*» та «*STATISTICA 6.0*». Для визначення можливих міжгрупових відмінностей між середніми значеннями використовували параметричний t -критерій Стьюдента. Вірогідними вважали результати при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Активність ензимів поліольного шляху у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Нині на особливу увагу заслуговує питання порушень метаболічних процесів за умов надлишку сахарози або дефіциту протеїну в харчовому раціоні [1]. Показано, що «одним із основних механізмів ушкодження клітин різних органів за нутрієнтного дисбалансу є активація вільнорадикальних процесів. Крім того, одним із ключових факторів індукції окисного стресу за умов гіперглікемії є посилене утворення спирту сорбітолу через активацію альтернативного шляху метаболізму глюкози – поліольного шляху» [8]. Ключовими ензимами цього шляху є «альдозоредуктаза (ALR2, EC 1.1.1.21), яка каталізує реакцію перетворення глюкози до сорбітолу, та сорбітолдегідрогеназа (SDH, EC 1.1.1.14), за дії якої сорбітол метаболізується у фруктозу» [75].

Результати проведених досліджень показали, що у тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, альдозоредуктазна (рис. 3.1.1) та сорбітолдегідрогеназна (рис. 3.1.2) активності в цитозольній фракції нирок достовірно не відрізняються від контрольних значень. Проте у щурів, які отримували високосахарозний раціон, спостерігається максимально виражене підвищення як альдозоредуктазної (рис. 3.1.1), так і сорбітолдегідрогеназної (рис. 3.1.2) активностей порівняно з показниками контролю. В літературі [76-77] показано, що альдозоредуктаза є невеликим, цитозольним мономерним ензимом, який можна вважати прототипом надродини ферментів альдокеторедуктази. Даний ензим має низьку спорідненість (високе значення K_m) до глюкози, тому конкурує з гексокіназою – ключовим ферментом гліколітичного шляху, що забезпечує фосфорилування більшої частини клітинної глюкози до глюкозо-6-фосфату. У нормі перетворення глюкози в сорбітол за участі поліольного шляху практично не відбувається. Проте за умов гіперглікемії гліколітичний шлях швидко насичується і основним стає шлях поліолів. У нирках внаслідок посиленої активації альдозоредуктази сорбітол утворюється

швидше, ніж перетворюється на фруктозу, наслідком чого буде накопичення цього спирту в цитозолі. В літературі показано, що «сорбітол – полігідроксильований гідрофільний спирт, відіграє важливу роль в осмотичній регуляції нирок ссавців. Наслідком його накопичення може бути збільшення осмолярності, набухання клітин, оскільки через полярність сорбітолу ускладнюється його проникнення через мембрани та подальше видалення із тканин шляхом дифузії» [77].

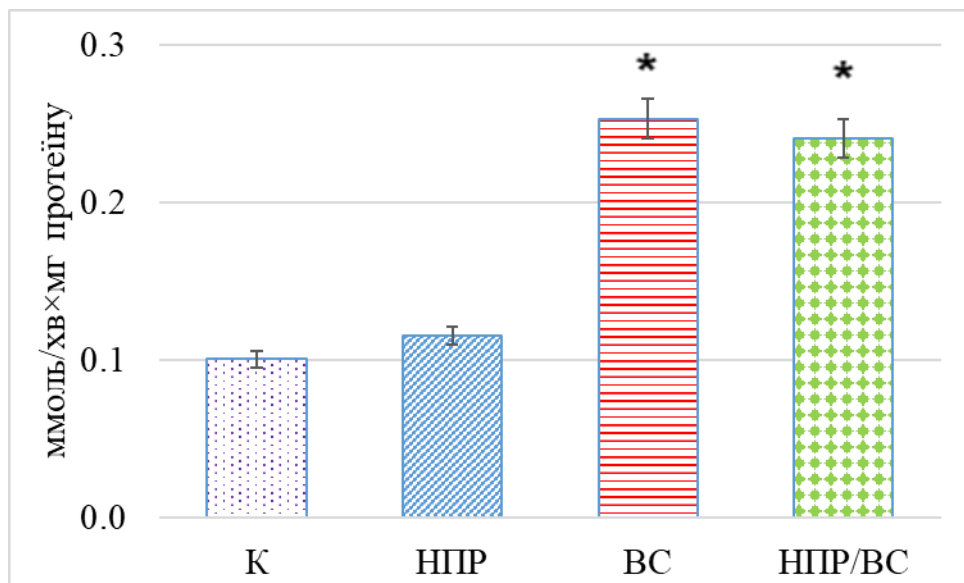


Рис. 3.1.1. Альдозоредуктазна активність у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Примітка (тут і надалі): К – група тварин, які отримували повноцінний раціон; НПР – тварини, які перебували на низькопротеїновому раціоні; ВС – тварини, яких утримували на високосахарозному раціоні; НПР/ВС – тварини, які перебували на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні

** – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.*

Другим етапом поліольного шляху є NAD^+ -залежне перетворення сорбітолу до фруктози за участі ензиму сорбітолдегідрогенази. Даний фермент належить до класу оксидоредуктаз та складається з чотирьох ідентичних ланцюгів (А, В, С та D), кожен з яких на 31% має спіраль (14 спіралей) і 26% бета-листів (23 ланцюги). Каталітичний центр кожного ланцюга містить по сериновому та гістидиновому залишку. Для прояву каталітичної активності ензим потребує наявності цинку та коферменту NAD^+ [81]. Показано, що

«надмірна активація сорбітолдегідрогенази може призводити до посиленого утворення кінцевого продукту поліольного шляху – фруктози, що може фосфорилуватись до фруктозо-3-фосфату з подальшим розщепленням до 3-дезоксиглюкозону. Обидві сполуки є потужними глікозилюючими агентами, які беруть участь у формуванні кінцевих продуктів глікації (AGEs). Окрім того, активація сорбітолдегідрогенази може призводити до надмірного використання відновленого еквіваленту NAD^+ та збільшення співвідношення NADH/NAD^+ . Зміна окисно-відновного стану сприяє виникненню гіперглікемічного окисного стресу через накопичення АФК. У свою чергу, АФК активують ізоформи протеїнкінази С (PKC), білка, активованого мітогеном кінази (MAPK) і полі(АДФ-рибоза)полімерази (PARP). При цьому АФК є індукторами запального каскаду, який підтримує патогенез ушкодження та дисфункції тканин за умов гіперглікемії» [77]. Показано, що посилена генерація АФК може супроводжуватись геномними мутаціями різного типу, активацією необоротної окисної модифікації білків (ОМБ), ліпідів (ПОЛ) та гліканів, що можуть сприяти ушкодженням або навіть загибелі клітин [10]. До того ж, «збільшення рівня фруктози, пов'язаного з активацією сорбітолдегідрогенази, прискорює розвиток ускладнень, оскільки фруктоза та її метаболіти є майже в 10 разів ефективнішими неферментативними агентами глікації, ніж глюкоза» [77].

Водночас слід відмітити, що якщо альдозоредуктазна активність підвищується на 60 % порівняно з контролем (рис. 3.1.1), то сорбітолдегідрогеназна активність за досліджуваних експериментальних умов зростає лише приблизно на 35 % (рис. 3.1.2). Ймовірно, отримані результати свідчать, що за умов надмірного споживання сахарози в клітинах нирок посилено накопичується сорбітол, однак його перетворення у фруктозу сповільнене. Враховуючи, що «сорбітол є осмолітом, накопичення якого розглядається як важливий механізм в достроковій адаптації клітин до підвищення позаклітинної осмолярності, то за умов гіперглікемічного стану буде спостерігатись підвищення осмолярності у клітинах нирок» [94].

Показано, що «накопичення сорбітолу у високих концентраціях є токсичним для клітин, оскільки цей спирт не використовується в інших метаболічних шляхах, а накопичується в клітинах, що пов'язано з низькою швидкістю його дифузії через мембрани клітин» [77]. Таким чином, накопичення сорбітолу, зокрема у клітинах клубочків нирок, буде призводити їх до набухання тканин. Окрім того, відомо, що накопичення сорбітолу є індуктором вільнорадикальних процесів. Зокрема, на сьогодні показано, що існують три потенційні механізми, завдяки яким цей поліол може сприяти окисному стресу:

1) активація альдозоредуктази призводить до виснаження пулу NADPH, який необхідний для регенерації відновленого глутатіону (GSH) – одного із ключових компонентів антиоксидантного захисту. У свою чергу, це може бути одним із механізмів зниження антиоксидантного захисту клітин та розглядатись як одна із причин порушення функціонування нирок за умов гіперглікемії;

2) активація сорбітолдегідрогенази призводить до накопичення NADH, посилений потік якого через I комплекс дихального ланцюга індукує генерацію супероксид-аніон радикалу;

3) накопичення фруктози та її метаболітів індукує неферментативну глікацію протеїнів [95].

Показано, що посилена активність поліольного шляху відіграє важливу роль у патогенезі діабетичної нефропатії. Незважаючи на те, що за умов евглікемії лише слідові кількості (~3%) глюкози метаболізуються ензимами поліольного шляху, то за умов гіперглікемії понад 30% глюкози перетворюється на сорбітол із супутнім зниженням співвідношення NADPH/NADP⁺. Наслідком цього може бути зниження активності низки NADPH-залежних ензимів, зокрема синтази оксиду азоту та глутатіонредуктази, що буде супроводжуватися порушенням регенерації відновленого глутатіону.

Водночас у тварин, які споживали низькопротеїнову/високосахарозну дієту, показники ферментативної активності альдозоредуктази (рис. 3.1.1) та

сорбітолдегідрогенази (рис. 3.1.2) достовірно не відрізняються від показників групи ВС. Наслідком підвищеної активності поліольного шляху може бути розвиток деяких ускладнень, зокрема нефропатія. «Дана патологія є провідною причиною хронічної хвороби нирок, що характеризується потовщенням базальної мембрани клубочків, експансією мезанглії та гломерулосклерозом. Ці зміни супроводжуються підвищенням тиску в клубочках нирок та прогресуючим зниженням швидкості клубочкової фільтрації за умов гіперглікемії» [96].

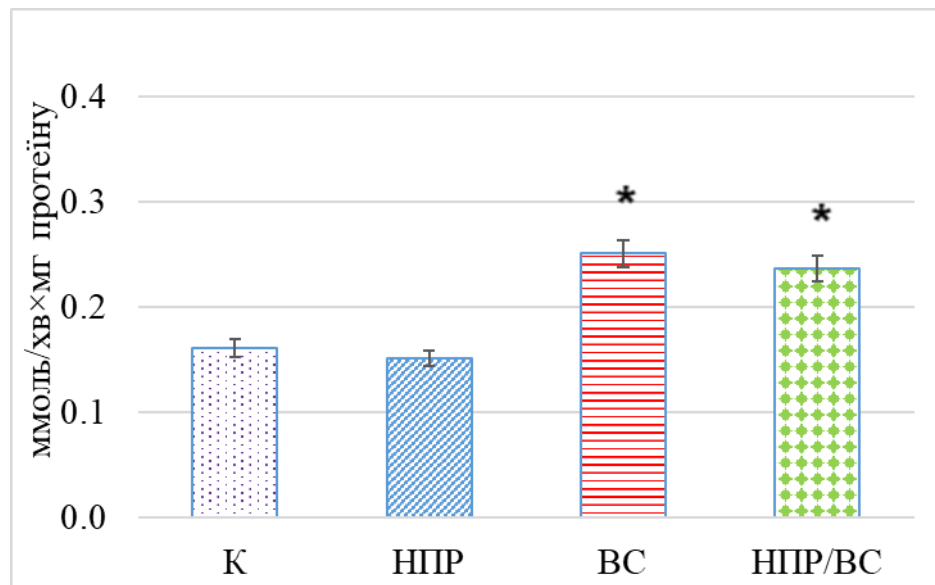


Рис. 3.1.2. Сорбітолдегідрогеназна активність у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Показано, що поліольний шлях також може продукувати метаболіти, здатні неферментативно глікувати внутрішньоклітинні білки, які можуть додатково фосфорилюватися за умов гіперглікемії. Зокрема, висока концентрація сорбітол-3-фосфату, фруктозо-3-фосфату, 3-дезоксиглюкозону та інших неідентифікованих метаболітів в еритроцитах хворих на цукровий діабет може брати участь у глікації та зшиванні білків [97]. Це підтверджує патогенетичний зв'язок між продуктами поліольного шляху (або інших шляхів метаболізму глюкози) та реакціями неферментативного глікування.

Отже, у нирках максимальне підвищення активності ензимів поліольного шляху – альдозоредуктази та сорбітолдегідрогенази – спостерігається у тварин,

які споживали високосахарозний раціон, незалежно від забезпеченості протеїном.

Оскільки активація ензимів поліольного шляху індукує окисний стрес, на наступному етапі наших досліджень було проведено визначення інтенсивності генерації супероксид-аніону та гідроксильного радикалу. Отримані результати показали, що у цитозольній фракції нирок щурів, які споживали низькопротеїновий раціон, спостерігається збереження інтенсивності генерації супероксид-аніон радикалу (рис. 3.1.3) та $\bullet\text{OH}$ (рис. 3.1.4) на рівні контрольних значень. При цьому за умов споживання високосахарозної дієти інтенсивність генерації $\text{O}_2^{\bullet-}$ зростає вдвічі, а гідроксильного радикалу – у понад 4 рази порівняно з контрольними показниками.

Відомо, що за фізіологічних умов активні форми кисню опосередковано впливають на всі компоненти клітин та відіграють важливу роль як окисно-відновні сигнальні молекули в широкому спектрі шляхів, що беруть участь у підтримці клітинного гомеостазу, регуляції ключових транскрипційних факторів, контролюючи різноманітні клітинні функції, включаючи проліферацію, диференціацію та апоптоз [16]. Проте дисбаланс у швидкості генерації АФК та їх знешкодження може безпосередньо викликати мутагенний вплив на клітини, що призводить до виникнення необоротної окисної модифікації білків, ліпідів та гліканів, геномних мутацій, що погіршує функціональну активність клітин та сприяє їх ушкодженням або загибелі [10]. За умов гіперглікемії посилене утворення АФК може бути зумовлено кількома причинами. Зокрема, в літературі [98] показано, що «надлишкове споживання сахарози може індукувати утворення низки прозапальних цитокінів, наприклад, $\text{TNF-}\alpha$ та інтерлейкіну (IL)-1 і їх рецепторів; хемокінів, зокрема хемоатрактанту моноцитів білок-1 (MCP-1), та інтерферон-(IFN-)-індукованого білка-10 (IP-10), адгезивного 2-інтегринового рецептору, більшість з яких регулюються NF- κB . Активація фактора транскрипції NF- κB (який сприяє експресії прозапальних цитокінів) зумовлює погіршення сигналізації інсуліну, впливаючи на нирки. Посилена продукція цих цитокінів призводить до порушення окисно-

відновного балансу та посилення генерації АФК, поглиблюючи запалення та окисний стрес, що розглядається як одна із причин хронізації захворювань нирок».

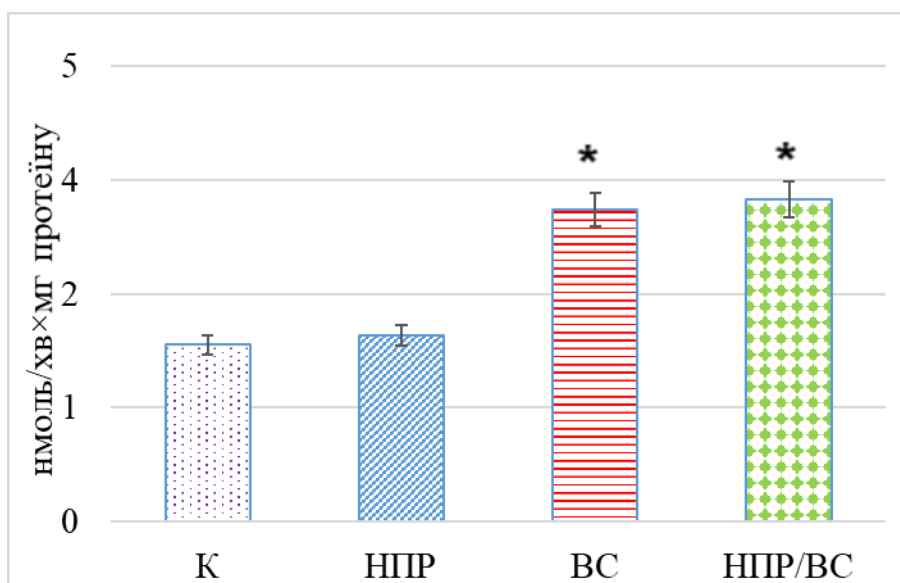


Рис. 3.1.3. Інтенсивність генерації супероксид-аніон радикалу в цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Окрім того, ензимом, який забезпечує продукування супероксид-аніон радикалу в цитозолі є ксантиноксидаза. Цей фермент каталізує реакцію окислення гіпоксантину та ксантину до сечової кислоти, при цьому може каталізувати перенесення електронів до O_2 , генеруючи як побічні продукти супероксид та пероксид водню. Ще одним шляхом генерації $O_2^{\cdot-}$ є активація індукцйбельної NO-оксидази (iNOS) за рахунок нестачі ключового субстрату L-аргініну. Показано, що надмірна активація iNOS може індукувати нітративне пошкодження та окисний стрес. Наслідком цього може бути розвиток різних ускладнень, зокрема гіпертензії у проксимальних каналцях нирок щурів [99].

H_2O_2 , на відміну від супероксид-аніон радикалу, вільно проходить через плазматичну мембрану, через що підвищує негативний вплив вільнорадикального окиснення, виступаючи попередником найбільш реакційноздатного гідроксильного радикалу. В літературі [100] показано, що пероксид водню може генеруватись за допомогою різних механізмів, включаючи реакцію дисмутації $O_2^{\cdot-}$, взаємодії іона та радикала гідроксилу з

киснем, за участі системи цитохрому Р-450, при активації α -гліцерофосфатдегідрогенази, дигідрооротатдегідрогенази, моноаміноксидази та ін. Ймовірно, за умов гіперглікемії концентрація H_2O_2 в цитозолі значно зростає, цим самим передуючи утворенню $\bullet\text{OH}$.

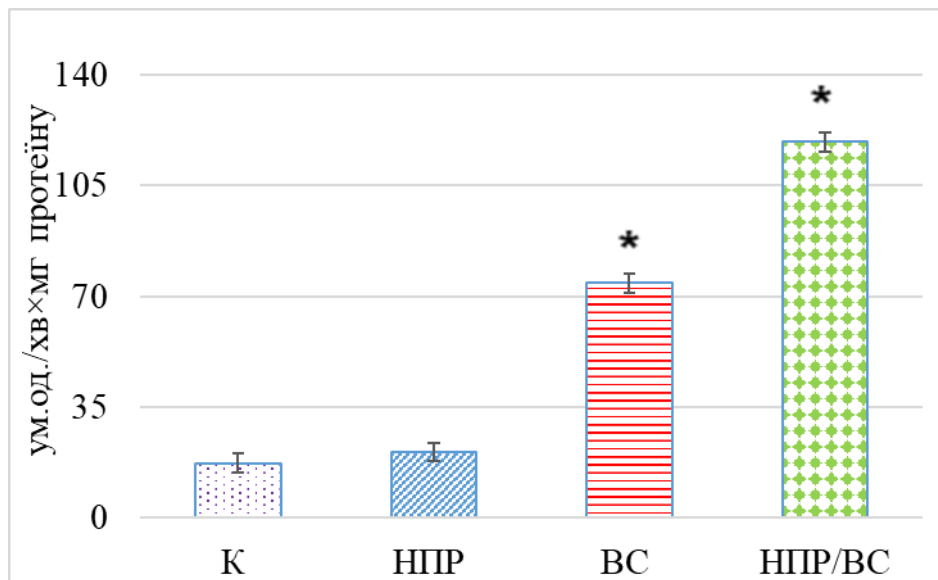


Рис. 3.1.4. Інтенсивність генерації гідроксильного радикалу в у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Слід зазначити, що у тварин, яких утримували на дієті з надмірною кількістю сахарози на тлі нестачі харчового протеїну, показники інтенсивності генерації супероксид-аніон радикалу (рис. 3.1.3) достовірно не відрізняються від показників групи ВС. Водночас за цих експериментальних умов зафіксовано найбільш виражене утворення (у 7 разів) гідроксильного радикалу (рис. 3.1.4) порівняно з показниками контролю. Враховуючи, що попередником найбільш реакційноздатного гідроксильного радикалу є пероксид водню, можна припустити, що отриманий факт свідчить про активацію перетворення H_2O_2 у гідроксильний радикал. Відомо, що в результаті реакції Фентона за умов нейтрального рН та наявності в середовищі двовалентного заліза, яке реагує з H_2O_2 , може утворюватись $\bullet\text{OH}$.

Одним із можливих механізмів посиленої генерації $\bullet\text{OH}$ в умовах гіперглікемії може бути автоокислення глюкози. При цьому важливу роль відіграють іони металів змінної валентності, зокрема Fe^{2+} , які в результаті

каскадних реакцій утворюють енедіол-аніон радикал, що бере участь в генерації $\bullet\text{OH}$ [101, 102]. Показано, що саме $\bullet\text{OH}$ є найбільш агресивним серед інших активних форм кисню, оскільки специфічного ензиму для знешкодження даного радикалу немає. Його утворення відіграє негативну роль в життєдіяльності організму, оскільки гідроксильний радикал інактивує ферменти, ушкоджує нуклеїнові кислоти, цим самим здатен проявляти і мутагенну, і цитотоксичну дії [103]. Відомо, що найбільш чутливими мішенями його впливу виступають поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) та протеїни. При цьому, діючи на тіольні групи білків, гістидинові та інші амінокислотні залишки, гідроксильний радикал призводить до денатурації, фрагментації цитозольних протеїнів та в подальшому порушення їх функціональної активності. $\bullet\text{OH}$ також відіграє ключову роль у пошкодженні ДНК, взаємодіючи з дезоксирибозою, пуринами та піримідинами.

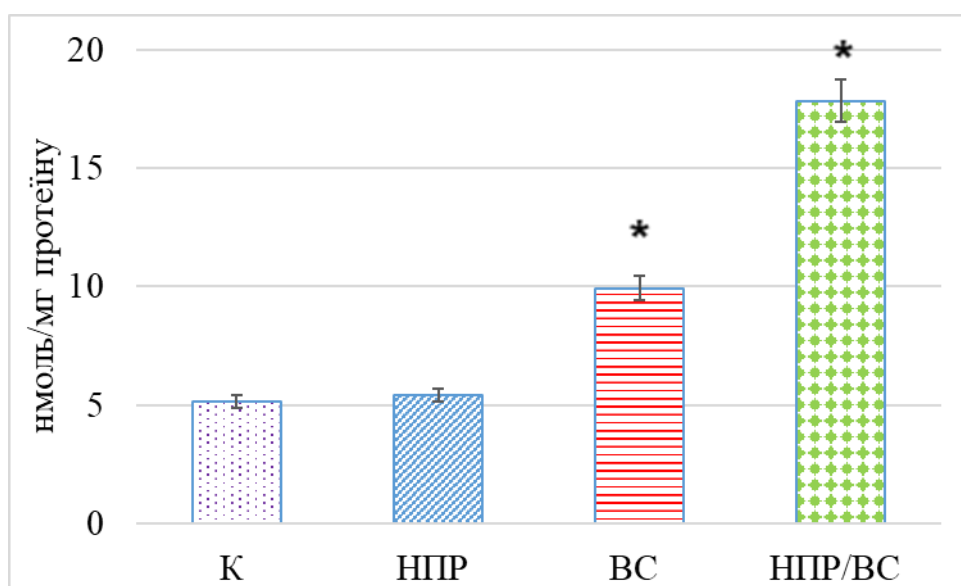


Рис. 3.1.5. Вміст ТБК-активних продуктів у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

В літературі [104, 105] показано, що в першу чергу мішенями вільнорадикального окислення виступають ліпіди. Зокрема, індикаторним показником активності окисних процесів за участі АФК є малоновий диальдегід – вторинний продукт, що утворюється в результаті каскадних реакцій пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). Показано, що при споживанні дієти з високим вмістом сахарози, спостерігається виражене підвищення вмісту ТБК-

активних продуктів у цитозольній фракції нирок щурів (рис. 3.1.5). Отримані результати узгоджуються із даними досліджень інтенсивності генерації супероксиду та гідроксильного радикалів. Ймовірно, збільшення вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів свідчить про надмірну активацію вільнорадикальних процесів [51]. Відомо, що МДА є основним і найбільш вивченим високореактивним продуктом окислення поліненасичених жирних кислот, і здатний взаємодіяти з нуклеїновими кислотами та білками, наслідком чого буде порушення функціональної активності клітин.

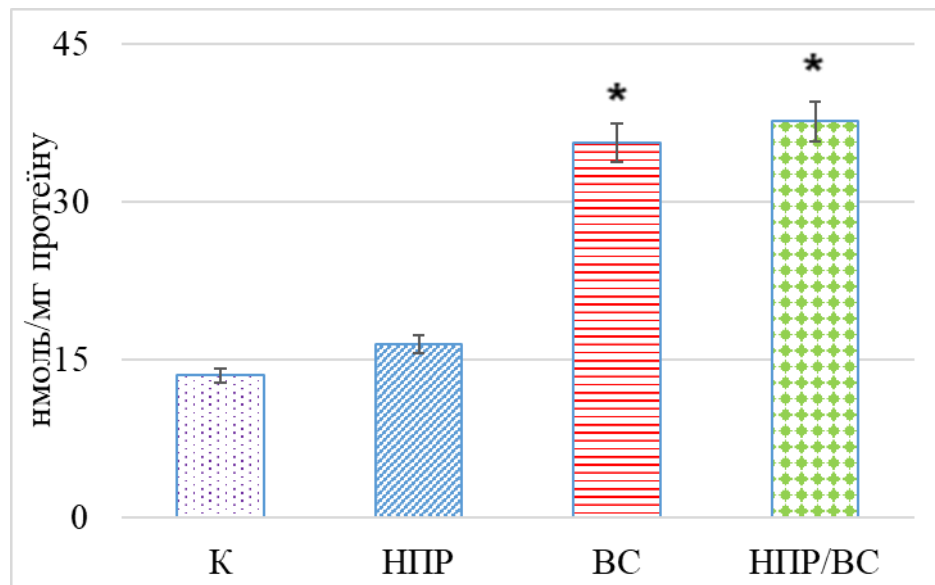


Рис. 3.1.6. Вміст білкових карбоніл-дериватів у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

В літературі показано, що ТБК-активні продукти також можуть генеруватися *in vivo* в результаті ферментативних процесів із простагландинів. Зокрема, біосинтез тромбоксану А₂ (ТХА₂) призводить до утворення малонового діальдегіду і 12-(S)-гідрокси-8,10-(E,E)-гептадекадієнної кислоти (ННТ) у вигляді вторинних продуктів [106].

Водночас у цитозольній фракції нирок щурів, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон, спостерігається максимально виражене підвищення вмісту ТБК-активних продуктів – майже в 4 рази порівняно з показниками контролю (рис. 3.1.5). Відомо, що визначення вмісту МДА широко застосовується в експериментальних дослідженнях, оскільки даний продукт виступає зручним біомаркером для визначення інтенсивності

процесів пероксидного окислення ліпідів через його швидку реакцію з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [107].

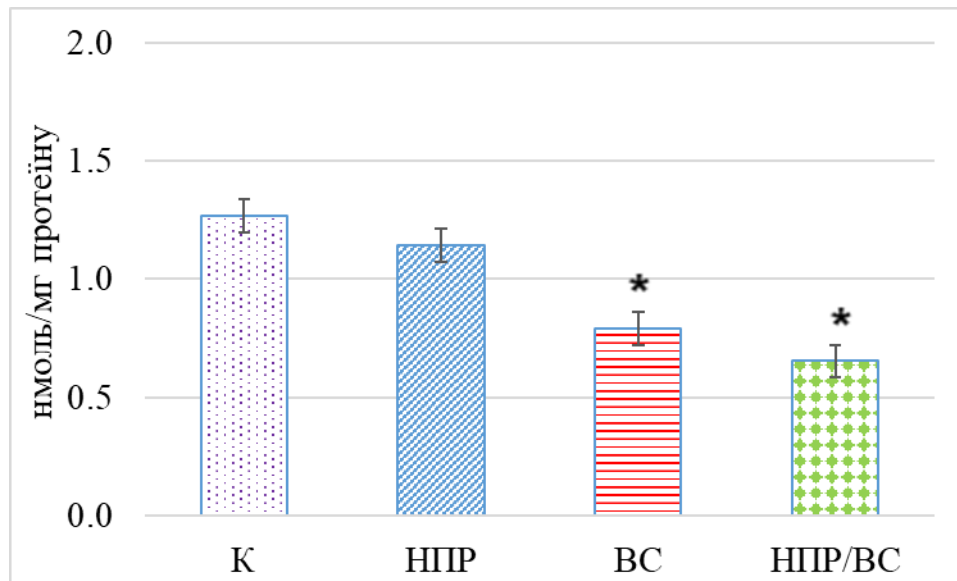


Рис. 3.1.7. Вміст вільних тіольних груп у цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Також нами показано, що в цитозольній фракції нирок білок-дефіцитних щурів за умов споживання низькопротеїнового раціону змін вмісту карбонільних похідних (рис. 3.1.6) та вільних SH-груп (рис. 3.1.7) не спостерігається. При цьому за умов утримання тварин на високосахарозній дієті вміст карбоніл-дериватів підвищується у 3 рази (рис. 3.1.6) на тлі зниження вмісту вільних тіольних груп (рис. 3.1.7). Посилене окисне ушкодження цитозольних протеїнів можна пов'язати з надлишковою емісією супероксиду та гідроксильного радикалів в гіперглікемічних умовах. Отже, можна припустити, що окисний стрес за умов гіперглікемії відіграє ключову роль в патогенезі функціональних та структурних ушкоджень каналців та клубочків нирок [108].

Водночас найбільш виражена інтенсифікація вільнорадикальних ушкоджень SH-груп цитозольних протеїнів нирок спостерігається у тварин, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон. Зокрема, зафіксовано зниження вмісту вільних SH-груп вдвічі (рис. 3.1.7) порівняно з показниками контролю. Наслідком встановленого нами зниження вмісту вільних тіольних груп з одночасним накопиченням карбоніл-дериватів за умов гіперглікемії буде порушення структурно-функціональної організації цитозольних протеїнів [73].

3.2. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Відомо, що зміна співвідношення в раціоні основних макронутрієнтів може супроводжуватися порушенням низки метаболічних процесів у різних органах. Особливий інтерес викликає питання механізмів розвитку різних ускладнень у нирках як важливого гомеостатичного органу з високою швидкістю окисного метаболізму [109]. Показано, що за умов гіперглікемії може спостерігатись посилене вільнорадикальне ушкодження мітохондріальних протеїнів. Зокрема, існує велика кількість експериментальних досліджень, що демонструють посилене виробництво мітохондріальних активних форм кисню, викликане незбалансованим харчуванням [110]. Тому дисбаланс поживних речовин є одним з факторів, що викликають порушення антиоксидантного балансу і надмірну генерацію АФК.

Нами показано, що за умов споживання низькопротеїнової дієти в мітохондріальній фракції нирок щурів посиленої генерації супероксид-аніону (рис. 3.2.1) та гідроксильного радикалу (рис. 3.2.2) не спостерігається. Натомість у групи щурів, яка отримувала високосахарозний раціон, інтенсивність генерації $O_2^{\cdot-}$ зростає у понад 4 рази (рис. 3.2.1), $\cdot OH$ – втричі (рис. 3.2.2) порівняно з показниками контролю. Ймовірно, в результаті надлишкового надходження сахарози в організм може спостерігатись інтенсифікація циклу трикарбонових кислот за рахунок збільшення надходження субстратів, що призводить до підвищення активності електронотransпортного ланцюга мітохондрій – одного із ключових джерел активних форм кисню. Супероксид-аніон радикал є основним окислювачем, який виступає попередником всіх інших АФК. Показано, що «в результаті дисмутації $O_2^{\cdot-}$ супероксиддисмутазою може генеруватись пероксид водню. Біологічна активність H_2O_2 значно залежить від його вмісту: за невисоких концентрацій сполука відносно низькореактивна, а з ростом концентрації реакційна здатність підвищується; при цьому H_2O_2 може ушкоджувати біологічні молекули» [100]. Пероксид водню може або нейтралізуватись за

допомогою ензимів системи антиоксидантного захисту, зокрема глутатіонпероксидази чи каталази, або давати початок найбільш реакційноздатному гідроксильному радикалу за умов наявності в середовищі іонів металів змінної валентності.

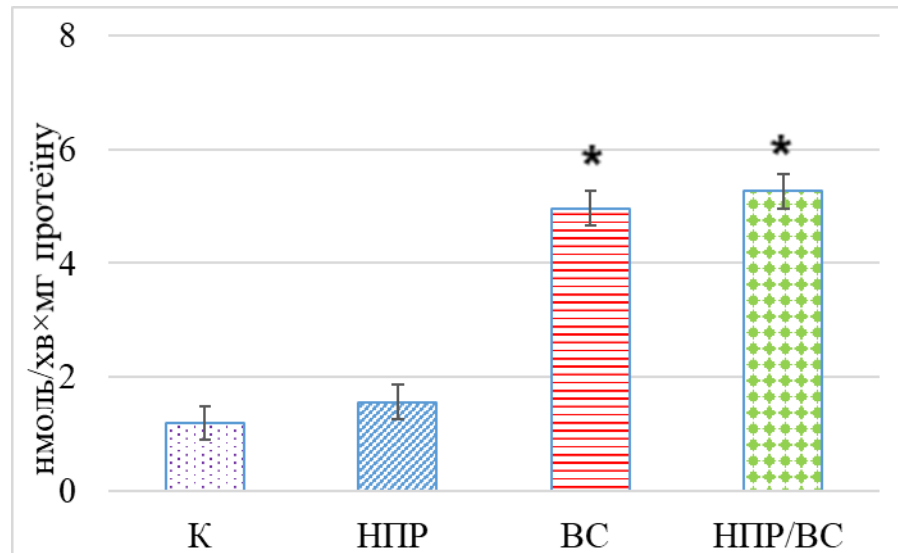


Рис. 3.2.1. Вміст супероксид-аніон радикалу в мітохондріях нирок щурів за умов нутрієнтного дисбалансу

Окрім того показано, «що у тварин, які споживали 5%-розчин сахарози, виявлено значне зниження білка UCP-1, що у нормі контролює протонний градієнт та запобігає надмірному утворенню АФК» [111]. Тому зниження вмісту цього білка буде індукувати продукування активних форм кисню, зокрема супероксиду. Ще один механізм посиленого утворення АФК у нирках за умов споживання високосахарозного раціону може бути зумовлений індукцією фактора транскрипції SREBP-1, що посилює експресію NADPH-оксидази. Відомо, що даний фермент прискорює відновлення кисню, оскільки приймає відновлений еквівалент від NADPH.

До того ж, за умов надлишкової емісії АФК може спостерігатись пошкодження мітохондріальних макромолекул, при цьому найчутливішими є ензими циклу лимонної кислоти і мітохондріального електронтранспортного ланцюга [112]. Також в літературі [109] показано, що існує певна кореляція між функціональним станом нирок та здатністю мітохондрій підтримувати співвідношення NADH/NAD⁺. Зниження співвідношення NADH/NAD⁺ може

бути однією із причин розвитку окисного стресу в мітохондріях нирок щурів, тому утворення АФК на рівні, який перевищує потенційні антиоксидантні властивості, є біомаркером мітохондріальної дисфункції нирок.

Необхідно зазначити, що наслідком порушення окисного фосфорилювання буде подальше збільшення генерації АФК, зниження вмісту АТФ та мітохондріального мембранного потенціалу, що може розглядатися як наслідок посиленого окисного стресу [109]. За цих умов може спостерігатись недостатнє знешкодження або надлишкове утворення АФК, що, в свою чергу, призведе до дисметаболических порушень [113]. Мітохондріальна дисфункція в поєднанні з окисним стресом, при якому продукується надмірна кількість АФК, за стресових умов негативно впливає на основні гомеостатичні функції. Зокрема, може спостерігатись порушення утворення антиоксидантних ензимів, пошкодження макромолекул, інтенсифікація роботи електронтранспортного ланцюга, що буде супроводжуватись збільшенням концентрації вільних радикалів та активацією загибелі клітин.

Необхідно відмітити, що у тварин, яких утримували на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні, показники інтенсивності супероксид-аніон радикалу (рис. 3.2.1) достовірно не відрізняються від показників групи ВС. При цьому, за даних експериментальних умов показано максимально виражене продукування (у 5 разів) $\bullet\text{OH}$ порівняно із контрольними показниками (рис. 3.2.2). Отримані результати повністю узгоджуються із показниками визначення вмісту супероксиду та гідроксильного радикалів у цитозольній фракції нирок щурів за умов нутрієнтного дисбалансу. Ймовірно, це вказує на недостатню активацію ланки антиоксидантного захисту, зокрема, каталази та глутатіонпероксидази, що також показано попередніми дослідженнями [114].

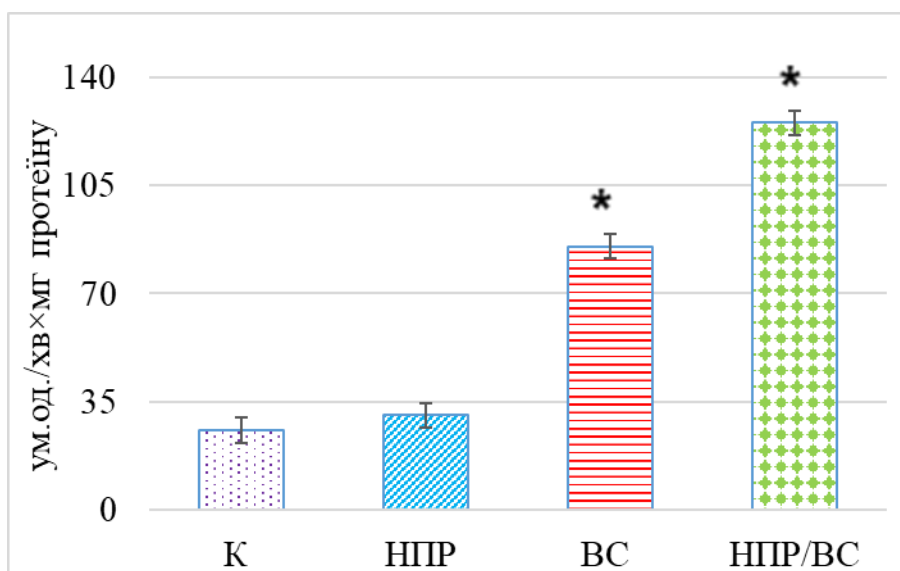


Рис. 3.2.2. Інтенсивність генерації гідроксильного радикалу в мітохондріях нирок щурів за умов нутрієнтного дисбалансу

Варто зазначити, що головною мішенню для вільнорадикальних реакцій є ліпіди, а саме поліненасичені жирні кислоти. Зокрема, в літературі [53] показано, що генерація АФК в біомембранах дуже висока через розчинність молекулярного кисню. При цьому, мембранні фосфоліпіди, що містять високі рівні ПНЖК, надзвичайно чутливі до атак АФК. Більше того, самі ПНЖК перетворюються на реакційноздатні вільні радикали після реакції з АФК, які здатні поширювати ланцюгові реакції пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) [55]. При цьому процес ПОЛ є головним джерелом різних цитотоксичних продуктів, наприклад, альдегідів. Тому наступним етапом наших досліджень було визначення вмісту ТБК-активних продуктів, зокрема малонового діальдегіду (МДА).

Результати наших досліджень показали, що в мітохондріях нирок щурів за умов споживання низькопротеїнового раціону вміст ТБК-активних продуктів зберігається на рівні контрольних значень (рис. 3.2.3). Показано, що МДА утворюється в ході каскадного процесу пероксидного окислення жирних кислот, що містять три або більше подвійних зв'язків (ліноленова і арахідонова кислоти, відповідно).

Водночас нами продемонстровано збільшення вмісту малонового діальдегіду в 3,5 рази порівняно з показниками контролю (рис. 3.2.3). При

цьому, МДА, взаємодіючи з аміногрупами протеїнів і фосфоліпідами, буде утворювати міжбілкові, міжліпідні та ліпідбілкові зв'язки, що може виступати однією із причин порушення функціональної активності клітинних мембран. Також продукти пероксидного окислення ліпідів здатні окислювати вільні SH-групи, що призводить до зміни активності ензимів мембран [115].

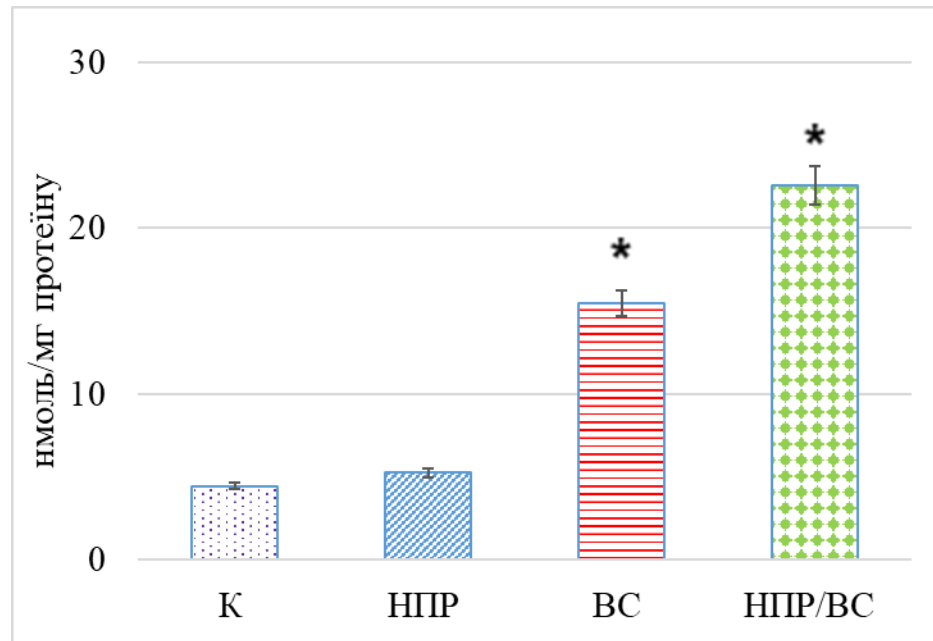


Рис. 3.2.3. Вміст ТБК-активних продуктів у мітохондріях нирок щурів за умов нутрієнтного дисбалансу

Слід зазначити, що у мітохондріальній фракції нирок щурів, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон, нами показано максимально виражене підвищення вмісту ТБК-активних продуктів – у понад 5 разів порівняно із контрольними значеннями (рис. 3.2.3). Отримані результати узгоджуються із даними досліджень інтенсивності генерації супероксиду та гідроксильного радикалів. Ймовірно, збільшення вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів та окисної модифікації білків свідчить про надмірну активацію вільнорадикальних процесів за умов посиленої генерації АФК. Також нами показано, що в мітохондріальній фракції нирок тварин, які перебували на низькопротеїновому раціоні, змін вмісту вільних SH-груп (рис. 3.2.4) та карбонільних похідних (рис. 3.2.5) не спостерігається. Водночас за умов утримання щурів на високосахарозній дієті вміст вільних тіольних груп знижується вдвічі (рис. 3.2.4) на тлі підвищення вмісту карбонільних похідних

– у понад 2,5 рази (рис. 3.2.5). Це свідчить про інтенсифікацію реакцій вільнорадикального окислення мітохондріальних протеїнів за досліджуваних умов. Показано, що однією із причин посиленого окисного ушкодження мітохондріальних білків може бути надлишкова емісія АФК, зокрема супероксид-аніон радикалу I-м і III-м комплексом електронотранспортного ланцюга за умов гіперглікемії [116]. Окрім того, в літературі [117] показано, що АФК, які генеруються за рахунок «втечі» електронів на O_2 , можуть ушкоджувати мітохондріальну ДНК, що призводить до порушення синтезу закодованих у ній протеїнів.

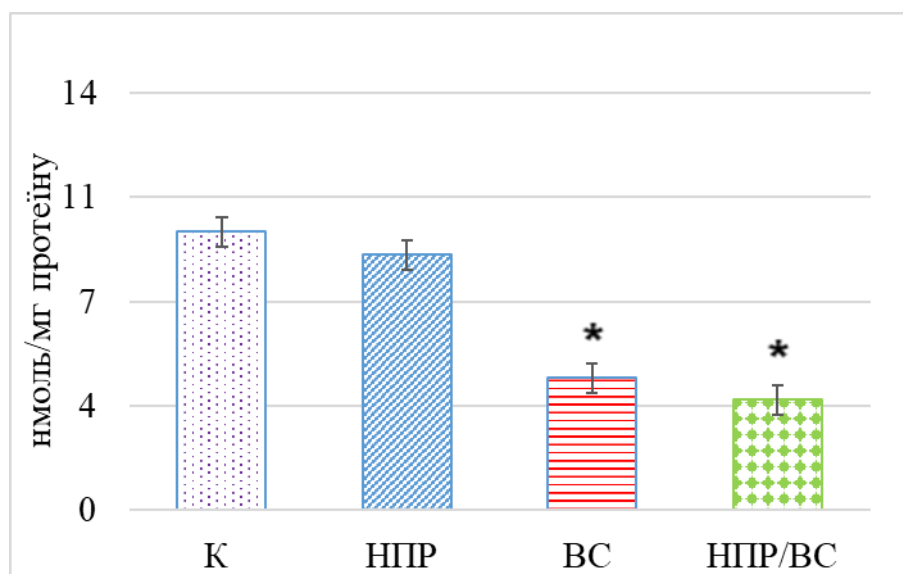


Рис. 3.2.4. Вміст вільних тіолових груп у мітохондріях нирок щурів за умов нутрієнтного дисбалансу

Натомість у групи щурів, яка споживала низькопротеїновий/високосахарозний раціон, вміст вільних SH-груп (рис. 3.2.4) достовірно не відрізняється від показників групи BC. Водночас нами зафіксовано максимально виражене накопичення карбонільних похідних – у понад 3 рази (рис. 3.2.5) порівняно зі значеннями контрольної групи.

В літературі [118] показано, що за умов гіперглікемії окисний стрес у нирках може розвиватись за допомогою різних механізмів, включаючи зниження активності антиоксидантної системи, неферментативне глікозилювання білків, автоокислення глюкози та активацію ензимів поліольного шляху. Зокрема, посилена активація досліджуваних нами ензимів

поліольного шляху – альдозоредуктази та сорбітолдегідрогенази може розглядатись як одна із причин встановленого нами посиленого вільнорадикального ушкодження мітохондріальних білків за даних експериментальних умов. Наслідком цього може бути зменшення співвідношення $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, накопичення сорбітолу, збільшення вмісту внутрішньоклітинної фруктози та підвищення співвідношення NADH/NAD^+ , що сприяє розвитку окисно-відновного дисбалансу, і, як наслідок, поглиблення окисного стресу [9].

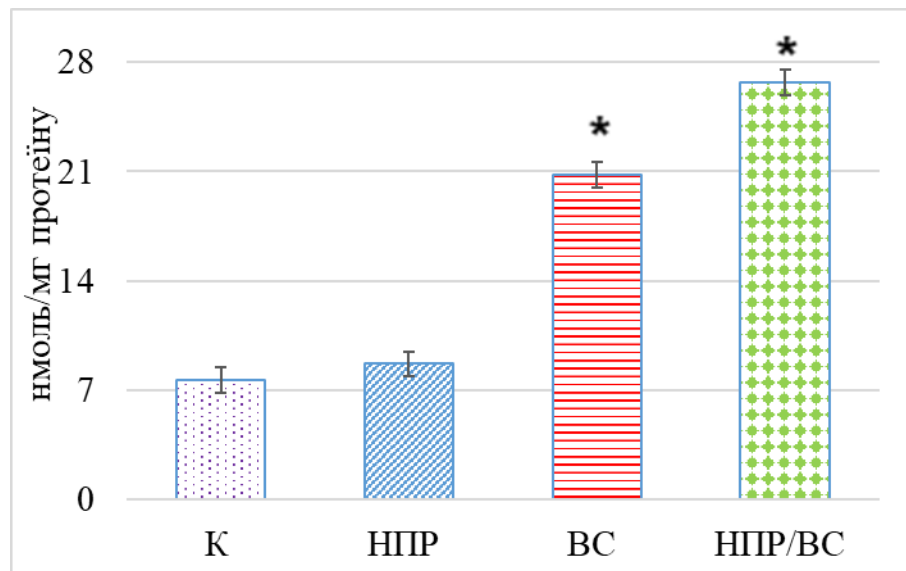


Рис. 3.2.5. Вміст білкових карбоніл-дериватів у мітохондріях нирок щурів за умов нутрієнтного дисбалансу

Виявлені зміни інтенсивності генерації супероксид-аніону та гідроксильного радикалів, посилене накопичення вмісту протеїнових SH-груп, карбоніл-дериватів як біохімічних маркерів окисної модифікації білків та ТБК-активних продуктів як маркерів пероксидного окислення ліпідів можна розглядати як один із механізмів розвитку мітохондріальної дисфункції та порушення функціональної активності нирок за умов нутрієнтного дисбалансу.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що за умов утримання щурів на низькопротеїновій дієті показники альдозоредуктазної та сорбітолдегідрогеназної активностей, інтенсивності генерації супероксид-аніону та гідроксильного радикалу в цитозольній фракції нирок зберігаються на рівні контрольних значень. При цьому змін інтенсивності вільнорадикальних процесів у мітохондріальній та цитозольній фракціях не спостерігається, про що свідчить збереження вмісту ТБК-активних продуктів, білкових карбоніл-дериватів та вільних тіолових груп на рівні показників контрольної групи тварин.

2. Встановлено, що у нирках максимальне підвищення активності ензимів поліольного шляху – альдозоредуктази та сорбітолдегідрогенази – спостерігається у тварин, які споживали високосахарозний раціон, незалежно від забезпеченості протеїном. Водночас максимальна інтенсифікація вільнорадикальних процесів, що супроводжується посиленою генерацією $O_2^{\bullet-}$ та $\bullet OH$, накопиченням ТБК-активних продуктів як маркерів процесу ПОЛ та білкових карбоніл-дериватів на тлі зниження вмісту вільних тіолових груп як маркерів окисної модифікації білків, характерна для тварин, які споживали низькопротеїновий/високо-сахарозний раціон.

Отримані результати можуть розглядатися як передумови для поглиблення метаболічних порушень у нирках за умов нутрієнтного дисбалансу.