

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

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

**АКТИВНІСТЬ  $\text{NAD}^+$ -ЗАЛЕЖНИХ ЕНЗИМІВ ЦИКЛУ КРЕБСА ЗА  
УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ НА ТЛІ БІЛКОВОЇ  
НЕДОСТАТНОСТІ**

**Кваліфікаційна робота  
Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)**

***Виконала:***

студентка 4 курсу, 400-А групи

**Шевченко Софія Юріївна**

***Керівник:***

Кандидат біологічних наук, доцент

**Волощук О. М.**

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № \_\_\_\_

від „\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2023 р.

зав. кафедри \_\_\_\_\_ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2023

## АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню активностей  $\text{NAD}^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності.

Встановлено, що достовірні зміни ізоцитратдегідрогеназної та малатдегідрогеназної активностей спостерігаються лише у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну. Наслідком зниження досліджуваних ензиматичних активностей може бути порушення генерації  $\text{NADH}$  у мітохондріях нирок з наступним формуванням енергетичного дисбалансу. Водночас  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназна активність достовірно знижується у мітохондріях нирок тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, та тварин групи НІР/ТУ.

Отже, визначення активності  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса показало, що критичним для функціонування основного амфіболічного шляху клітини є токсичний вплив ацетамінофену на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

**Ключові слова:** аліментарний дефіцит протеїну, ацетамінофен, нирки,  $\text{NAD}^+$ -залежні дегідрогенази циклу Кребса, енергетичний дисбаланс.

## ABSTRACT

The bachelor's work is devoted to the study of the activities of NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases of the Krebs cycle under conditions of toxic damage against the background of protein deficiency.

It has been established that significant changes in isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities are observed only in animals with acetaminophen toxicity against the background of protein deficiency. A consequence of the decrease in the studied enzymatic activities may be a disruption of NADH generation in renal mitochondria with the subsequent formation of an energy imbalance. At the same time,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity was significantly reduced in the kidney mitochondria of animals consuming a low-protein diet and animals of the LPD/TI group.

Thus, the determination of the activity of NAD<sup>+</sup>-dependent enzymes of the Krebs cycle showed that the toxic effect of acetaminophen on the background of alimentary protein deficiency is critical for the functioning of the main amphibolic pathway of the cell.

**Key words:** nutritional protein deficiency, acetaminophen, kidneys, NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases of the Krebs cycle, energy imbalance.

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

С.Ю. Шевченко

(підпис)

## ВСТУП

Ацетамінофен (АРАР) – це один із найпоширеніших лікарських засобів, передозування яким може стати причиною токсичного ураження низки важливих органів. Зокрема, передозування даним препаратом є спричиняє токсичне ураження печінки та нирок. Основною причиною вказаного ефекту є N-ацетил-р-бензохінонімін (NAPQI), який утворюється у значних кількостях при насиченні головного шляху детоксикації ацетамінофену [1]. Мішенню дії NAPQI зазвичай є білки мітохондрій та іонні канали, взаємодія із якими призводить до порушення генерації енергії та загибелі клітин [2].

Енергетичний дисбаланс негативно впливає на функціонування органів, що характеризуються високою метаболічною активністю. Зокрема, відомо, що порушення енергетичного метаболізму є причиною патологічних станів нирок [3].

Стан мітохондрій тісно пов'язаний із активністю циклу Кребса [4]. Цей метаболічний процес знаходиться на перетині шляхів окисного катаболізму всіх енергетичних субстратів, забезпечуючи постачання відновлених коферментів для генерації енергії у електронтранспортному ланцюзі мітохондрій (ЕТЛ) [5]. У зв'язку із цим, визначення активності основних регуляторних ензимів циклу –  $\text{NAD}^+$ -залежних дегідрогеназ має значення для розуміння механізмів порушення процесів енергозабезпечення у мітохондріях клітин [6]. Важливість дослідження активності циклу Кребса також обумовлена розвитком патологічних процесів, які виникають при енергетичному дисбалансі у мітохондріях нирок [3]. Саме тому *метою роботи* стало дослідження активності  $\text{NAD}^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса за умов токсичного ураження на тлі білкової недостатності.

Для досягнення мети були поставленні *завдання*:

1. Визначити ізоцитратдегідрогеназну активність у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну.

2. Визначити  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназну активність у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну.

3. Визначити малатдегідрогеназну активність у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну.

## ЗМІСТ

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВСТУП.....</b>                                                                                    | <b>4</b>  |
| <b>РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>                                                               | <b>7</b>  |
| 1.1. Вплив білкової недостатності на метаболічні процеси в організмі.....                            | 7         |
| 1.2. Метаболізм парацетамолу.....                                                                    | 10        |
| 1.2.1 Шляхи перетворення ацетамінофену в організмі.....                                              | 10        |
| 1.2.2 Механізми токсичного впливу ацетамінофену на організм.....                                     | 12        |
| 1.3. Характеристика $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса.....                               | 16        |
| 1.3.1. Ізоцитратдегідрогеназа як регуляторний ензим циклу Кребса.....                                | 18        |
| 1.3.2. Особливості будови та функціонування<br>$\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу..... | 20        |
| 1.3.3. Функціональна активність та структурна організація<br>малатдегідрогенази.....                 | 21        |
| <b>РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>                                                | <b>24</b> |
| 2.1. Об'єкти та методи досліджень.....                                                               | 24        |
| <b>РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....</b>                                                 | <b>27</b> |
| <b>ВИСНОВКИ.....</b>                                                                                 | <b>35</b> |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>                                                           | <b>36</b> |
| <b>ДОДАТКИ.....</b>                                                                                  | <b>46</b> |



## РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Вплив білкової недостатності на метаболічні процеси в організмі

На сьогодні беззаперечно відомо те, що білок є важливим компонентом раціону харчування. У зв'язку з цим існує певна мінімальна кількість цього нутрієнта, яка повинна надходити в організм аби забезпечити елементарні метаболічні процеси [7]. Найважливіше значення харчового білку – джерело азоту і незамінних амінокислот [8].

Харчова цінність протеїну визначається перш за все вмістом незамінних амінокислот. З цієї точки зору білки рослинного походження поступаються за вмістом цих нутрієнтів тваринним та, відповідно, не вважаються повноцінними [7]. Це пояснюється амінокислотним складом та кількістю білків, їх доступністю для засвоєння. Відомо те, що рослинні продукти містять відносно невелику кількість незамінних амінокислот. Так, бобові, хоч і включають в загальному значну кількість білку, проте характеризуються дефіцитом метіоніну. Натомість, зернові містять достатню кількість цієї амінокислоти, але характеризуються нестачею лізину і триптофану [9].

У літературних джерелах є дані про те, що споживання дієти із низьким вмістом незамінних амінокислот призводить до низки порушень, наприклад, посилюється окислення інших амінокислот, які стають надлишковими через неможливість синтезу білків; виникають порушення у засвоєнні поживних речовин і транспортуванні кисню [10]. Одна із найбільш вагомих причин, яка визначає важливість надходження в організм достатньої кількості необхідних амінокислот, обумовлена особливостями внутрішньоклітинного синтезу протеїнів. Відомо про те, що утворення білка потребує одночасної присутності усіх протеїногенних амінокислот у нормальних кількостях та співвідношеннях [11].

Одне із найбільш важливих значень для метаболізму належить сірковмісним амінокислотам. До них належать метіонін і цистеїн, які

служать важливим джерелом сульфору для організму. Глутатіон (GSH) слугує формою накопичення та збереження даного елементу. Його основна роль полягає у підтримці окисно-відновного стану, детоксикації токсичних речовин, вільних радикалів та активних форм кисню (АФК) [12].

На сьогодні відомо про те, що нестача аліментарного протеїну у раціоні є причиною численних патологічних станів, що проявляються на різних рівнях. Сюди відносять порушення у функціонуванні клітин, тканин та органів. Зокрема, найбільші зміни торкаються печінки, м'язової та жирової тканин, оскільки у цих органах зосереджені найбільш важливі метаболічні шляхи [13].

На сьогодні існує достатня кількість даних про вплив дефіциту білку на метаболічні процеси. Так, дієта з високим вмістом вуглеводів і нестачею білка є причиною посилення катаболізму амінокислот, які за даних умов не можуть бути використані для синтезу білків. Вказані порушення – це патологічний процес під назвою квашіоркор. Білки є найважливішими органічними сполуками, які задіяні у всі без винятку біохімічні процеси. Тому їх дефіцит неодмінно стає причиною різного роду порушень, наприклад, у метаболізмі мікроелементів та функціонуванні ендокринної системи. Відомо, що важке недоїдання є причиною зниженої секреції інсуліну, а це у свою чергу призводить до активації ліполізу та протеолізу.

У літературних джерелах є дані про те, що квашіоркор супроводжується окисним стресом. Це пов'язано зі зниженим рівнем антиоксидантів, зокрема вітаміну Е та глутатіону. Одночасно з цим спостерігається посилене виробництво активних форм кисню (АФК) у мітохондріях печінки. Такі зміни призводять до порушення функцій цих органел та зменшення виробництва АТФ, що є причиною патологічних змін у функціонуванні цілого органу [14]. Негативні наслідки даного захворювання зустрічаються й у вигляді серцевої атрофії. Це пов'язано зі зниженим синтезом білків у кардіоміоцитах, зокрема компонентів міофібрил, і з їх одночасним посиленням розпадом [15].

Інший вагомий наслідок квашіоркору – стеатоз або ожиріння печінки, який пов'язаний із порушенням окислення ліпідів у цьому органі [14]. Як вже було зазначено, голодування призводить до посилення ліполізу, наслідком якого є вивільнення жирних кислот із адипоцитів. В подальшому вони надходять у печінку, де замість використання для енергетичних потреб накопичуються у значних кількостях [17]. Ще один із проявів квашіоркору – це дефіцит альбуміну крові. Нестача цього білка призводить до зниження онкотичного тиску плазми крові та виходу рідини із судин у тканини та, як наслідок, їх набряку. Дане явище обумовлене недостатньою кількістю амінокислот, необхідних для синтезу альбуміну [18]. Деякі дослідження доводять, що недоїдання у ранньому віці стає причиною зменшення маси міокарда, заміщення його жировою тканиною, модифікації калієвих каналів з наступним порушенням мембранного потенціалу. Результатом стають різні патологічні зміни у діяльності серця [19, 20].

З іншого боку, голодування стає причиною гормональних змін, і, як наслідок, сповільнення метаболізму [19]. На важливість білка як учасника метаболічних процесів вказує і те, що недостатнє забезпечення цим нутрієнтом призводить до дефіциту інших харчових складових. Це пояснюється наступними функціями білків: участь у поглинанні та перетворенні поживних речовин тонким кишківником; забезпечення транспорту із кров'ю (довголанцюгових жирних кислот, холестеролу, вітаміну А, заліза, води та  $\text{CO}_2$ ) [21].

Дослідження за участі тварин дають можливість стверджувати, що відхилення від норми співвідношення білків та вуглеводів у раціоні є причиною метаболічних порушень. Так, дієта із низьким вмістом білка та збільшеним вмістом вуглеводів сприяє збільшеному споживанню енергії [22]. Підтвердженням цьому може виступати інше дослідження. Воно дає підстави вважати, що загальне споживання енергії обернено пропорційно залежить від частки білків у раціоні. При цьому, чим менша кількість цього нутрієнта, тим більшою буде частка жирів та вуглеводів. Причиною цього

вважається реакція на дисбаланс поживних елементів, що, в результаті, призводить до появи зайвої ваги. Таким наслідком, як встановлено, сприяють високо оброблені харчові продукти із низьким вмістом протеїнів [23].

На основі досліджень можна стверджувати, що недостатнє споживання білка під час інфекційних захворювань стає причиною їх ускладнення. Безпосередніми передумовами цього вважаються нестача власне білку та пов'язана із цим втрата важливих вітамінів та мікроелементів. Відомим є факт порушення імунної відповіді, що пов'язують із зміною у функціонуванні та структурі виличкової залози [24].

## 1.2. Метаболізм парацетамолу

### 1.2.1 Шляхи перетворення ацетамінофену в організмі

На сьогодні відомо про те, що основними органами, задіяними у перетворенні АРАР, виступають печінка, нирки та кишечник. Транспорт вказаного препарату між зазначеними органами відбувається за допомогою току жовчі та крові [25].

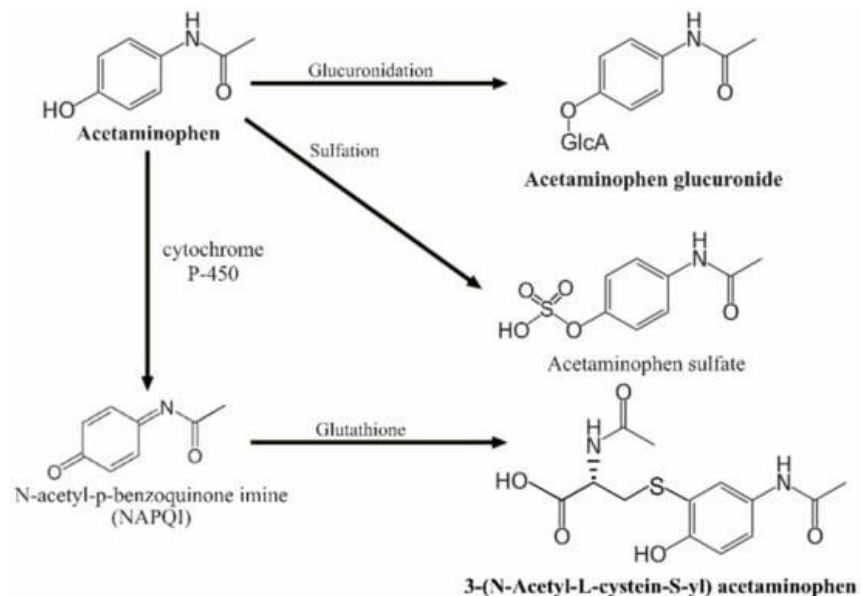


Рис. 1.2.1. Шляхи метаболізму ацетамінофену у печінці [26]

Перетворення ацетамінофену в організмі починається із його поглинання у початковому відділі тонкого кишечника. Відомо, що при застосуванні у терапевтичних дозах період напіврозпаду цієї сполуки в організмі людини становить 1,5-3 години. Проте даний показник

продовжується до 4-8 годин у разі передозування, яке супроводжується токсичним ураженням [25, 27].

Центральним органом, де відбуваються перетворення ацетамінофену, є печінка, тут його метаболізм може проходити за одним із трьох шляхів (рис. 1.2.1.):

- Кон'югація за допомогою ензимів UDP-глюкуронозилтрансферази (UGT) і сульфотрансферази (SULT) (становить ~85-90%).
- Перетворення цитохромом P450 у проміжний метаболіт N-ацетил-р-бензохінонімін (NAPQI). На цей шлях припадає лише 5-9% усього ацетамінофену, який надійшов в організм.
- Невелика кількість АРАР (~2%) виводиться нирками у незмінному вигляді [28, 29].

При надходженні АРАР у безпечних дозах, які можуть легко метаболізуватися, реалізуються шляхи глюкуронізації та сульфування (яке становить приблизно 30%). При цьому основна частина АРАР (близько 50 %) піддається саме глюкуронізації фенольних груп через взаємодію із глюкуроною кислотою. Таким чином утворюються водорозчинні нетоксичні сполуки – кон'югати глюкуронової кислоти, переважна кількість яких (> 75%) виводяться шляхом екскреції у жовч. Натомість менше 25% переходить у плазму крові.

Проте незначна кількість АРАР під дією цитохрому P450 може перетворюватися у NAPQI – високоактивний токсичний метаболіт. Далі ця сполука кон'югує з відновленим глутатіоном (GSH) через сульфгідрильну групу. Подальші перетворення полягають у взаємодії із меркаптуровою кислотою або цистеїном. Такі кон'югати надалі виводяться нирками [25, 30, 31].

У зв'язку із цим рівень GSH у клітинах виступає маркером окисного стресу, спричиненого NAPQI [32]. У літературі показано, що взаємодія NAPQI з глутатіоном може відбуватися як спонтанно, так і шляхом ферментативного каталізу за допомогою глутатіон-S-трансфераз (GST) [27].

Поряд із основними шляхами перетворення АРАР існує ще один – деацетилювання. Дослідження на тваринах вказують, що даний процес відбувається за участі ензиму N-деацетилази печінки. При цьому утворюється *p*-амінофенол, який, як з'ясувалося у модельних експериментах, є причиною нефротоксичності [25].

### 1.2.2. Механізми токсичного впливу ацетамінофену на організм

Основними мішенями токсичного впливу АРАР є печінка та нирки, проте багатьма дослідженнями було показано, що дія цієї речовини поширюється і на інші органи. Токсичність ацетамінофену безпосередньо пов'язана з його метаболізмом. Негативні наслідки спостерігаються за умови порушення балансу між продукцією і детоксикацією (або виведенням) токсичних сполук. Зважаючи на це, передозування призводить до повного насичення шляхів глюкуронізації та сульфонування, які діють при надходженні безпечних доз АРАР. У зв'язку з цим метаболізм даної речовини спрямовується на шлях утворення NAPQI [28, 33, 34].

Передозування парацетамолу та нестача харчових білків – це фактори, які призводять до виснаження пулу доступного GSH. У зв'язку із цим настає перевантаження інших шляхів перетворення АРАР, що призводить до накопичення значної кількості NAPQI. Токсичність цієї сполуки пояснюється здатністю реагувати із внутрішньоклітинними макромолекулами, що призводить до пошкодження різних клітинних структур [30, 35].

Даний факт підтверджується численними дослідженнями за участі тварин, які перебували на дієті із дефіцитом певних амінокислот (наприклад, метіоніну). Наступні спостереження показали знижений рівень GSH у печінці на >50% протягом 72 годин та більш виражений некроз тканин при ураженні АРАР [35].

Основною мішенню дії NAPQI виступають мітохондрії [36]. Першим етапом ураження печінки є взаємодія NAPQI із білками. Це у свою чергу може призводити до наступних ефектів: активації c-jun N-термінальної

кінази (JNK), дисфункції мітохондрій та виснаження АТФ, посилення продукції активних форм кисню. Такі зміни є безпосередньою причиною розвитку некрозу у тканині печінки [37].

Мішенню дії NAPQI, як правило, виступають сульфгідрильні групи цистеїну білків мітохондрій та іонних каналів, з якими встановлюється ковалентний зв'язок. Прикладом є глутатіонпероксидаза та альфа-субодиниця АТФ-синтази [25, 28, 38, 39].

Взаємодія із АТФ-синтазою призводить до її інактивації та енергетичного виснаження клітин [40]. Такого роду взаємодії призводять до послаблення мітохондріального дихання та посилення окисного стресу [27]. На цьому механізмі ґрунтується дія NAPQI як інгібітора GSH-синтази, ензиму, що забезпечує утворення глутатіону [41]. Здатність зв'язувати антиоксидантні білки мітохондрій призводить до зниження стійкості до окисного стресу [42].

Відомо, що модифіковані таким чином білки мітохондрій спричиняють порушення у роботі дихального ланцюга та є передумовою для посилення продукції вільних радикалів, наприклад, супероксиду. Даний радикал в подальшому взаємодіє з оксидом азоту (NO) з утворенням пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ). Ця сполука здатна модифікувати залишки тирозину у білках шляхом їх нітрування та пошкоджувати мітохондріальну ДНК [42, 43].

Важлива роль у гепатотоксичності, спричиненій АРАР, належить c-jun N-термінальній кіназі. Відомо, що даний фермент бере участь у посиленні таких негативних ефектів як виснаження GSH, зв'язування білків та окисний стрес. Наслідком таких подій стає дисфункція мітохондрій, однак вони не є причиною загибелі клітин. Натомість зазначені явища здатні підвищувати чутливість мітохондрій до передачі сигналу за участі JNK. У разі активації ця протеїнкіназа забезпечує посилення окисного стресу, наслідками чого стають утворення мітохондріальних пор проникності, втрата потенціалу на мембрані та загибель клітин шляхом некрозу [44].

На сьогодні відомо два сигнальні шляхи, що призводять до активації JNK. Перший шлях реалізується за допомогою мітоген-активованої протеїнкінази (ASK1). Вона включає гомодимер ASK1 та відновлену форму тіоредоксину (Trx). У неактивному стані такий комплекс називається сигналосомою, де Trx виконує функцію тимчасового інгібітора активності кінази. Реалізація даного шляху відбувається під впливом АФК, які окислюють залишки цистеїну на Trx (вважається, що пероксинітрит може спричиняти подібний ефект [45]). Це у свою чергу призводить до його відокремлення від ASK1 та активації кінази, яка при цьому набуває здатності активувати JNK шляхом фосфорилування. Відомо, що АФК забезпечують активацію і таких ферментів як кіназа-3  $\beta$  глікогенсинтаза (GSK3 $\beta$ ) та кіназа 3 змішаного походження (MLK3). Вони, як відомо, також здатні активувати JNK [44].

Зазначені вище події відбуваються у цитозолі. Далі активована JNK (pJNK) транспортується до мітохондрій, де зв'язується із білком Sab на зовнішній мембрані. Ця подія ініціює сигнальний шлях, який у підсумку обумовлює пригнічення роботи ЕТЛ та посилення продукції АФК [45].

На сьогодні достеменно відомо про те, що передозування АРАР є причиною зміни проникності зовнішньої мембрани мітохондрій (пермеабілізації). Порушення її структури безпосередньо залежить від двох білків – Вах і Вак, переміщенню яких до мембрани сприяє активована JNK [45]. Ці протеїни беруть участь у формуванні мітохондріальних пор проникності. Наслідком цього є порушення протонного градієнту та втрата потенціалу на мембрані, а, отже, і припинення утворення АТФ. Такі події неодмінно призводять до загибелі клітини [43, 46].

Відомо, що зміна проникності стосується і внутрішньої мембрани мітохондрій. Цьому сприяють так звані перехідні пори мітохондріальної проникності, в утворенні яких бере участь білок циклофілін D [45].

Руйнування мембрани шляхом утворення пор та набухання матриксу і подальшого лізису мітохондрій призводять до вивільнення таких білків як

ендонуклеаза G та фактор індукції апоптозу (AIF) із міжмембранного простору. При надходженні у ядро ці ферменти здатні фрагментувати ДНК. Крім того, вважається, що білкові кон'югати, які утворюються у мітохондріях, порушують функціонування ланцюга транспортування електронів, а це призводить до розвитку окисного стресу. Вказані події запускають апоптичну або некротичну загибель клітин, а фрагментація ДНК є характерною ознакою передозування АРАР [36, 43, 47].

На сьогодні достовірно відомо про існування таких адаптивних механізмів захисту від дії ацетамінофену: аутофагії, мітофагії та мітохондріального біогенезу [48]. Ще однією захисною реакцією можна вважати зміну кількості переносників метаболітів АРАР у клітинній мембрані.

Явище аутофагії виступає одним із механізмів захисту від токсичного впливу АРАР. У такий спосіб утилізуються ушкоджені білки та органели, що обмежує розширення некротичного осередку [47]. Відомо, що транспорт продуктів перетворення АРАР опосередковують два типи переносників – ABC (вихід з клітини) та SLC (перенесення у клітину). Деякі дослідження підтверджують, що передозування АРАР призводить до активації та збільшення кількості ABC переносників у клітинній мембрані. Це розглядається як адаптивна зміна, що обмежує накопичення токсичних метаболітів у клітинах та пошкодження печінки [25].

У деяких випадках шлях метаболізму АРАР може бути змінений. Прикладом цьому є тривале голодування. За цих умов переважає окисне перетворення ацетамінофену над глюкоронізацією. Причиною тому є особливості метаболізму у печінці. Голодування спричиняє посилення глюконеогенезу, а отже, і зменшення кількості доступних попередників глюкози для знешкодження АРАР [25]. Дослідження за участі тварин вказують, що голодування є причиною значного зниження рівня печінкового уридиндифосфату (UDP)-глюкози. Ця сполука слугує попередником глюкуронової кислоти, необхідної для детоксикації АРАР. Іншим фактором,

який здатний впливати на метаболізм АРАР, є надходження в організм сульфур. Так, дефіцит сірковмісних амінокислот під час голодування є причиною пригнічення утворення АРАР-глюкороніду та сульфату [35]. Відомий факт, що тривале введення АРАР піддослідним тваринам збільшує потребу у метіоніні як джерела сульфур, необхідного для підтримки рівня GSH та синтезу білків у печінці. У зв'язку із цим нестача даної амінокислоти у раціоні є причиною сповільнення росту [49].

Отже, зазначені вище факти слугують беззаперечним доказом того, що білкове голодування здатне спрямувати переважну частину АРАР на перетворення одним шляхом – до NAPQI [35].

Наслідки токсичної дії ацетамінофену проявляються у порушенні функціонування таких важливих органів як печінка та нирки [32].

#### *Нефротоксичність*

Вплив на нирки можна пов'язати із двома факторами. По-перше, надмірні кількості АРАР та NAPQI сприяють їх виведенню із сечею. Наслідком цього стає канальцева ішемія, яка призводить до некрозу тканини. По-друге, можливий прямий вплив через окисний стрес та низький рівень глутатіону [1, 34]. Такий стан називається гострим ураженням нирок та виникає у 2-10% відсотків пацієнтів із передозуванням АРАР [50]. На сьогодні встановлено, що утворення NAPQI може відбуватися не тільки печінкою, але і мікросомами нирок, які містять ізофермент P450 - 2E1. Негативні наслідки метаболізму АРАР пов'язані із утворенням вказаного вище *p*-амінофенолу. Він виникає у нирках та в подальшому може перетворюватися у вільний радикал. Така сполука чинить негативний вплив через зв'язування клітинних білків [51, 52].

### **1.3. Характеристика NAD<sup>+</sup>-залежних ензимів циклу Кребса**

Цикл Кребса є важливим метаболічним процесом, оскільки забезпечує здійснення останніх етапів окисного катаболізму вуглеводів, жирних кислот та амінокислот. У ході окисно-відновних реакцій відбувається окислення

ацетил-CoA та відновлення коферментів, які у свою чергу переносять електрони на транспортний ланцюг мітохондрій [4, 5]. Наступне перенесення електронів по ЕТЛ створює потенціал на внутрішній мембрані, який і слугує рушійною силою для синтезу АТФ [53].

Важлива роль у енергетичному метаболізмі належить кофактору  $\text{NAD}^+$  (нікотинамідаденіндинуклеотиду). Він залучений у такі ключові процеси як гліколіз, ЦТК, окисне фосфорилування та окислення жирних кислот. У мітохондріях  $\text{NAD}^+$  необхідний для функціонування трьох регуляторних ферментів ЦТК: ізоцитратдегідрогенази (IDH),  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу ( $\alpha$ -KGDC) та малатдегідрогенази (MDH). Ці ензими характеризуються подібною дією – вони відновлюють  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$  в аеробних умовах. Відновлений кофактор використовується для синтезу АТФ у реакції окисного фосфорилування. Рівні та розподіл  $\text{NAD}^+$  у клітинах вказують на їх енергетичний стан. Це впливає на різні фізіологічні та біологічні реакції, які потребують участі цього кофактора [6]. Співвідношення  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , яке тісно пов'язане із співвідношенням  $\text{ATP}/\text{ADP}$  у мітохондріях, є головним регулятором перебігу ЦТК. При цьому  $\text{NADH}$  виступає інгібітором всіх регуляторних ензимів у ЦТК [54].

Відомий той факт, що ЦТК є критично важливим метаболічним шляхом, який пов'язаний із багатьма фізіологічними та патофізіологічними процесами у нирках. Проміжні продукти цього циклу виконують регуляторну роль у багатьох інших реакціях, які відбуваються у тканині нирок. Так, наприклад,  $\alpha$ -кетоглутарова кислота бере участь у антиоксидантному захисті, обмежує структурні зміни мітохондрій, відновлює рівень АТФ в умовах гіпоксії [55]. Процеси реабсорбції, які здійснюються клітинами ниркових каналців, потребують достатнього рівня енергетичного забезпечення. Саме тому мітохондрії важливі для нормального функціонування нирок. Порушення дихання у цих органелах призводить до посилення продукції АФК.

Нирки є одним із найбільш метаболічно активних органів. У зв'язку з цим, клітини їх проксимальних каналців містять значну кількість мітохондрій для забезпечення енергетичних потреб. Саме тому патологічні процеси у цих органах найчастіше пов'язані із порушенням енергетичного метаболізму [3].

Гостре ураження нирок (ГУН) – це патологічний стан, який супроводжується порушенням функцій та структури даного органа. Існують дослідження, які показують, що дисфункція мітохондрій стає причиною порушення окислення жирних кислот у нирках. Наслідком цього стає накопичення ліпідів у клітинах ниркових каналців, та, відповідно, розвиток патології [56].

### **1.3.1. Ізоцитратдегідрогеназа як регуляторний ензим циклу Кребса**

В організмі ссавців зустрічаються три типи цього ферменту, які існують у двох формах: NADP-залежній (IDH1 та IDH2) та NAD<sup>+</sup>-залежній (IDH3). IDH1 локалізуються у цитоплазмі та пероксисомах, IDH2 і IDH3 – у мітохондріях [57-59].

Незважаючи на різну локалізацію IDH1 та IDH2 – це ізоферменти, які каталізують одну зворотню реакцію. При цьому утворюється цитозольний NADPH, який виконує роль антиоксиданта [60]. У зворотньому напрямку протікає відновне карбоксилювання  $\alpha$ -кетоглутарату до ізоцитрату [61]. Структура IDH1 та IDH2 дещо відрізняється від IDH3, вони є гомодимерами [62]. Нормальне функціонування IDH1 є важливим для забезпечення антиоксидантного захисту, оскільки, NADPH, як відомо, необхідний для генерації GSH. Відомо, що  $\alpha$ -кетоглутарат, який необхідний для синтезу GSH, може безпосередньо виступати у ролі антиоксиданту. Такі властивості цієї сполуки вказують на її важливість для захисту від токсичного впливу APAP [57, 63, 64].

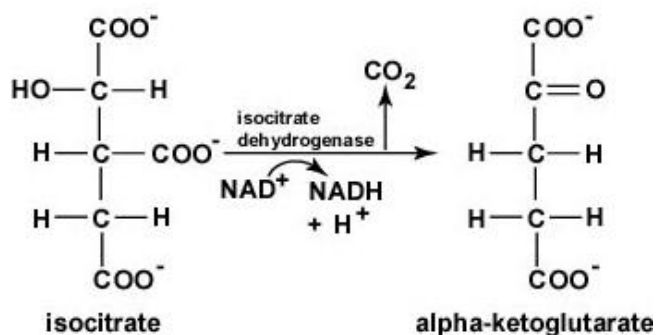


Рис. 1.3.1. Схема перебігу реакції окисного декарбоксилювання ізоцитрату [65]

IDH3 є одним із  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса, яка каталізує необоротне за фізіологічних умов окисне декарбоксилювання ізоцитрату до  $\alpha$ -кетоглутарату (рис. 1.3.1.). В ході такої реакції вивільняється  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NADH}$  та  $\text{H}^+$ . Утворений тут  $\text{NADH}$  буде витрачений для генерації  $\text{ATP}$  у ЕТЛ [60, 61]. Відомо, що реакція протікає поетапно. Перший етап включає окислення ізоцитрату до нестабільного проміжного продукту оксалосукцинату з одночасним відновленням  $\text{NAD}^+$ . Наступний етап характеризується вивільненням  $\beta$ -карбоксильної групи у вигляді вуглекислого газу з утворенням  $\alpha$ -кетоглутарату [61].

Відомо, що на активність даного ензиму впливають такі фактори, як наявність субстрату, алостеричні активатори та інгібітори. До активаторів належать іони  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{ADP}$  і цитрат; до інгібіторів –  $\text{ATP}$ ,  $\text{NADH}$  і  $\text{NADPH}$ . У зв'язку із цим IDH вважається регуляторним ферментом, який визначає швидкість всього циклу Кребса.

За будовою IDH3 – це гетеротетрамер, який включає дві  $\alpha$ -субодиниці, одну  $\beta$ -субодиницю та одну  $\gamma$ -субодиницю. Вони відрізняються за функціями у каталітичному процесі. Вважається, що  $\alpha$ - є каталітичними, а  $\beta$ - і  $\gamma$ -субодиниці – регуляторними [5, 59, 66]. При цьому у структурі ензиму виділяють два гетеродимери –  $\alpha\beta$  та  $\alpha\gamma$ . Разом їх називають гетерооктамером (або голоферментом). Дослідження активності IDH показали, що саме  $\alpha\gamma$  димер несе функціональний алостеричний центр на  $\gamma$ -субодиниці та може зв'язувати активатори. Це у свою чергу призводить до конформаційних змін

не тільки у цьому димері, але і в  $\alpha\beta$ . Взаємодія між двома гетеродимерами забезпечує повну активність цілого ензиму. Окрім того, було виявлено, що  $\alpha\beta$  гетеродимер відрізняється від  $\alpha\gamma$  більшою компактністю та наявністю псевдоалостеричного центру, який не здатен до взаємодії із кофакторами [67].

### 1.3.2. Особливості будови та функціонування $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу

Значення  $\alpha$ -KGDC полягає у перетворенні  $\alpha$ -кетоглутарату ( $\alpha$ -KG) в сукциніл-КоА та регуляції швидкості усього ЦТК. В ході такої реакції відбувається вивільнення  $\text{CO}_2$ , NADH та  $\text{H}^+$  (рис. 1.3.2.). Функціонування даного комплексу потребує участі ряду кофакторів: тіамінпірофосфату (TPP), CoASH, FAD,  $\text{NAD}^+$  та ліпоєвої кислоти.

На сьогодні достеменно відомо, що  $\alpha$ -KGDC є мультиферментним комплексом, який складається із трьох ензимів:  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (E1), дигідроліпоамідсукцинілтрансферази (E2) і дигідроліпоаміддегідрогенази (E3).  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа за функціональною активністю є дегідрогеназою, яка каталізує декарбоксилювання  $\alpha$ -KG. Наступний фермент забезпечує відновлення ліпоєвої кислоти у дигідроліпоєву та перенесення ацетильної групи від TPP на коензим А з утворенням сукциніл-КоА. Останній ензим каталізує процес окислення дигідроліпоїдних груп з відновленням кінцевого акцептора  $\text{NAD}^+$  до NADH [68, 69].

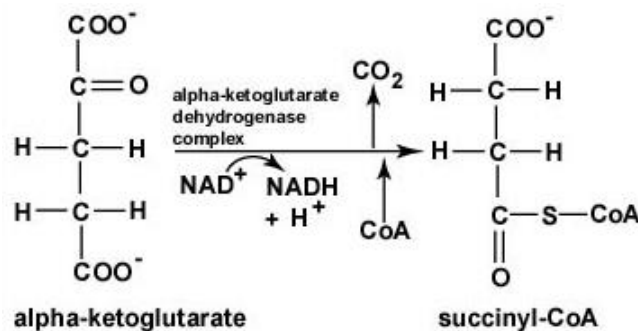


Рис. 1.3.2. Схема перебігу реакції, каталізованої  $\alpha$ -KGDC [65]

Субодиниця E1, шляхом взаємодії з різними регуляторами ( $\text{Ca}^{2+}$ , АТР/АДР, -SH/-S-S (тіол/дисульфід), NADH/NAD<sup>+</sup>, та ацетил-СоА/СоА), впливає на швидкість роботи усього мультиферментного комплексу. Окрім того,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа володіє найменшою каталітичною активністю з ферментів даного комплексу, а тому обмежує швидкість усіх реакцій, які походять за його участі. Певне значення для регуляції мають також інші субодиниці. E2, наприклад, інгібується сукциніл-СоА та АТР, а E3 – АТР та NADH [70].

Активаторами  $\alpha$ -KGDC виступають низькі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$ ) та АДР. До інгібіторів належать NADH та сукциніл-СоА [71]. Відома ще одна специфічна роль  $\alpha$ -KGDC – участь у клітинних сигнальних процесах шляхом продукції АФК (супероксиду та пероксиду водню). Основним місцем їх утворення виступає дигідроліпоаміддегідрогеназа. АФК, продуковані даним комплексом, здатні впливати на його функціонування шляхом окисної модифікації субодиниць. Зокрема, пероксинітрит інгібує активність  $\alpha$ -KGDC завдяки нітруванню залишків тирозину; пероксид водню окислює залишки ліпоєвої кислоти ензиму E2. Протидіяти такому впливу може глутатіон. Ця молекула зв'язується із цистеїном у складі  $\alpha$ -KGDC та перешкоджає взаємодії із АФК [70].

### 1.3.3. Функціональна активність та структурна організація малатдегідрогенази

MDH належить до NAD<sup>+</sup>-залежних оксидоредуктаз як термінальний ензим циклу Кребса. У більшості клітин зустрічаються дві ізоформи MDH (MDH1 та MDH2), що відрізняються локалізацією та функціями у клітинних процесах. В еукаріотичних клітинах MDH2 знаходиться у мітохондріях, а MDH1 – у цитозолі [72].

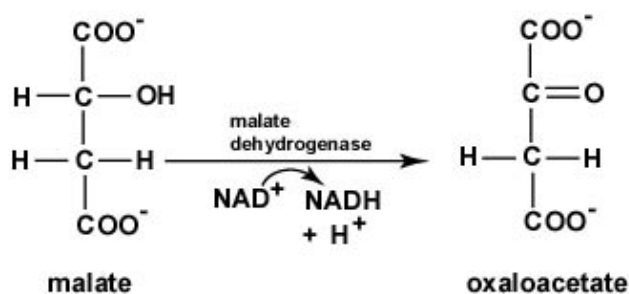


Рис. 1.3.3. Схема перебігу реакції, каталізованої MDH [65]

Даний ензим каталізує останній етап у ЦТК – оборотне окислення L-малату до оксалоацетату рис. 1.3.3.) [5].

Цитозольна MDH бере участь у функціонуванні малат-аспартатного човника, а мітохондріальна – у ЦТК. Між роботою цих ферментів існує тісна залежність. MDH1 здійснює перетворення оксалоацетату до малату з перетворенням NADH до NAD<sup>+</sup>. Далі малат надходить до матриксу мітохондрій, де окислюється MDH2 із генерацією NADH. Таким чином відбувається перенесення відновлюваних еквівалентів із цитозолу у мітохондрії без переміщення NADH [73].

Активність малатдегідрогенази регулюється такими факторами як АТР, АДФ, АМР, фумарат, аспартат. Проте відомо про роль цитрату як активатора та як інгібітора активності MDH. Якщо каталізована ензимом реакція протікає у прямому напрямку, то він виступає активатором, якщо у зворотньому, тоді – інгібітором [74].

Іншими інгібіторами можуть виступати високі концентрації оксалоацетату та іонна сила. Обидва ізоферменти MDH за фізіологічних умов існують у формі димерів з ідентичними субодиницями. Така структура забезпечує їх реакційну здатність. Натомість, за дії таких факторів як низька концентрація ензиму та низьке рН, фермент здатен дисоціювати на субодиниці та втрачати активність [75].

Відомі дослідження, які підтверджують альтернативну можливість регуляції активності MDH. Даний процес ґрунтується на ацилюванні залишків лізину цього білка. Вказаний шлях виявився важливим механізмом впливу на клітинний метаболізм, у тому числі енергетичний. У ході

дослідження доведено, що експериментальна заміна лізину на аргінін призводить до пригнічення активності ферменту [76]. Відомий ще один специфічний спосіб регуляції перебігу ЦТК. Він ґрунтується на здатності MDH та цитратсинтази об'єднуватися у мультиферментний комплекс (MDH-CS) за допомогою електростатичних взаємодій, що полегшує переміщення оксалоацетату між ними. Це явище має певні переваги: забезпечує локалізацію субстрату безпосередньо біля цитратсинтази, захист активного центру ферменту від впливу інгібіторів, підвищення стабільності проміжних продуктів. Вважається, що термодинамічні умови у фізіологічному середовищі несприятливі для реакції утворення оксалоацетату, а тому це значно впливає на швидкість усього ЦТК. Утворення такого мультиферментного комплексу дозволяє ефективно долати вказані обмеження. Експериментальні дослідження дають підстави вважати, що утворення даного комплексу регулюється проміжними метаболітами ЦТК, які впливають на конформацію MDH та цитратсинтази. Так, продукти реакцій, каталізованих цими ензимами (цитрат і NADH), знижують їх спорідненість, а субстрати (ацетил-КоА і NAD<sup>+</sup>) – збільшують її. Це дає можливість стверджувати, що MDH-CS регулює перебіг ЦТК за принципом негативного зворотного зв'язку [54].

## РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкти та методи досліджень

Дослідження здійснювалися на білих безпородних щурах масою 120-140 г та віком 2-2,5 місяці. Всі дії над тваринами проводилися відповідно до вимог міжнародної конвенції про захист прав хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей.

Парацетамол-індуковане токсичне ураження моделювали шляхом введення *per os* експериментальним тваринам парацетамолу з розрахунку 1250 мг/кг (0,5 LD<sub>50</sub>) маси тварин у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю 1 раз на день протягом 2 діб [77].

Відповідно до моделі дослідження тварин поділяли на групи:

I група – щури, які перебували на повноцінній напівсинтетичній дієті (К);

II група – щури, які перебували на напівсинтетичній низькопротеїновій дієті (1/3 добової потреби білка) (НПР);

III група – щури з гострим парацетамол-індукованим токсичним ураженням (ТУ);

IV група – щури, яким модулювали гостре парацетамол-індуковане токсичне ураження на фоні аліментарної депривації протеїну (НПР/ТУ) [78].

Тварини отримували щоденно 35 г суміші з розрахунку 200 г/кг маси тварини та мали вільний доступ до води. “Напівсинтетична дієта включала наступні компоненти: крохмаль – 620,69 г/кг; казеїн – 140 г/кг; сахароза – 100 г/кг; олія – 40 г/кг; целюлоза – 50 г/кг; сольова суміш (фосфорнокислий калій одно заміщений (KHPO<sub>4</sub>) – 163 г, вуглекислий кальцій (CaCO<sub>3</sub>) – 160,2 г, хлористий натрій (NaCl) – 58,5 г, сірчаноокисле залізо (FeSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O – 11,1 г, сірчаноокислий магній (MgSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O) – 24,1 г, сірчаноокислий марганець (MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O) – 1,87 г, йодистий калій (KI) – 0,322 г, сірчаноокислий цинк (ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O) – 0,23 г, фтористий натрій (NaF) – 0,21 г, сірчаноокисла мідь (CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O) – 0,2 г, алюмокалієві квасці (KAl(SO<sub>4</sub>)\*12H<sub>2</sub>O) – 0,047 г,

хлористий кобальт ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) – 0,01 г); вітамінна суміш (нікотинова кислота – 30 мг, кальцій пантотенат – 15 мг, піридоксин – 6 мг, тіамін – 5 мг, рибофлавін – 6 мг, фолієва кислота – 2 мг, вітамін –  $\text{B}_{12}$  – 25 мг, вітамін К – 860,0 мг, вітамін Е – 75 МО, вітамін А – 4000,0 МО, вітамін D – 1000 МО) [79]”.

Кожні 3 дні від початку експерименту проводили зважування тварин. Експеримент тривав протягом 28 днів. Декапітацію тварин проводили під дією легкого ефірного наркозу.

### ***Виділення мітохондріальної фракції***

Виділення фракції мітохондрій із гомогенату нирок проводили методом диференційного центрифугування [80]. Всі етапи проводили при температурі 0-4°C із використанням попередньо охолоджених інструментів. На першому етапі проводили гомогенізацію тканин. Для цього їх поміщали у ступку та подрібнювали ножицями, після чого заливали буфером А та гомогенізували до однорідної консистенції. Середовище гомогенізації включало 250 мМ сахарози, 30 мМ Трис-НСІ, 1 мМ EDTA, рН 7,4. Отриманий гомогенат фільтрували у пробірки для подальшого центрифугування. При швидкості у 1000g протягом 10 хв осідають ядра та частини клітин. Утворений при цьому супернатант відбирали та використовували для подальшого центрифугування при 12000g протягом 10 хв. До утвореного осаду додавали по 5 мл буферу, що містив 250 мМ сахарози, 30 мМ Трис-НСІ, рН 7,4, та центрифугували при 12000g протягом 10 хв. Осад мітохондрій повторно промивали буфером.

**Вміст білка** у зразках визначали за методом Лоурі.

### ***Визначення активності $\text{NAD}^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса***

Активність  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Реакція ґрунтується на відновленні  $\text{NAD}^+$  до  $\text{NADH}$ , кількість якого пропорційна активності ензиму.

*Активність  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу* визначали в інкубаційному середовищі об'ємом 2 мл, яке включало 25 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 мМ EGTA, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ  $\text{NAD}^+$ , 2,5 мМ  $\alpha$ -KG, 0,2 мМ TPP, 0,1 мМ коферменту А, 0,008 мМ ротенону, рН 7,4.

Реакцію починали додаванням у кювету 0,2 мл суспензії мітохондрій. Вимірювання екстинкції проводили протягом 90 с, реєструючи значення кожні 30 с. Активність  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу розраховували з використанням молярного коефіцієнту екстинкції  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  та виражали у нмоль NADH / хв на мг протеїну.

*Активність малатдегідрогенази* визначали в інкубаційному середовищі об'ємом 2 мл, яке включало 50 мМ Трис-НCl, 0,2 мМ  $\text{NAD}^+$ , 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ малату, рН 7,4. Реєстрацію проводили аналогічно.

*Активність ізоцитратдегідрогенази* визначали в інкубаційному середовищі об'ємом 2 мл, яке включало 10 мМ Трис-НCl, 0,2 мМ  $\text{NAD}^+$ , 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ ізоцитрату, рН 8,0. Реєстрацію проводили аналогічно [81].

**Статистична обробка результатів** здійснювалась на персональному комп'ютері з використанням редактора "Excel 2007 for Windows", методом варіаційної статистики, обробки результатів досліджень із застосуванням t-критерія вірогідності різниці Стюдента. Різниця вважалась достовірною при коефіцієнті вірогідності  $p < 0,05$ .

### РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мітохондрії є основним місцем генерації АТФ та регуляції як катаболічних, так і анаболічних шляхів у клітинах нирок [82]. Саме у цих органелах зосереджені ключові ферменти та системи, які перетворюють хімічну енергію вуглеводів, жирів та білків на АТФ (за деякими даними тут продукується понад 90% АТФ [83]). Відомо, що мітохондрії забезпечують здатність еукаріотичних клітин адаптуватися до різних подразників оточуючого середовища шляхом варіації їх кількості, морфології та розподілу. Це обумовлено здатністю даних органел регулювати такі процеси як енергетичний гомеостаз, апоптоз, аутофагію та передачу внутрішньоклітинних сигналів [84]. Отже, вони тісно пов'язані із проліферацією та диференціацією клітин, їх метаболічною адаптацією [82]. Значна кількість мітохондрій зосереджена саме в метаболічно активних органах, зокрема, у нирках. На сьогодні з дисфункцією цих органел пов'язують такі патологічні стани як гостре та хронічне ураження нирок. Важливими чинниками зазначених процесів виступають активні форми кисню (АФК) та нестача факторів антиоксидантного захисту, як-то супероксиддисмутази та глутатіону. Зокрема, відомо про здатність АФК пригнічувати активність комплексу IV, порушуючи транспортування електронів та, відповідно, генерацію АТФ. Наслідками стають окисний стрес, дисфункція мітохондрій та апоптоз [83].

Цикл Кребса є важливим центром енергетичного забезпечення клітин,  $\text{NAD}^+$ -залежні ензими якого регулюють швидкість цього шляху [5]. Активність даних ферментів є важливим показником енергетичного стану клітин нирок. Тому метою нашої роботи стало дослідження активності  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

Результати проведених досліджень показали, що у мітохондріях нирок тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, активність ізоцитратдегідрогенази порівняно із контролем достовірно не змінюється. При цьому за умов токсичного ураження ацетамінофеном активність даного ензиму також не відрізняється від показників контрольної групи (рис 3.1.).

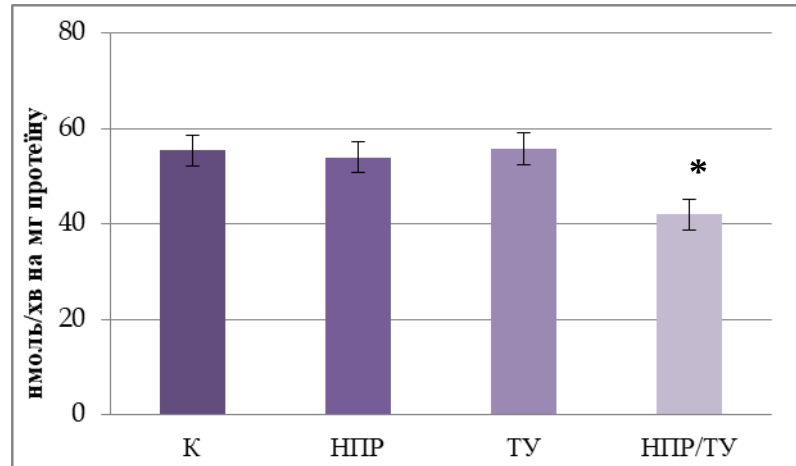


Рис. 3.1. Ізоцитратдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну

*Примітка (тут і надалі): К – тварини, які перебували на повноцінній напівсинтетичній дієті; НПР – тварини, які перебували на напівсинтетичній низькопротеїновій дієті (1/3 добової потреби білка); ТУ – тварини з гострим парацетамол-індукованим токсичним ураженням; НПР/ТУ – тварини, яким модулювали гостре парацетамол-індуковане токсичне ураження на фоні аліментарної депривації протеїну;*

*\* – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем,  $P < 0,05$ .*

Проте, у випадку токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну, спостерігається значне зниження ізоцитратдегідрогеназної активності (рис 3.1.).

Ізоцитратдегідрогеназа – це ключовий ензим циклу Кребса, що каталізує перетворення ізоцитрату на  $\alpha$ -кетоглутарат [60]. В ході такої реакції вивільняється  $\text{CO}_2$ , NADH та  $\text{H}^+$ . Таке перетворення незворотне за фізіологічних умов та регулюється наявністю субстрату, активаторів та інгібіторів [61]. До активаторів належать іони  $\text{Ca}^{2+}$ , ADP і цитрат; до

інгібіторів – АТР, NADH і NADPH. У зв'язку із цим IDH вважається регуляторним ферментом, який визначає швидкість всього циклу Кребса [66].

Відомо про те, що рівень та розподіл  $\text{NAD}^+$  у клітинах є показником їх енергетичного стану. NADH, що утворюється у циклі Кребса, виступає донором електронів та виконує вирішальну роль у синтезі АТФ у ЕТЛ мітохондрій, де генерується значна частина енергії у клітинах [6]. Цикл Кребса є основним окислювальним шляхом для ацетил-СоА, джерелом якого виступають вуглеводи, жири та амінокислоти. Його також називають амфіболічним, адже він задіяний як в анаболічних, так і в катаболічних процесах. Саме тому він виконує інтегруючу функцію між такими метаболічними шляхами як гліколіз, глюконеогенез, трансамінування та  $\beta$ -окислення [85]. Виходячи із цього можна зробити висновок про те, що існує досить велика кількість шляхів забезпечення циклу Кребса енергетичними субстратами, а тому дефіцит одного із них – амінокислот, не перешкоджає підтриманню активності даного процесу. У цьому випадку дефіцит білків у раціоні компенсується достатньою кількістю вуглеводів, які виступають джерелом глюкози. Перетворюючись у гліколізі, цей субстрат стає піруватом, який виступає попередником ацетил-СоА при надходженні у мітохондрії [86]. Отже, встановлені показники у групах НПР та ТУ вказують на ймовірне збереження активності основного амфіболічного шляху клітин за досліджуваних умов.

Достатній вміст білків у раціоні має вирішальне значення для підтримки в організмі нормального рівня глутатіону, який виступає ключовою формою зберігання сульфору [12]. Вважається, що ацетамінофен-індукована нефротоксичність може бути наслідком утворення значної кількості NAPQI при передозуванні парацетамолу. Це призводить до значного виснаження запасів глутатіону, та накопичення даного токсичного метаболіту, що здатен ковалентно зв'язуватися із макромолекулами у клітинах, знижуючи їх активність. Наслідками стають порушення гомеостазу, індукція некрозу та, зрештою, дисфункція органів [30]. Оскільки основною

мішенню дії NAPQI виступають мітохондрії, то неминучим ефектом буде їх дисфункція та енергетичне виснаження. Разом з тим, відома дія АРАР як інгібітора GSH-синтази, що каталізує синтез глутатіону [36, 37]. Отже, відповідно до наших результатів, ймовірно, існує зв'язок між наслідками аліментарного дефіциту протеїну та токсичного ураження ацетамінофеном, що стають причиною зниженої ізоцетратдегідрогеназної активності у групі НПР/ТУ.

$\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа виступає ще одним пунктом, де здійснюється регуляція циклу Кребса. Це обумовлено здатністю його субодиниці E1 до взаємодії з різними регуляторами ( $\text{Ca}^{2+}$ , АТФ/АДП, -SH/-S-S (тіол/дисульфід), NADH/NAD<sup>+</sup>, та ацетил-CoA/CoA), а це своєю чергою впливає на швидкість роботи усього мультиферментного комплексу. Окрім того, відома здатність цього ензиму до структурної модифікації під впливом різних хімічних агентів, змінюючи свою активність [70]. Саме тому, визначення  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназної активності дає уявлення про енергетичний стан у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

Результати проведених досліджень показали, що у мітохондріях нирок тварин, які споживали низькопротеїновий раціон,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназна активність достовірно змінюється порівняно із контролем. Аналогічний результат спостерігається у групі НПР/ТУ. Проте за умов токсичного ураження активність даного ензиму не відрізняється від показників контрольної групи (рис 3.2.).

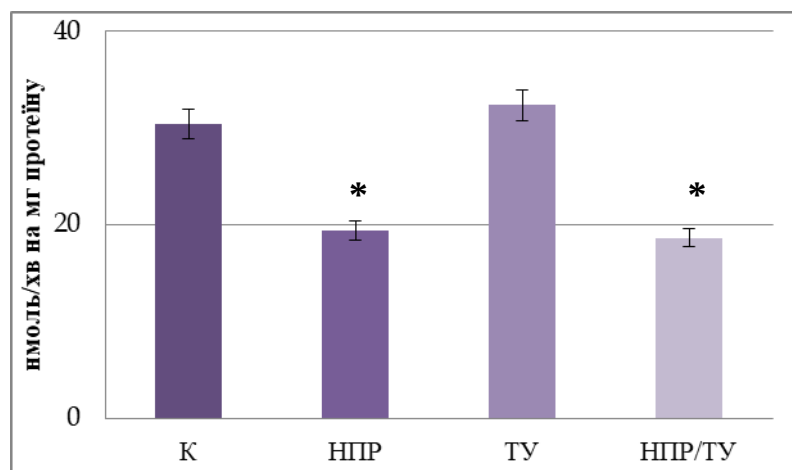


Рис. 3.2.  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну

Отриманий результат у групі НІР, ймовірно, можна пояснити з точки зору перерозподілу  $\alpha$ -кетоглутарату за даних умов. Будучи попередником найважливіших форм транспортування азоту, він необхідний для перебігу таких метаболічних шляхів як перетворення глюкози, біосинтез амінокислот та обмін ліпідів [87]. Ця кетокислота є важливим джерелом амінокислот глутамату та глутаміну [88]. Спочатку відбувається трансамінування  $\alpha$ -кетоглутарату за допомогою глутаматдегідрогенази до глутамату, який надалі перетворюється на глутамін за участі глутамінсинтетази [87]. Глутамат своєю чергою залучається у трансамінування із оксалоацетатом, утворюючи аспартат. Відомо і про участь  $\alpha$ -KG у синтезі проліну, аргініну та поліамінів. Додатковим підтвердженням цього є ряд досліджень, які вказують на застосування орнітинової солі  $\alpha$ -кетоглутарату для покращення стану пацієнтів із дефіцитом білка (напр. після травм, операцій та опіків). Зокрема, спостерігається врівноваження азотистого балансу, сповільнення катаболізму та посилення синтезу білків за рахунок обмеження їх протеолізу у тканинах [89].

Виходячи із перелічених фактів можна припустити, що за умов аліментарного дефіциту протеїну  $\alpha$ -KG буде вилучатися із циклу Кребса та брати участь у синтезі амінокислот. Отже, за умов експерименту нестача

білків у раціоні виступає лімітуючим фактором активності  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази.

Іншою важливою функцією  $\alpha$ -KG є участь у реакціях каталізованих  $\alpha$ -KG-залежними діоксигеназами у ролі ко-субстрата. Ці ферменти відомі здатністю каталізувати реакції гідроксилювання білків, нуклеїнових кислот та ліпідів. При цьому відбувається перенесення одного атома кисню на субстрат, а іншого на  $\alpha$ -KG, що призводить до його декарбоксилювання, перетворення на сукцинат та виділення  $\text{CO}_2$ .

Окрім того, у літературі є дані про здатність  $\alpha$ -KG зменшувати окиснювальний стрес, тобто виявляти антиоксидантні властивості. При цьому він може піддаватися неферментативному окисному декарбоксилюванню до сукцинату, знешкоджуючи при цьому пероксид водню [89, 90]. Токсичний метаболіт парацетамолу – NAPQI відомий своєю здатністю посилювати утворення активних форм кисню та азоту, наслідком чого є пероксидне окислення ліпідів та виснаження антиоксидантів (напр. супероксиддисмутази та відновленого глутатіону). Глутамін, що утворюється із  $\alpha$ -KG, як відомо, виступає власне попередником глутатіону – важливого для детоксикації NAPQI. Дослідження за участю тварин підтверджують зменшення проявів АРАР-індукованої гепатотоксичності після введення  $\alpha$ -KG, зокрема спостерігалися регенерація клітин, послаблення запалення та некрозу. Пояснення цьому знаходять у здатності цієї кетокислоти відновлювати активність антиоксидантних ферментів та підтримувати рівень відновленого глутатіону за експериментальних умов. Також, будучи попередником амінокислот,  $\alpha$ -KG шляхом утворення глутаміну знешкоджує аміак, який пригнічує антиоксидантні ферменти [64]. Отже, зазначені факти дають можливість припустити участь  $\alpha$ -KG як антиоксиданта, що вилучається із циклу Кребса за умов токсичного ураження ацетамінофеном. Тому, ймовірно, однією із причин зменшення  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназної активності у групі НПР/ТУ є залучання  $\alpha$ -KG у інші шляхи, які компенсують наслідки токсичного ураження.

Мішенню дії NAPQI, як правило, виступають сульфгідрильні групи цистеїну білків мітохондрій та іонних каналів, з якими встановлюється ковалентний зв'язок [38]. Виходячи із цього можна припустити існування подібного механізму впливу ацетамінофену на активність  $\alpha$ -KGDC у групі НПР/ТУ. Потенційною мішенню у складі даного комплексу виступають саме залишки цистеїну. Відомо і про модифікацію SH-груп завдяки АФК [70]. Окрім того, шляхом зв'язування із АФК, може реалізуватися один із механізмів регуляції активності даного ензиму. До прикладу, 4-гідрокси-2-ноненал, відомий як продукт пероксидного окислення ліпідів, вступає у взаємодію із ліпоєвою кислотою, інактивуючи білок [91]. Іншими мішенями ацетамінофену виступають ферменти детоксикації. Відповідно до деяких досліджень, встановлено утворення аддуктів-NAPQI із глутатіон-S-трансферазами (GST) – родиною ферментів детоксикації [92]. Ймовірно, що наслідком цього стане накопичення даного токсичного метаболіту у клітинах та посилення їх ацетамінофен-індукованого пошкодження.

Отже, можна припустити, що здатність ацетамінофену до модифікації та подальшої інактивації важливих білків є одним із факторів зниження  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназної активності у мітохондріях нирок щурів групи НПР/ТУ.

До  $\text{NAD}^+$ -залежних оксидоредуктаз циклу Кребса також належить малатдегідрогеназа, що виступає термінальним ензимом цього шляху [72]. Відомими регуляторами ензиму є АТР, АДФ, АМР, фумарат, аспартат. До інших регуляторів належать оксалоацетат та іонна сила [74]. Саме тому, визначення малатдегідрогеназної активності дає уявлення про енергетичний стан у мітохондріях нирок за досліджуваних умов.

Результати проведених досліджень показали, що у мітохондріях нирок тварин із груп НПР та ТУ малатдегідрогеназна активність зберігається на рівні контролю. Натомість у групі НПР/ТУ спостерігається виражене зниження активності даного ензиму порівняно із К (рис 3.3.).

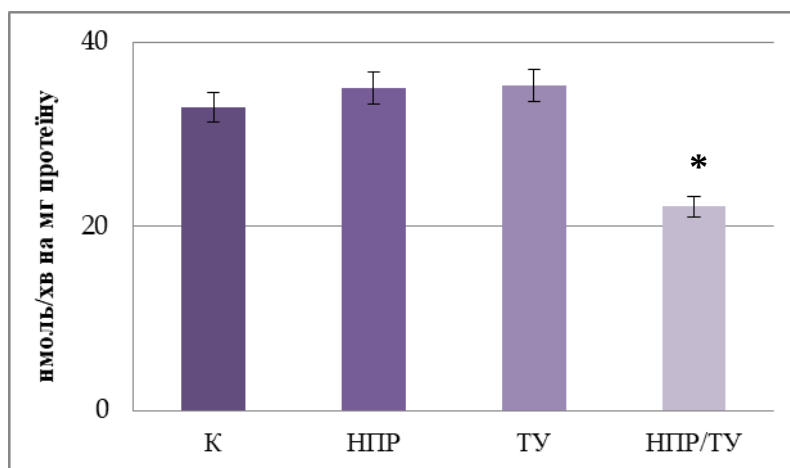


Рис. 3.3. Малатдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну

Різні енергетичні субстрати, потрапляючи у цитозоль, окислюються багатьма ферментами, які використовують  $\text{NAD}^+$  як кофактор, утворюючи  $\text{NADH}$ . Цитозольна MDH окислює даний кофактор з одночасним відновленням оксалоацетату до малату. Далі шляхом обміну на  $\alpha\text{-KG}$ , малат проникає через мітохондріальну мембрану у матрикс, де і залучається у цикл Кребса. Тут він повторно окислюється MDH2 з утворенням  $\text{NADH}$ . Такий шлях називається малат-аспартатним човником та забезпечує додаткове постачання проміжних метаболітів для генерації енергії у мітохондріях [73]. Джерелом цитозольного  $\text{NADH}$  виступає, зокрема, гліколіз, а отже, достатнє аліментарне забезпечення глюкозою, ймовірно, компенсує дефіцит амінокислот як енергетичного субстрату. Це дозволяє підтримувати малатдегідрогеназну активність у мітохондріях нирок за умов нестачі білків у раціоні на рівні контрольної групи.

При аналізі результатів всіх  $\text{NAD}^+$ -залежних дегідрогеназ циклу Кребса було виявлено, що їх активність у групі TU завжди зберігається на рівні контролю. Оскільки відомо, що дієта із нестачею сірковмісних амінокислот або неорганічного сульфату призводить до зниження сульфатації ацетамінофену до нетоксичних сполук, а також виснаження запасів глутатіону, то, ймовірно, нормальне забезпечення раціону протеїном дає достатню кількість сірковмісних сполук для детоксикації ацетамінофену

та нейтралізації токсичного ефекту. Разом з тим, достатнє споживання глюкози також можна розглядати як позитивний фактор протидії утворенню NAPQI, адже відомо, що вона залучена в один із механізмів детоксикації [35].

Отже, можна припустити, що достатнє забезпечення протеїном та меншою мірою вуглеводами у цій групі має вирішальне значення для нейтралізації ймовірних наслідків токсичного ураження.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що достовірні зміни ізоцитратдегідрогеназної активності спостерігаються лише у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну. Наслідком зниження ізоцитратдегідрогеназної активності може бути порушення генерації НАДН у мітохондріях нирок з наступним формуванням енергетичного дисбалансу.

2. Показано, що  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, достовірно знижується порівняно із контролем, що може свідчити про посилене використання  $\alpha$ -кетоглутарату в інших метаболічних шляхах. Аналогічна тенденція характерна для тварин групи НПР/ТУ.

3. Результати проведених досліджень показали, що малатдегідрогеназна активність у мітохондріях нирок тварин груп НПР та ТУ зберігається на рівні контрольних показників. Натомість у тварин з токсичним ацетамінофеном на тлі нестачі протеїну у раціоні спостерігається виражене зниження активності досліджуваного ензиму порівняно з контролем.

Отже, визначення активності  $\text{NAD}^+$ -залежних ензимів циклу Кребса показало, що критичним для функціонування основного амфіболічного шляху клітини є токсичний вплив ацетамінофену на тлі аліментарного дефіциту протеїну.