

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

**АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМІВ У
МІТОХОНДРІАЛЬНІЙ ФРАКЦІЇ НИРОК ЩУРІВ ЗА УМОВ
ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ НА ТЛІ БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ**

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:
студентка VI курсу, групи 600-М
спеціальності 091 – Біологія
освітня програма – біохімія та лабораторна
діагностика
ТЕТЯНА ВІТАЛІЇВНА ЛУЧИК

Керівник: к.б.н., доцент Оксана ВОЛОЩУК

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від " ____ " _____ 2022 р.
зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

Чернівці-2022

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню активності антиоксидантних ензимів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності в мітохондріальній фракції нирок щурів.

Встановлено, що у тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, достовірних змін швидкості генерації гідроксильного радикалу, вмісту дієнових кон'югатів та кетодієнів, а також вмісту відновленого убіхінону та активності каталази і супероксиддисмутази порівняно з контролем не спостерігалось. Водночас у нирках тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном спостерігалася інтенсифікація продукції гідроксильного радикалу, накопичення вмісту кетодієнів і дієнових кон'югатів, на тлі зниження вмісту відновленого убіхінону, та активності супероксиддисмутази і каталази.

Максимально виражена інтенсифікація вільнорадикального ушкодження мітохондріальних ліпідів та зниження активності супероксиддисмутази і каталази характерна для тварин, яким моделювали токсичне ураження на тлі білкової недостатності.

Ключові слова: ацетамінофен, гідроксильний радикал, дієнові кон'югати, кетодієни, супероксиддисмутаза, каталаза, відновлений убіхінон.

ANNOTATION

The master's thesis is devoted to the study of the activity of antioxidant enzymes under conditions of toxic damage against the background of protein deficiency in the mitochondrial fraction of rat kidneys.

It was established that in animals that consumed a low-protein diet, there were no significant changes in the rate of hydroxyl radical generation, the content of diene conjugates and ketodienes, as well as the content of reduced ubiquinone and the activity of catalase and superoxide dismutase compared to the control. At the same time, in the kidneys of animals with acetaminophen toxic damage, the intensification of hydroxyl radical production, the accumulation of the content of ketodienes and diene conjugates, against the background of the decrease in the content of reduced ubiquinone, and the activity of superoxide dismutase and catalase were observed.

The maximally pronounced intensification of free radical damage to mitochondrial lipids and a decrease in the activity of superoxide dismutase and catalase is characteristic of animals that were modeled with toxic damage against the background of protein deficiency.

Key words: acetaminophen, hydroxyl radical, diene conjugates, ketodienes, superoxide dismutase, catalase, reduced ubiquinone.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Вплив нутрієнтного дисбалансу на метаболічні процеси в організмі.....	7
1.2. Поняття про окисний стрес.....	11
1.3. Механізми токсичності ацетамінофену.....	14
1.4. Механізми ушкоджуючої дії дієнових кон'югатів та кетодієнів.....	17
1.5. Убіхінон як неферментативний антиоксидант.....	18
1.6. Ферментативні шляхи захисту від окисного стресу.....	19
1.6.1. Особливості будови та біологічної дії супероксиддисмутази.....	19
1.6.2. Особливості будови та біологічної дії каталази.....	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	27
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35
ДОДАТКИ.....	40

ВСТУП

Окисний стрес – це явище, яке спровоковане дисбалансом між продукуванням активних форм кисню (АФК) та їх накопиченням у клітинах чи тканинах і спроможністю біологічної системи їх знешкодити [1]. Активні форми кисню, які утворюються в процесі оксидативного стресу, пошкоджують усі біологічні структури. АФК із клітин шляхом простої дифузії або по аніонних каналах надходять у позаклітинний простір та плазму. Наслідки їх шкідливого впливу залежать від природи АФК та молекул мішеней.

АФК здатні викликати деструкцію ліпідів і білків плазматичних мембран, що призводить до їх деполімеризації та лізису клітин. Білки мембран виконують роль мембранних насосів та забезпечують їхню вибірккову проникність. Під дією АФК відбувається модифікація білків зі зміною їхньої структури та подальшим видаленням за допомогою окислення чи перегрупування дисульфідних зв'язків. Окислення білків відбувається під дією вільного кисню O_2 та АФК. Вільні радикали сприяють окиснювальній деструкції білків, порушенню структур ДНК та РНК, а також зниженню ферментативної активності мембран. Внаслідок взаємодії з оксидом азоту утворюються пероксинітри. Вони порушують гомеостаз кальцію, блокують ензими дихального ланцюга мітохондрій, активують внутрішньоклітинні ферменти, що, врешті, призводить до загибелі клітини [2].

Посилене утворення вільних радикалів, у тому числі гідроксильного, і токсичних продуктів ПОЛ, зокрема первинних – дієнових кон'югатів та кетодієнів, є одним з наслідків оксидативного стресу в організмі. В організмі, для боротьби з ними, функціонує антиоксидантна система (АОС), за допомогою якої досягається динамічна рівновага між утворенням та нейтралізацією вільних радикалів. Невід'ємними компонентами АОС є супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза. Дані ферменти, будучи

антиоксидантами, перешкоджають утворення високотоксичних радикалів та забезпечують ефективний захист клітинних структур від руйнування [2].

Тому *метою роботи* було дослідження активності супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) та каталази (КФ 1.11.1.6), а також вмісту дієнових кон'югатів і кетодієнів у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності.

Для досягнення мети були поставлені наступні *завдання*:

1. Визначити вміст дієнових кон'югатів і кетодієнів у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності.

2. Дослідити активність супероксиддисмутази та каталази в мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності.

3. Визначити вміст відновленого убіхінону за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вплив нутрієнтного дисбалансу на метаболічні процеси в організмі

Живі організми потребують значної кількості різних мікро- та макроелементів, що мають вирішальне значення як для їх розвитку, так і для запобігання цілому ряду захворювань. Дефіцит поживних речовин виникає тоді, коли організм не засвоює або не отримує з їжі необхідну кількість потрібних нутрієнтів.

Харчування – це ключовий фактор розвитку людини, який також виступає детермінантом якості життя протягом усього життєвого циклу та загального розвитку. Повне або часткове голодування впливає на цілий ряд ключових систем органів, таких як дихальна, опорно-рухова, м'язова, шлунково-кишкова, імунна. Недоїдання впливає не лише на показники смертності та захворюваності, але й на фізичний ріст та інтелектуальний розвиток, здатність навчатися і продуктивність праці, майже на всі аспекти людського й соціального розвитку [3]. Дефіцит багатьох поживних речовин (тобто вітамінів і мінералів) заважає майже третині людей у світі реалізувати свій повний фізичний та розумовий потенціал [4].

Білки – життєво необхідні речовини в організмі, які використовуються в якості джерела енергії, будівельного матеріалу для регенерації клітин, утворення ферментів і гормонів. Вони повинні давати приблизно 15 % калорійності добового раціону. До їхнього складу входять амінокислоти, які поділяються на замінні і незамінні. Чим більше білки містять незамінних амінокислот, тим повноціннішими вони є [5].

Поширеність недоїдання значно знизилася за останні 30 років. Незважаючи на це, воно залишається основною причиною захворювань і смерті дітей у всьому світі, особливо в країнах з низьким і середнім рівнем заробітку. Маразм і квашіоркор є найбільш небезпечними для життя формами недоїдання [5]. Синдром квашіоркору – це форма важкої білково-

енергетичної недостатності, що характеризується дефіцитом білка та двостороннім набряком кінцівок [6].

Маразм – важкий прояв білково-енергетичної недостатності. Виникає в результаті зниження загальної калорійності. Це призводить до значної втрати жирової тканини та м'язів. Співвідношення ваги до зросту дитини може бути більш ніж на 3 стандартних відхилення нижчим від середнього для віку чи статі. У дитини з маразмом може розвинутися точковий набряк через недостатність білка – маразматичний квашіоркор [7].

Білково-енергетична недостатність (БЕН) досить широко поширена проблема, особливо в країнах, що розвиваються. Дефіцит білка впливає на транспорт багатьох основних поживних речовин, які зазвичай зв'язуються з носіями білка в плазмі, і, таким чином, корекція синтезу білка покращує очевидний дефіцит певних поживних речовин. Дисбаланс між дієтичним білком і споживанням енергії пов'язаний з відносно високим рівнем інсуліну і низьким рівнем кортизолу в плазмі, що перешкоджає мобілізації м'язового білка з периферійних відділів у вісцеральні. Дефіцит білка, що виникає в результаті цього, в основному порушує синтез білка в печінці. Відповідні низькі рівні сироваткових білків, зокрема альбуміну (набряк), феритину (анемія), церулоплазміну (депігментація волосся), ретинолзв'язуючого білка (ксерофтальмія) та ліпопротеїнів (жирова інфільтрація печінки) можуть найкраще пояснити клінічні ознаки квашіоркору. Дефіцит білка впливає на транспортування багатьох основних поживних речовин, які зазвичай зв'язуються з білком, що транспортується в плазмі, і, таким чином, корекція синтезу білка покращує очевидний дефіцит певних поживних речовин. Збій у роботі антиоксидантних систем, які залежать від надходження сульфуровмісних амінокислот, також був залучений до патогенезу квашіоркору. Неправильне харчування сприяє подовженню хвороби та госпіталізації, впливає на кінцевий результат багатьох специфічних патологічних процесів, перешкоджаючи імунній функції Т-клітин та іншим механізмам захисту організму [3].

Вуглеводи є одним з основних джерел енергії, що повинні давати приблизно 50% калорійності добового раціону. За наявності надлишку вуглеводів в організмі, відбувається їхнє перетворення в жири. Тобто, надмірна кількість вуглеводів сприяє ожирінню [5].

Харчовий ланцюг утилізації вуглеводів включає їхній гідроліз в порожнині тонкої кишки за рахунок α -амілази, яка надходить у складі панкреатичного соку, а також на її поверхні за рахунок абсорбованої з хімусу α -амілази та γ -амілази, котра продукується кишковими клітинами. На апікальній поверхні мембран епітеліоцитів завдяки мембранозв'язаним ферментам проходить заключна стадія травлення. Проникнення гідролізованих вуглеводів через апікальну мембрану епітеліоцитів здійснюється за допомогою пасивного і активного транспорту, а також способом полегшеної дифузії.

Процеси всмоктування моносахаридів в тонкій кишці здійснюються транспортними системами з використанням двох видів переносників. Один з них просторово групується з ферментами, утворюючи ферментно-транспортні ансамблі. Між порожнинним та мембранним травленням існує позитивний двосторонній зв'язок, який формується на рівні транспортних комплексів і який забезпечує максимальну ефективність механізмів утилізації гідролізованих вуглеводів. Так, вуглеводи – доволі сильні подразники зовнішньої секреції підшлункової залози. Зокрема, вони є найактивнішими стимуляторами синтезу інсуліну [8].

Інсулін є найважливішим анаболічним гормоном [9], який виконує важливу роль у регулюванні вуглеводного обміну та підтриманні оптимального для організму гомеостазу глюкози. Багаторічне аліментарне перевантаження легкозасвоюваними вуглеводами спершу викликає гіперплазію β -клітин, а надалі може призвести до ослаблення інсулярного апарату та створення сприятливих умов для розвитку цукрового діабету [8].

Глюкоза – це моносахарид, який засвоюється тканинами й органами, для яких мітохондріальне дихання є частково або повністю недоступним,

запобігає надлишковим втратам води організмом, підсилює окисно-відновні процеси, стимулює скорочувальну здатність міокарду та поліпшує антитоксичну функцію печінки. Таким чином, глюкоза є енергетичним субстратом, який забезпечує живлення тканин та клітин для їхнього відновлення. Важливо, що засвоюваність глюкози у стані стресу залежить від інсулінорезистентності, адекватності перфузії [10].

Вважається, що метаболізм фруктози не залежить від інсуліну. Вона повільніше абсорбується, а її споживання завжди супроводжується гіперглікемією і гіперінсулінемією. Метаболізується переважно в тканині печінки, перетворюючись, головним чином, на глікоген [8].

Сучасні рекомендації передбачають обмеження споживання цукру, щоб запобігти збільшенню ваги та сприяти повноцінному харчуванню. Однак, споживання фруктози в організмі людини спричиняє збільшення вісцерального ожиріння, порушення регуляції ліпідів і зниження чутливості до інсуліну [11].

Вживання фруктози підвищує рівень холестеролу і ЛПДНЩ у сироватці крові. Ймовірно, що підвищення рівня ліпідів у сироватці крові за дії сахарози пов'язане з фруктозною частиною молекули. Отож, сахарозу слід розглядати як продукт, який здатний пришвидшувати чистий ліпідний синтез. Відомо також, що споживання високосахарозної дієти спричиняє зниження концентрації антисклеротичних ЛПВЩ та зв'язаного з ними холестеролу [8].

Жири – основне джерело енергії в організмі, які містять цінні для організму речовини: ненасичені жирні кислоти, фосфатиди, жиророзчинні вітаміни А, Е, К. Повинні давати приблизно 35 % калорійності добового раціону. Найбільшу цінність для організму представляють жири, що містять ненасичені жирні кислоти, тобто жири рослинного походження.

Крім білків, жирів і вуглеводів найважливішою складовою раціонального харчування є вітаміни – біологічно активні органічні сполуки, нестача яких може призводити до гіпо- або авітамінозу [5].

1.2. Поняття про окисний стрес

Малорухливість, надмірна вага та недоїдання призводять до збільшення виробництва активних форм кисню, що призводить до стану окисного стресу [12].

АФК – це або вільні радикали, реакційноздатні аніони, що містять атоми кисню, або молекули, що містять атоми кисню, які можуть утворювати вільні радикали або хімічно активуються ними. Прикладами є гідроксильний радикал, супероксид, пероксид водню та пероксинітрит. Основним джерелом АФК *in vivo* є аеробне дихання, хоча АФК також утворюються в процесі пероксисомного β -окислення жирних кислот, метаболізму ксенобіотичних сполук мікросомальним цитохромом Р450, стимуляції фагоцитозу патогенами або ліпополісахаридами, метаболізму аргініну [13]. Активні форми кисню також можуть утворюватися для ініціювання внутрішньоклітинної сигналізації та антимікробної активності. Загальне явище полягає в підтримці рівня АФК у клітині антиоксидантними ферментами та молекулами антиоксидантів, присутніми в клітинах [14].

Активні форми кисню та азоту викликають окислювальний стрес і традиційно вважаються шкідливими. З іншого боку, контрольоване виробництво окислювачів у нормальних клітинах служить корисним цілям для регулювання сигнальних шляхів. Активні окислювачі врівноважуються складними системами антиоксидантного захисту, які регулюються мережею шляхів, щоб гарантувати, що реакція на оксиданти відповідає потребам організму [15].

Окисдаційне пошкодження клітин є результатом індукованих АФК змін макромолекул, таких як поліненасичені жирні кислоти в мембранних ліпідах, білках і ДНК. Крім того, окислювальний стрес і АФК були залучені до патологічних станів, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, рак і старіння [16].

Існують різні типи джерел окисного стресу, опосередкованого харчуванням, які викликають запалення. Окиснювальний стрес відіграє вирішальну роль у розвитку багатьох захворювань людини. Активні форми кисню і активні форми азоту (АФА) виробляються безперервно в організмі через окиснювальний метаболізм, мітохондріальну біоенергетику та імунну функцію. Найпоширеніші форми АФК – супероксидний аніон, пероксид водню, синглетний кисень, гіпохлорит, гідроксильний радикал – можуть зв'язуватися з нуклеїновими кислотами, ферментами, мембранними ліпідами, білками та іншими молекулами. Короточасний постпрандіальний мітохондріальний окиснювальний стрес викликає запалення, яке в основному опосередковується ядерним фактором каппа Б (NF- κ B). І, навпаки, тривалий хронічний окисний стрес викликає постійні стани запалення через утворення білої жирової тканини, яка виділяє прозапальні фактори [18].

Шкідливий вплив вільних АФК та АФА викликає потенційне біологічне пошкодження. АФК утворюються в нормальному аеробному метаболізмі як побічний продукт, проте їх рівень підвищується під час стресу [18].

АФК є високоактивними формами кисню, що не дифундують швидко з клітин, оскільки основне місце продукування АФК знаходиться у внутрішній мітохондріальній мембрані. Детоксикація АФК відбувається в місцях їх генерації, зокрема у мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі та цитозолі. Пероксид водню не вважається вільним радикалом за визначенням, оскільки в ньому відсутні вільні електрони. Оксид азоту вважається вільним радикалом, який також бере участь у пошкодженні, опосередкованому АФК. Однак оксид азоту має подвійну природу: як корисну, так і шкідливу [19, 20, 21]. Коли присутній надлишок оксиду азоту, ця реакція призводить до утворення радикалу діоксиду азоту [18].

Вільні радикали кисню, включаючи алкілпероксильний радикал, гідроксильний радикал і супероксидний аніон-радикал, є потужними ініціаторами пероксидного окислення ліпідів, роль яких добре встановлена в

патогенезі низки хвороб. Як тільки пероксидне окислення ліпідів ініціюється, ланцюгові реакції триватимуть до тих пір, поки не утворюються продукти термінації. Так, кінцеві продукти пероксидного окислення ліпідів накопичуються в біологічних системах. Азотисті основи ДНК дуже чутливі до окислення АФК, і основним продуктом окиснення основ ДНК є 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин. Окиснення основ ДНК може викликати мутації та делеції як у ядерній, так і в мітохондріальній ДНК. Мітохондріальна ДНК відносно схильна до окисного пошкодження через її близькість до АФК і недостатню здатність до відновлення порівняно з ядерною ДНК. Ці окиснювальні модифікації викликають функціональні зміни в структурних і ферментативних білках, що може призвести до значного фізіологічного впливу. Крім того, окисно-відновні модуляції факторів транскрипції також збільшують або зменшують їхню специфічну активність щодо зв'язування ДНК, таким чином змінюючи експресію генів [14].

Одним із головних джерел АФК у клітинах ссавців є дихальний ланцюг у мітохондріях. Встановлено, що генерація АФК є важливим модулятором запальних реакцій у ссавців. Фермент НАДФН-оксидаза індукує окиснювальний вибух, що призводить до різкого збільшення споживання кисню та посилення процесу фагоцитозу. Активованій макрофаг індукує експресію цитокінів IFN- γ і TNF- α , покращуючи активність НАДФН-оксидази, що призводить до виробництва супероксиду. Форми кисню перетворюються на гідроксильний радикал, пероксид водню і пероксинітрит шляхом спонтанної або ферментативної реакції [22, 23]. Активація білка синтази оксиду азоту або у макрофагах стимулює підвищену секрецію оксиду азоту та метаболітів NO всередині клітини [20].

Аеробні організми продемонстрували дві основні системи антиоксидантного захисту, щоб мінімізувати пошкодження, опосередковане АФК, викликане безкисневими радикалами. Перший – ферментативний захист, а другий – низькомолекулярні антиоксиданти, такі як вітаміни та

фітохімічні речовини. Загалом клітини контролюють окиснювальний стрес трьома основними антиоксидантними ферментами, які присутні в них [21].

За нормальних умов АФК виводяться з клітини під дією супероксиддисмутази, каталази або глутатіонпероксидази [17].

1.3. Механізми токсичності ацетамінофену

Ацетамінофен (N-ацетил-п-амінофенол, АРАР, парацетамол, Tylenol) [25] є одним із найпоширеніших знеболюючих і жарознижуючих препаратів, які використовуються у всьому світі. Незважаючи на те, що препарат безпечний і ефективний, діапазон терапевтичних доз є вузьким [24]. Вчасне розпізнавання передозування, лікування та застосування N-ацетилцистеїну можуть мінімізувати токсичність і запобігти ймовірних захворювань. У випадку, коли об'єктом токсичного ураження ацетамінофеном є, наприклад, печінка може розвиватися [26] гепатоцелюлярний некроз, що може призвести до гострої печінкової недостатності (ГПН) і смерті.

Рання та точна діагностика передозування ацетамінофену важлива для успішного лікування. На ранніх стадіях токсичності діагноз ґрунтується на сукупності анамнезу і виявленні підвищеного рівня ацетамінофену в периферичному кровообігу. Однак пацієнти з ГПН зазвичай мають порушений психічний стан або можуть бути несприятливими щодо прийому ацетамінофену. Крім того, сироваткові концентрації ацетамінофену часто низькі або не визначаються у пацієнтів із справжньою гепатотоксичністю ацетамінофену через затримку між прийомом і клінічними проявами [25].

Десятиліття досліджень механізмів ураження печінки, викликаного АРАР, дали суттєве розуміння ролі метаболізму АРАР та утворення реактивного метаболіту в ініціації каскаду подій, які в кінцевому підсумку призводять до ураження печінки. При споживанні АРАР в терапевтичних дозах більша частина (80%–90%) кон'югується з глюкуроновою кислотою або сульфатом і виводиться через нирки [24].

Після прийому великої дози ацетамінофену глутатіон печінки виснажується, а пропускна здатність шляхів кон'югації перевищується, що призводить до зміни метаболізму, опосередкованого цитохромом P450, з утворенням високореактивного та токсичного проміжного метаболіту, N-ацетил-p-бензохінонімін (NAPQI). NAPQI швидко зв'язується з амінокислотою цистеїном у клітинних білках, утворюючи білкові аддукти ацетамінофену, які згодом вивільняються в периферичну циркуляцію під час токсичності в результаті лізису гепатоцитів [25], а сам він швидко кон'югується з великими запасами глутатіону в печінці та виводиться через жовч [24].

Ацетамінофен швидко всмоктується з кишечника та транспортується до печінки, де він головним чином кон'югується з глюкуроною кислотою ферментами підродина UDP-глюкуронозилтрансферази (UGT) або сульфатується ферментами сульфотрансферазами в терапевтичних дозах з подальшим виведенням із сечею. У той час як реакції сульфатування можуть бути насиченими при відносно низьких дозах, реакції глюкуронізації зазвичай мають вищу потужність і, очевидно, не насичуються навіть після сильного передозування. Надмірне утворення NAPQI призводить до його стійкої реакції з печінковими запасами глутатіону та наступного швидкого виснаження глутатіону в печінці. Це залишає вільний реактивний NAPQI доступним для реакції з білковими сульфгідрильними групами з утворенням білкових аддуктів APAP [24]. Вони можуть утворюватися навіть при терапевтичних дозах, що вказує на те, що значне виснаження глутатіону не є необхідною умовою для їх утворення [27].

Утворення білкових аддуктів APAP та їх вивільнення в кровообіг зараз є областю інтенсивного вивчення через клінічні наслідки в лікуванні пацієнтів із передозуванням APAP, головним чином тому, що білкові аддукти APAP вважаються біомаркерами, корисними для діагностики передозування APAP.

У зв'язку з утворенням аддуктів ацетамінофену, відбувається пошкодження компонентів електронотransпортного ланцюга, зокрема, ензиму АТФ-синтази, що порушує функцію дихального ланцюга та посилює утворення вільних радикалів, таких як супероксид. Він реагує з оксидом азоту в мітохондріях, утворюючи високореактивний пероксинітрит, який нітрує мітохондріальні білки, такі як супероксиддисмутаза. Це порушує антиоксидантний захист мітохондрій, викликаючи мітохондріальний окисний стрес і окиснення білків. Важливість мітохондріального супероксиду в опосередкуванні гепатотоксичності АРАР додатково ілюструється значним загостренням ураження печінки у мишей з частковим дефіцитом супероксиддисмутази, яка зазвичай поглинає супероксид у мітохондріях. Джерелом утворення мітохондріального супероксиду, ймовірно, є дихальний ланцюг, оскільки було показано, що АРАР пригнічує дихання через комплекс II в ізольованих гепатоцитах щура. Реакція супероксиду з оксидом азоту і подальше утворення пероксинітриту в мітохондріях є критичними медіаторами АРАР-індукованої мітохондріальної дисфункції. Незалежно від джерела оксиду азоту, утворення пероксинітриту в мітохондріях призводить до модифікації ряду білків шляхом нітрування залишків тирозину. Коли цими мішенями є мітохондріальна ДНК або важливі антиоксидантні ферменти, такі як супероксиддисмутаза, чия активність порушується нітруванням після передозування ацетамінофеном, це може мати подальші каскадні наслідки. Важливість пероксинітриту в опосередкуванні токсичного ураження печінки також ілюструється тим фактом, що пряме знешкодження пероксинітриту мітохондріальним глутатіоном також запобігає нітруванню білка та захищає від індукованого ацетамінофеном пошкодження печінки [24].

Відомо, що ацетамінофен безпечніший для дітей, ніж для дорослих, імовірно тому, що відносно нерозвинена печінка дитини не може швидко перетворити препарат на токсичні метаболіти. Однак цей погляд на безпеку ацетамінофену ґрунтується виключно на низькій частоті гострих побічних

явищ, таких як печінкова та ниркова недостатність і кишкова кровотеча. Довготривалий вплив ацетамінофену на розвиток нервової системи на людях ніколи не оцінювався [28].

1.4. Механізми ушкоджуючої дії дієнових кон'югатів та кетодієнів

Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) – це окиснювальна деградація ліпідів, яка відбувається за дії вільних радикалів і є однією з основних причин пошкодження клітинних мембран та подальшої загибелі клітин унаслідок впливу АФК. Цей процес регулює ліпідний склад біомембран і мембраноасоційованих ферментів, впливає на проникність мембран і транспорт речовин через них, бере участь у синтезі лейкотрієнів, простагландинів, метаболізм катехоламінів та стероїдних гормонів [2].

Наслідком окисного стресу в організмі є накопичення токсичних продуктів ПОЛ, які зумовлюють зміни імунного та порушення функціонального стану різних систем, метаболічні порушення в організмі. Однак, процес ПОЛ властивий також і нормальним тканинам організму та відбувається при синтезі багатьох біологічно активних речовин (глюкокортикоїдів, простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів, прогестерону та ін.), відновленні ліпідних і білкових мембранних структур. Окрім того, бере участь у процесі регуляції поділу клітин, модуляції апоптозу, запобігає злоякісному перетворенню клітин, забезпечує цитотоксичну дію фагоцитів [2].

До продуктів ПОЛ належать дієнові кон'югати (ДК), кетодієни (КД), малоновий діальдегід (МДА) та шифові основи. Дієнові кон'югати (ДК) є первинними продуктами ПОЛ, які належать до токсичних метаболітів, що можуть пошкоджувати ліпопротеїни, білки, ферменти і нуклеїнові кислоти. Вони утворюються внаслідок міграції подвійного зв'язку в поліненасичених жирних кислотах [29]. Під час вільнорадикального окиснення арахідонової кислоти відбувається відрив гідрогену в α -положенні у відношенні до подвійного зв'язку, що призводить до переміщення цього подвійного зв'язку

з утворенням ДК [2]. Ліпопероксида – нестійкі сполуки, тому, під дією окисної дегенерації, відбувається накопичення вторинних продуктів ПОЛ – кетодієнів та спряжених трієнів [29].

ПОЛ є основним показником адаптаційних можливостей організму, його стійкості до впливу несприятливих умов. В організмі існує динамічна рівновага між утворенням вільних радикалів та їх нейтралізацією за допомогою антиоксидантної системи [2].

1.5. Убіхінон як неферментативний антиоксидант

Убіхінон (коензим Q), крім своєї функції переносника електронів і протонів у мітохондріальному та бактеріальному транспорті електронів, пов'язаному з синтезом АТФ, діє у своїй відновленій формі (убіхінол) як антиоксидант, запобігаючи ініціації та/або поширенню пероксидного окислення ліпідів. в біологічних мембранах і в сироваткових ліпопротеїнах низької щільності. Антиоксидантна активність убіхінолу не залежить від ефекту вітаміну Е, який діє як антиоксидант, що розриває ланцюг, пригнічуючи поширення пероксидного окислення ліпідів. Крім того, убіхінол може ефективно підтримувати дію вітаміну Е шляхом регенерації вітаміну з токофероксильного радикалу, який в іншому випадку використовує для відновлення аскорбат (вітамін С) [30].

Убіхінол є єдиним відомим жиророзчинним антиоксидантом, який клітини тварин можуть синтезувати *de novo*, і для яких існують ферментні механізми, які можуть регенерувати антиоксидант з його окисленої форми в результаті його інгібуючого ефекту пероксидного окислення ліпідів. Ці властивості разом із високим ступенем гідрофобності та широкою присутністю в біологічних мембранах і ліпопротеїнах низької щільності свідчать про важливу роль убіхінолу в захисті клітин від окисного пошкодження. Дегенеративні захворювання та старіння можуть бути проявами зниження здатності підтримувати достатній рівень убіхінолу. Припускають важливу роль убіхінолу в захисті клітин від окисного

пошкодження [30]. Рівень коензиму Q_{10} нижчий у людей похилого віку та у людей із хронічними захворюваннями, такими як серцеві проблеми, рак, хвороба Паркінсона, діабет, ВІЛ/СНІД та м'язова дистрофія. Однак невідомо, чи ці низькі рівні сприяють цим розладам. Багатими харчовими джерелами є м'ясо, риба, рослинні олії [31].

Роль коферменту Q_{10} як ефективного антиоксиданту клітинних мембран залишається предметом домінуючого інтересу. Ця сполука є єдиним ендогенносинтезованим жиророзчинним антиоксидантом, присутнім у всіх мембранах, що перевищує за кількістю та ефективністю інші антиоксиданти. Захисний ефект поширюється на ліпіди, білки та ДНК головним чином через його близьку локалізацію до окислювальних подій та ефективну регенерацію безперервним відновленням [32].

1.6. Ферментативні шляхи захисту від окисного стресу

1.6.1. Особливості будови та біологічної дії супероксиддисмутази

Супероксиддисмутаза (Кф 1.15.1.1.) – ензим групи антиоксидантних ферментів; універсальний фермент організмів, які живуть у присутності кисню [33]. СОД є білком, який складається з двох субодиниць, кожна з яких містить по одному атому цинку, міді та кобальту [2]. Існує кілька форм супероксиддисмутази в залежності від типу перехідного металу-кофактора активного центру ферменту: Cu-, Zn-СОД (мідь як кофактор активного центру і цинк як кофактор, що стабілізує конформацію), Mn-СОД (з марганцем в активному центрі), а також менш поширені Fe-СОД (із залізом) та Ni-СОД (з нікелем) [33].

В організмі людини існує три типи СОД. СОД1 знаходиться в цитоплазмі, СОД2 – у мітохондрії, а СОД3 – це позаклітинна (екстраклітинна) форма. Перша форма – димерна, тоді як друга і третя форми – тетрамерні (складаються з 4 однакових субодиниць). СОД1 та СОД3 містять мідь в активному центрі та цинк як структурний компонент, а СОД2 містить марганець в активному центрі. Цитозольна СОД1 є невеликим білком

із молекулярною масою 32,5 кДа, молекулярна маса мітохондріальної СОД2 – близько 86-88 кДа. Екстраклітинна СОД3 є найбільшою супероксиддисмутазою, молекулярна маса – 135 кДа [33].

СОД каталізує дисмутацію супероксиду з кисню і пероксиду водню в клітині. Завдяки своїй активності ферменти СОД контролюють рівні різноманітних активних форм кисню і активних форм азоту, таким чином обмежуючи потенційну токсичність цих молекул і контролюючи широкі аспекти життя клітин, які регулюються їх сигнальними функціями. Усі аеробні організми мають кілька білків СОД, націлених на різні клітинні та субклітинні місця, що відображає повільну дифузію та численні джерела супероксиду. Ця компартменталізація також вказує на необхідність точного локального контролю сигналізації АФК і на можливість для АФК передавати сигнали між компартментами [34].

Джерелами супероксидних радикалів є мітохондрії, деякі флавіновмісні оксидоредуктази, які локалізуються в цитозолі, такі як дегідрооротатдегідрогеназа, ксантиноксидаза, альдегідоксидаза [2]. Внутрішньоклітинні СОД переважно обмежують дію супероксиду, який шкодить клітинам, пошкоджуючи ферменти, що містять кластер Fe-S. Позаклітинні СОД також захищають клітини від супероксиду, що виділяється господарем або патогенами. Антиоксидантна система клітин-господарів включає такі ферменти, як СОД, каталази та пероксидази [23, 35].

1.6.2. Особливості будови та біологічної дії каталази

Каталаза (КФ 1.11.1.6.) – це гемовий фермент, який належить до класу оксидоредуктаз – великого класу ферментів, які каталізують перенесення електронів від молекули-відновника (донора) до молекули-окисника (акцептору). Каталаза людини утворює тетрамер, що складається з чотирьох субодиниць, кожна з яких має довжину понад 500 амінокислот. Фермент має у складі чотири групи порфіринового гему, завдяки яким і вступає в реакцію з активними формами кисню [35]. Спочатку ензим утворюється в цитозолі у

вигляді мономерів, які не містять гем, а надалі мономери переносяться в просвіт пероксисом і перетворюються в тетрамери в присутності гема [2].

Пероксид водню є шкідливим побічним продуктом багатьох нормальних метаболічних процесів, тому, щоб запобігти пошкодженню клітин і тканин, він повинен швидко перетворюватися в інші, менш небезпечні речовини [36]. Каталаза – це поширений фермент, що зустрічається майже у всіх живих організмах, які піддаються впливу кисню (таких як бактерії, рослини та тварини), який каталізує перетворення пероксиду водню до води та кисню [37]. Таким чином, проявляється його каталітична активність. Каталаза ссавців відома також своєю пероксидною активністю, що проявляється в її здатності окислювати низькомолекулярні спирти в присутності низьких концентрацій пероксиду водню.

Активність ферменту залежить від структурної конформації трьох основних доменів, фрагмента гему в активному центрі, відновленого НАДФН, зв'язаного в НАДФН-зв'язувальному домені, і складної вторинної структури, утвореної потоками та переплетенням довгих пептидних петель під час тетрамеризації. Активна каталаза ссавців є гомотетрамером, і окремі білкові мономери не володіють здатністю перетворювати пероксид [38]. Це дуже важливий фермент для захисту клітини від окисного пошкодження активними формами кисню [37].

Каталаза – один з найшвидших ферментів. Всього одна її молекула здатна перетворювати мільйони молекул пероксиду водню на воду і кисень за секунду. З точки зору ензимології це означає, що для ферменту каталази характерно велике число обертів [38]. Оптимальний рН для роботи каталази в людському організмі близько 7, однак швидкість реакції істотно не змінюється при значеннях показника водню від 6,8 до 7,5. Оптимальне значення рН для інших каталаз коливається в межах від 4 до 11 в залежності від виду організму. Оптимальна температура також різниться, для людини це близько

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 110-140 г. При утриманні та проведенні маніпуляцій з тваринами дотримувалися вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Експериментальні дослідження проводили на 4 групах тварин:

I – контроль, тварини перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні (К);

II – тварини, яких утримували на низькопротеїновій дієті (НПР);

III – щури, яким вводили ацетомінофен для моделювання токсичного ураження (ТУ);

IV – тварини, яких утримували на низькопротеїновому та вводили ацетомінофен для моделювання токсичного ураження (НПР/ТУ).

Протягом експерименту тварин утримували в пластикових клітках із піщаною підстилкою та постійним доступом до води. Експеримент тривав 28 діб. На 29 добу експерименту проводили цервікальну дислокацію експериментальних тварин під легким ефірним наркозом.

Виділення мітохондріальної фракції

Виділення мітохондріальної фракції проводили методом диференційного центрифугування в середовищі гомогенізації. Всі операції проводили при 0-4 °С.

Гомогенізацію тканин нирок проводили наступним чином: подрібнювали дослідний матеріал ножницями та гомогенізували з додаванням 0,25 М розчину сахарози. Фільтрат центрифугували протягом 10 хв при 1000 об/хв для осадження ядерної фракції. Із надосаду осаджували мітохондріальну фракцію. Центрифугували при 12000 об/хв протягом 15 хв.

Осад мітохондрій двічі промивали буфером без EDTA та центрифугували при 12000 об/хв протягом 10 хв. До отриманої мітохондріальної фракції вносили середовище виділення без EDTA.

Вміст протеїну визначали за методом Лоурі [39].

Визначення вмісту дієнових кон'югатів (ДК) та кетодієнів (КД) поліненасичених жирних кислот

Принцип методу полягає в тому, що внаслідок процесу пероксидного окислення жирних кислот відбувається перегрупування подвійних зв'язків з виникненням системи спряжених дієнових структур, які мають максимум поглинання при 232-234 нм та область поглинання 260-280 нм для кетодієнів.

Визначення вмісту КД і ДК проводили в мітохондріальній фракції нирок. У центрифужні пробірки вносили по 0,2 мл фракції мітохондрій та додавали по 4 мл екстрагуючої суміші гептан:ізопропіловий спирт, закривали корками та інтенсивно струшували протягом 2 хв. Далі проби центрифугували протягом 15 хв. при 3000 об/хв при температурі 0-4 °С. 2 мл верхнього гептанового шару переносили в чисті пробірки та випарювали на водяній бані при 40-50 °С. До сухого залишку додавали 2 мл 96 %-го етилового спирту та інтенсивно струшували, залишали при кімнатній температурі на 10-15 хв та після інтенсивного струшування проводили вимірювання оптичної щільності. Вимірювання проводили при 232 і 273 нм проти контрольної проби [40].

Вміст ДК та КД розраховували за формулою:

$$C_{\text{ДК/КД}} = E_{232/273} / A, \text{ де}$$

$C_{\text{ДК/КД}}$ – вміст дієнових кон'югатів (кетодієнів) в одиницях вимірювання щільності на мг/білка;

E_{232} – оптична щільність проби для дієнових кон'югатів;

E_{273} – оптична щільність проби для кетодієнів;

A – вміст білка в пробі, визначеного методом Лоурі.

Визначення активності супероксиддисмутази

Принцип методу ґрунтується на здатності СОД інгібувати аутоокислення адреналіну. У контрольну пробірку вносили 2,8 мкл 0,2 М карбонатного буферу (рН 10,65) і 200 мкл 0,1 %-го р-ну адреналіну. У дослідну пробірку вносили 2,7 мкл карбонатного буферу, 200 мкл адреналіну, 100 мкл мітохондрій. Вимірювали на СФ при $\lambda = 347$ нм кожні 60 с протягом 2 хв після того, як внесли адреналін [41].

Визначення активності каталази

Принцип методу ґрунтується на здатності пероксиду водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при $\lambda=410$ нм.

До 2 мл р-ну H_2O_2 додавали 100 мкл мітохондрій. У холосту пробу додавали 2 мл H_2O_2 . Перемішували та інкубували при 37 °С. Через 10 хв додавали 1 мл 4 % молібдату амонію і тим самим зупиняли хід реакції. У контрольну пробу 2 мл H_2O_2 , 100 мл H_2O , 1 мл 4 % молібдату амонію.

Вимірювали на СФ при $\lambda = 410$ нм [42].

Активність каталази розраховували за формулою:

$$\Sigma = \frac{(A_{\text{хол.}} - A_{\text{досл.}})}{22,2 * \text{білок}} * V * t * K, \text{ де}$$

V – об'єм проби;

T – час інкубації;

K – коефіцієнт молярного поглинання H_2O_2 .

Визначення продукції гідроксильного радикалу

Принцип методу ґрунтується на визначенні швидкості утворення гідроксильного радикалу в мітохондріях з використанням інкубаційного середовища при $\lambda=532$ нм.

Вносили у пробірки 200 мкл мітохондрій та 200 мкл інкубаційного середовища, яке містило: 20 ммоль/л дезоксирибозу, 1 ммоль H_2O_2 /л, 20 ммоль/л натрій-фосфатний буфер (рН 7,4). Інкубували 30 хв при 37 °С. Додавали 0,5 мл 1 % розчину тіобарбітуратової кислоти, приготованого на 50 мМ NaOH, та 0,5 мл 2,8 % ТХО. Отриману суміш інкубували 20 хв на киплячій водяній бані. Вимірювали при $\lambda = 532$ нм [43].

Визначення вмісту відновленого убіхінолу

Принцип методу базується на виділенні з суспензії мітохондрій убіхінону в його незмінному редокс-стані з використанням методу швидкої екстракції сумішшю гептан:метанол (1:1). Вміст загального та окисненого убіхінону визначали спектрофотометрично при 275 нм. Вміст відновленого убіхінону визначали за різницею вмісту загального і окисненого убіхінону.

У скляні пробірки з притертими пробками наливали 2,5 мл суміші гептан:метанол (1,25:1,25). Охолоджували пробірки в морозильній камері 30 - 25 °С. Додавали суспензію мітохондрій. Струшували пробірки 5 хв. Залишали суміш при - 25 °С на 1 годину. Центрифугували при - 20 °С 5 хв 2000 об/хв.

Верхній гептановий шар обережно відсмоктували піпеткою з відтягнутим кінцем. З метанолу, що залишився, ще двічі екстрагують убіхінон. До метанової фази додавали 1,25 охолодженого гептану. Центрифугували цю суміш при - 20 °С 5 хв 2000 об/хв. Відбирали верхній гептанів шар. Знову додавали 1,25 охолодженого гептану та центрифугували цю суміш при - 20 °С 5 хв 2000 об/хв. Об'єднаний гептанів екстракт тричі промивають 1,25 мл 95% охолодженого метанолу.

Гептановий екстракт убіхінону ділили на 2 рівні частини. В першу додавали 3 мл FeCl_3 розведеному в етанолі (5 мл FeCl_3 / 1 мл етанолу). У другу – 3 мл абсолютного етанолу. Залишали проби на 2 години при кімнатній температурі. В пробах першої групи відбувалося окислення, в другій – був незмінний редокс-стан.

До проб додавали 2 мл дистильованої води. Струшували їх 5 хв та залишали на 1 годину при - 20 °С. Відсмоктували піпеткою верхню гептанові фазу. Випарювали досуха під вакуумом при 40 °С. Сухий залишок розчиняли в 3 мл абсолютного спирту.

Вимірювали поглинання етанолового розчину на спектрофотометрі при 275 нм. До проб додавали 20 мкл розчину тетрагідроборату натрію. Чекали 5 - 10 хв [44].

Загальний вміст убіхінону та його редокс-форм розраховували за формулами:

$$A_1 = (E_1 - E_{3.1}) * V / 12,25 * a,$$

$$A_2 = (E_1 - E_{3.2}) * V / 12,25 * a,$$

$$A_3 = A_1 - A_2, \text{ де}$$

A_1 – загальна кількість убіхінону, мкмоль/мг білка;

A_2 – кількість окисленої форми убіхінону, мкмоль/мг білка;

A_3 – кількість відновленої форми убіхінону, мкмоль/мг білка;

E_1 – екстинція окисленої форми убіхінону;

E_2 – екстинція за незмінного редокс-стану;

$E_{3.1}$ – екстинція відновленої форми убіхінону у першій пробі;

$E_{3.2}$ – екстинція відновленої форми убіхінону у другій пробі;

V – об'єм етанолового екстракту (3 мл);

12,25 – коефіцієнт молярної екстинції, $\text{Мм}^{-1} * \text{см}^{-1}$.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Excel». Статистичну значимість різниці середніх показників оцінювали за стандартним критерієм Стюдента. Вірогідними вважали відмінності між групами при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Основним ініціатором вільнорадикального окиснення є активні форми кисню, кількість яких може зростати за дії несприятливих факторів, тим самим спричиняючи оксидативний стрес. Джерелами АФК в організмі є моноамінооксидаза, взаємодія іонів металів змінної валентності з відновниками та киснем, ксантинооксидаза, мітохондріальний, електронотransпортний, мікросомальний та фагоцитарний ланцюги окиснення [41].

Посилене утворення вільних радикалів, у тому числі гідроксильного, і токсичних продуктів ПОЛ, зокрема первинних – дієнових кон'югатів та кетодієнів, є одним з наслідків оксидативного стресу в організмі. В організмі для боротьби з ними функціонує антиоксидантна система (АОС), за допомогою якої досягається динамічна рівновага між утворенням та нейтралізацією вільних радикалів. Невід'ємними компонентами АОС є супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза. Дані ферменти, будучи антиоксидантами, перешкоджають утворення високотоксичних радикалів та забезпечують ефективний захист клітинних структур від руйнування [2].

Результати проведених нами досліджень показали, що у тварин, які споживали низькопротеїний раціон, достовірної зміни швидкості генерації гідроксильного радикалу (рис. 3.1.), вмісту дієнових кон'югатів (рис. 3.2.) і кетодієнів (рис. 3.3.) у мітохондріальній фракції нирок в порівнянні з контролем не спостерігається.

Пероксид водню не вважається вільним радикалом за визначенням, оскільки в ньому відсутні вільні електрони. Він володіє властивостями слабого окисника, які виявляються, зокрема, в присутності іонів металів змінної валентності у відновленій формі. При цьому утворюється високореакційний гідроксильний радикал [14]. Гідроксильний радикал є однією з найреакційноздатніших форм АФК [17], що володіє мутагенною та цитотоксичною дією. Він руйнує нуклеїнові кислоти, інактивує ферменти, ініціює реакції пероксидного окиснення ліпідів [45].

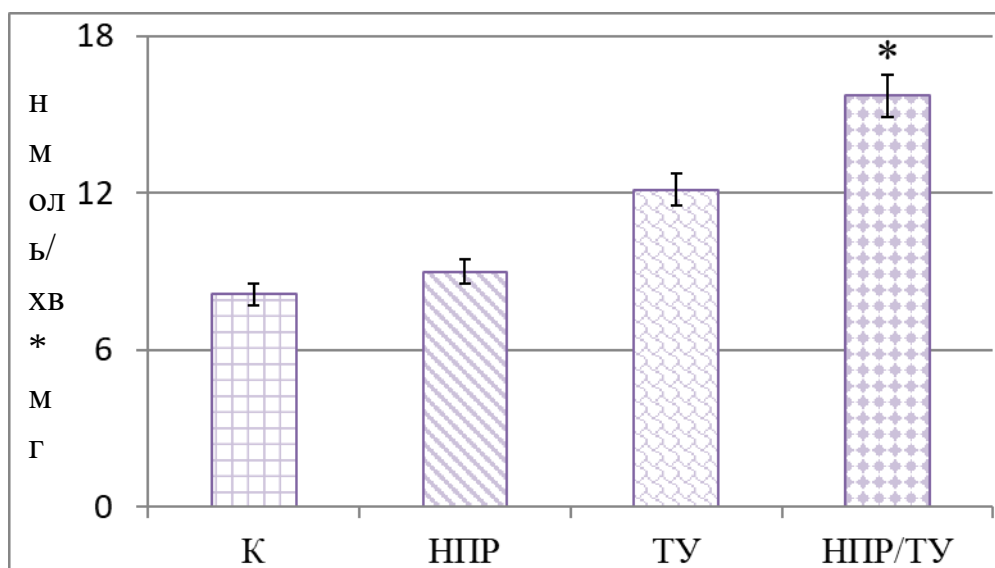


Рис. 3.1. Швидкість генерації гідроксильного радикалу у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності

Примітка: * - достовірна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$

Водночас за умов токсичного ураження тварин у мітохондріальній фракції нирок спостерігається підвищення вмісту дієнових кон'югатів майже в 2 рази (рис. 3.2), та кетодієнів – в понад 3 рази порівняно з контрольною групою (рис. 3.3); при цьому швидкість утворення гідроксильного радикалу зростає в 1,5 рази (рис. 3.1).

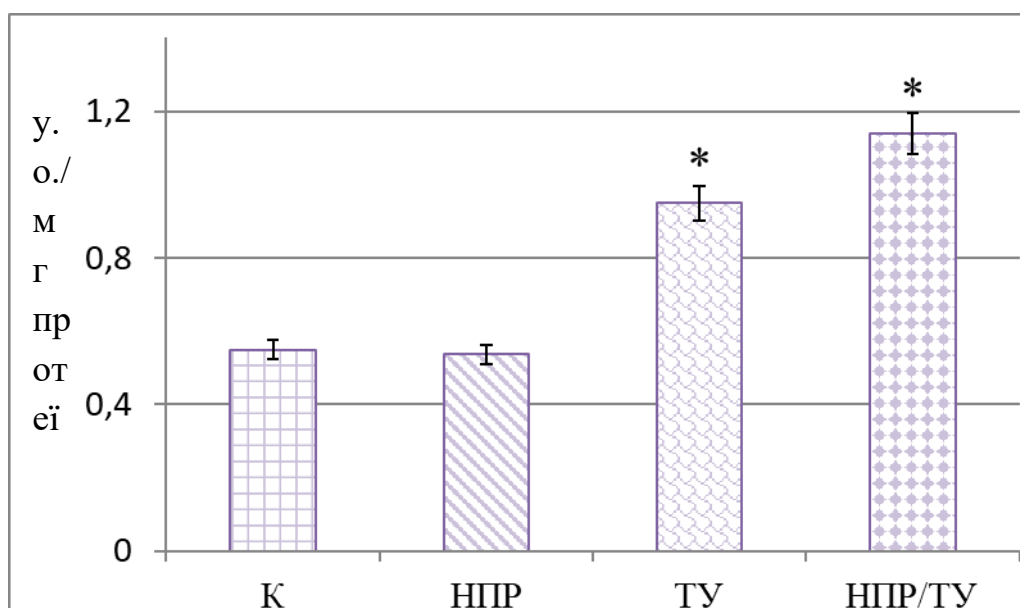


Рис. 3.2. Вміст дієнових кон'югатів у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності

У нормі вміст продуктів ПОЛ в організмі невисокий. Це пояснюється існуванням комплексу механізмів ендогенної системи антиоксидантного захисту. Вільнорадикальне окиснення ліпідів і білків – типовий ланцюговий процес із розгалуженням, що протікає в кілька стадій. Особливістю кетодієнів та дієнових кон'югатів – первинних продуктів ПОЛ – є те, що вони хоч і токсичні, але нестійкі, а тому швидко перетворюються до МДА. Збільшення вмісту КД і ДК верифікує інтенсифікацію процесів ПОЛ [46].

Водночас в мітохондріальній фракції нирок тварин групи ННР/ТУ нами зафіксовано максимальне накопичення первинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів – КД і ДК – та зростання швидкості генерації гідроксильного радикалу (рис.3.1 – рис. 3.3).

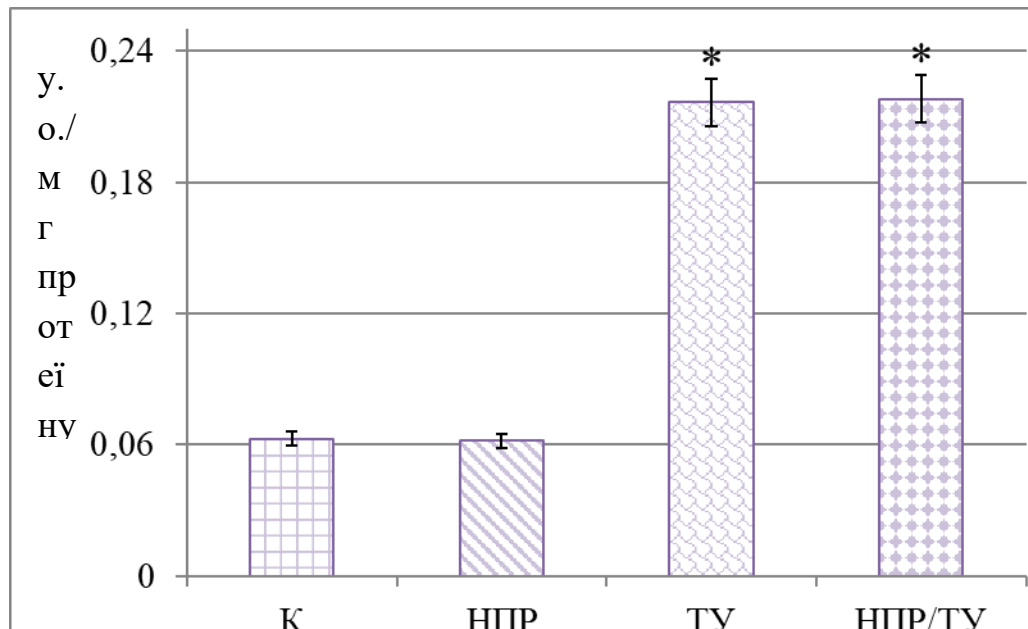


Рис. 3.3. Вміст кетодієнів у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності

Рівновага між кількістю окиснювальних та антиоксидантних продуктів є важливою складовою гомеостазу організму. За нормальних умов рівень пероксидне окиснення ліпідів є задовільним за рахунок рівноваги системи прооксидантів і антиоксидантів. Але при патологічних станах відбувається посилена активація ПОЛ, зокрема збільшення рівня КД та ДК і зниження активності каталази, супероксиддисмутази. Таким чином, антиоксиданти є

незамінними гальмівниками вільнорадикального неферментного окислення ненасичених жирних кислот, амінокислот і вуглеводів [2].

Результати дослідження показали, що у тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, спостерігається незначне зниження активності СОД та каталази у порівнянні з контролем (рис. 3.4., 3.5.).

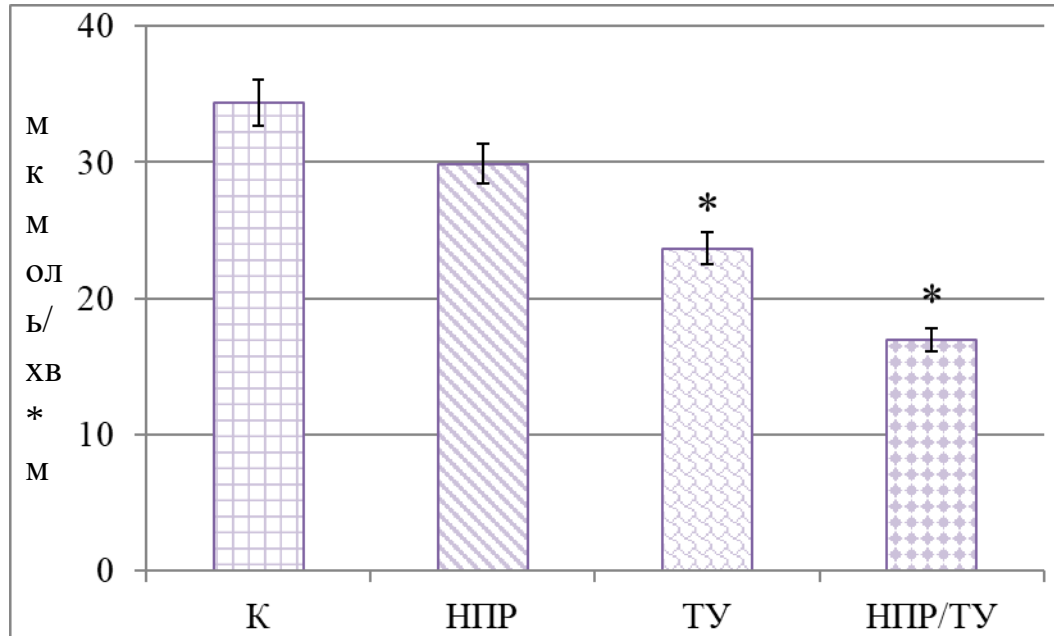


Рис. 3.4. Активність супероксиддисмутази у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності

При цьому у мітохондріальній фракції нирок щурів, які піддавалися токсичному ураженню, виявлено зниження активності СОД (рис. 3.4.) в 1,5 рази порівняно з контролем, тоді як активність каталази (рис. 3.5.) зберігається на рівні показників тварин групи НПР.

Антиоксидантна система клітин-господарів включає такі ферменти, як СОД, каталази та пероксидази [23, 35]. Фізіологічною функцією супероксиддисмутази є захист клітин від вільного радикального окислення. За умов нормального обміну цей антиоксидантний ензим підтримує концентрацію супероксидних радикалів на сталому рівні, достатньому для забезпечення захисту клітинних структур від появи гідроксильних радикалів та шкідливої дії радикалів кисню [2].

СОД каталізує перетворення супероксиду в кисень і перекис водню. Супероксидні аніони є передбачуваним продуктом виділених сигнальних

ферментів, а також побічним продуктом кількох метаболічних процесів, включаючи мітохондріальне дихання. Завдяки своїй активності ферменти СОД контролює рівні різноманітних активних форм кисню і активних форм азоту, таким чином обмежуючи потенційну токсичність цих молекул і контролюючи широкі аспекти життя клітин, які регулюються їх сигнальними функціями. Усі аеробні організми мають кілька білків СОД, націлених на різні клітинні та субклітинні місця, що відображає повільну дифузію та численні джерела супероксиду субстрату. Ця компартменталізація також вказує на необхідність точного локального контролю сигналізації АФК і можливості для АФК передавати сигнали між компартментами [34].

Внутрішньоклітинні СОД обмежують дію супероксиду, який пошкоджує ферменти, що містять кластер Fe-S. Позаклітинні СОД також захищають клітини від супероксиду, що виділяється господарем або патогенами [23, 35].

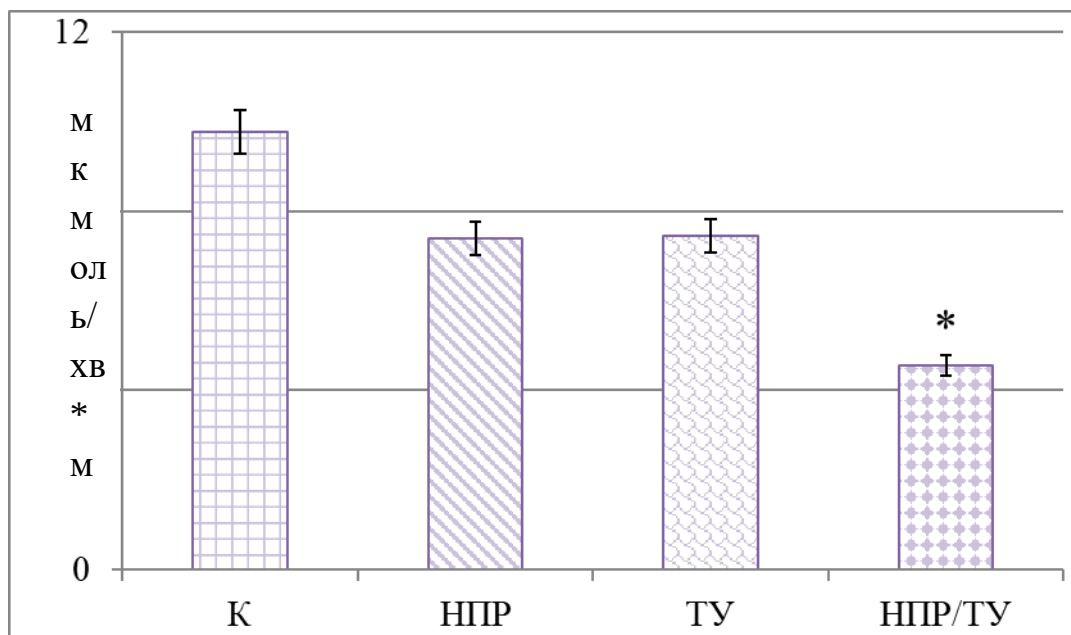


Рис. 3.5. Активність каталази у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності

Каталаза – це дуже важливий фермент для захисту клітини від окисного пошкодження активними формами кисню, який каталізує перетворення пероксиду водню до води та кисню [37]. Таким чином, проявляється його каталітична активність. Біологічна роль каталази полягає в

забезпеченні ефективного захисту клітинних структур від їх руйнування і деградації пероксидом водню, що утворюється в клітинах за дії флавопротеїнових оксидаз. Так, каталаза окислює низькомолекулярні спирти та нітрити, бере участь у процесі клітинного дихання [2].

Враховуючи те, що після розпаду АФК утворюється пероксид водню, який може пошкодити молекули СОД, його функціонування завжди відбувається з каталазою, яка розщеплює перекис водню на кисень і воду. Концентрація СОД та каталази пов'язані між собою, а рівень одного ферменту впливає на рівень іншого [2].

Максимальне зниження активностей супероксиддисмутази (рис. 3.4.) та каталази (рис.3.5.) у понад 2 рази порівняно з контролем спостерігалось у тварин, яким моделювали токсичне ураження на тлі білкової недостатності.

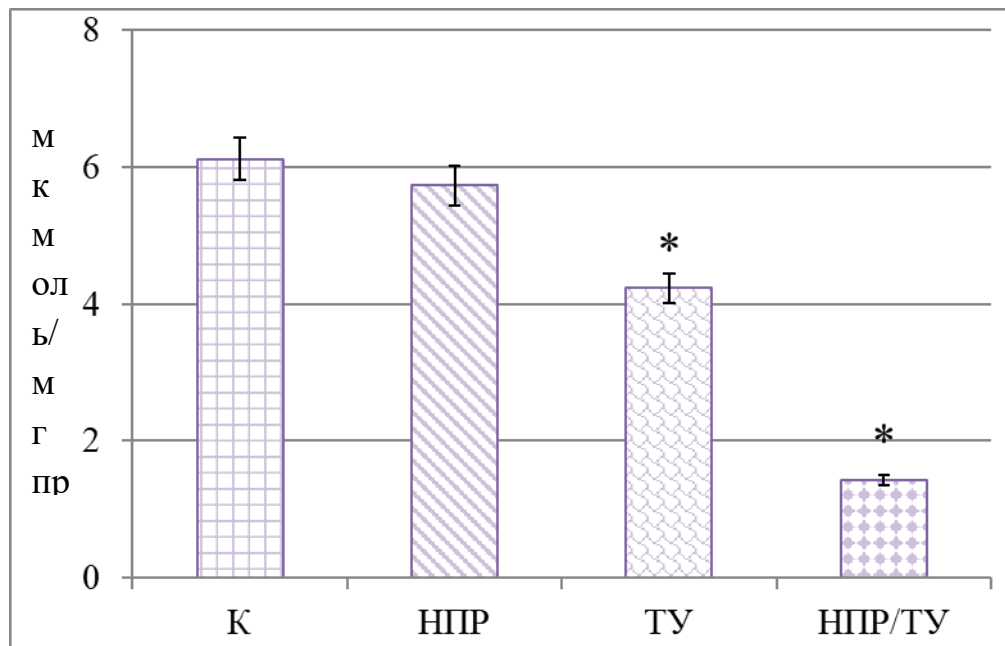


Рис. 3.6. Вміст відновленого убіхінону в мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності

Убіхінол є єдиним відомим ендогенно синтезованим жиророзчинним антиоксидантом, присутнім у всіх мембранах, що перевищує за кількістю та ефективністю інші антиоксиданти і для якого існують механізми, які забезпечують регенерацію антиоксиданту з його окисленої форми [35]. Варто зазначити, що його антиоксидантна активність не залежить від ефекту вітаміну Е [37].

Захисний ефект поширюється на ліпіди, білки та ДНК головним чином через його близьку локалізацію до окислювальних подій та ефективну регенерацію безперервним відновленням [32].

Згідно з результатами наших досліджень, вміст відновленого убіхінону (рис. 3.6.) у тварин, що споживали низькопротеїновий раціон, достовірно не змінився в порівнянні з контролем. В той же час, у щурів, яким вводили ацетамінофен, рівень коензиму Q_{10} знизився в 1,5 рази. Слід відмітити, що максимально виражене зниження вмісту убіхінону в мітохондріальній фракції нирок спостерігалось в особин групи НПР/ТУ – в 4 рази відносно контролю (рис. 3.6.).

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, достовірних змін швидкості генерації гідроксильного радикалу, вмісту дієнових кон'югатів та кетодієнів, а також вмісту відновленого убіхінону та активності каталази і супероксиддисмутази порівняно з контролем не спостерігалось.

2. Встановлено, що у нирках тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном спостерігалась інтенсифікація продукції гідроксильного радикалу, накопичення вмісту кетодієнів і дієнових кон'югатів, на тлі зниження вмісту відновленого убіхінону, та активності супероксиддисмутази і каталази.

3. Максимально виражена інтенсифікація вільнорадикального ушкодження мітохондріальних ліпідів та зниження активності супероксиддисмутази і каталази характерна для тварин, яким моделювали токсичне ураження на тлі білкової недостатності.